

**Mikrobiologisch-ökologische Grundlagen der Funktionalität
von Umweltdenitrifikationsanlagen**

Zur Erlangung des akademischen Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

von der KIT-Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Victoria Sofie Griebmeier

KIT-Dekan: Prof. Dr. Reinhard Fischer

Referent: Prof. Dr. Johannes Gescher

Koreferent: Prof. Dr. Harald Horn

Tag der mündlichen Prüfung: 14.10.2019

Erklärung an Eides statt

Hiermit versichere ich, dass ich die folgende Arbeit selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen verwendet habe. Alle wörtlich oder dem Sinn nach aus anderen Texten entnommenen Stellen sind von mir durch Angabe der Quelle gekennzeichnet. Diese Arbeit ist in gleicher oder ähnlicher Fassung noch nicht Bestandteil einer Prüfungsleistung. Weiterhin habe ich beim Anfertigen dieser Arbeit die Regeln zur Sicherung der guten wissenschaftlichen Praxis des KIT beachtet und alle Primärdaten gemäß Abs. A (6) am Institut für Angewandte Biowissenschaften archiviert. Des Weiteren versichere ich, dass die elektronische mit der schriftlichen Form dieser Arbeit übereinstimmt.

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von November 2015 bis August 2019 am Institut für Angewandte Biowissenschaften der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften des Karlsruher Instituts für Technologie unter der Leitung von Professor Johannes Gescher durchgeführt.

Ort, Datum

Unterschrift

Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge

Teile dieser Arbeit wurden in den folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht. Diese Arbeit bezieht sich in einigen Abschnitten auf den Inhalt der folgenden Publikationen, was stets kenntlich gemacht wurde.

Veröffentlichungen

Griessmeier, V., Bremges, A., McHardy, A., Gescher, J. (2017). Investigation of different nitrogen route and their key microbial players in wood chip-driven denitrification beds. *Scientific reports* 7: 17028

Griessmeier, V., Schulz C. (2017). Technische Umsetzung und wissenschaftliche Begleitung einer Denitrifizierungsanlage am Mürmes. *Denkanstöße* 13

Griessmeier, V., Gescher, J. (2018). Influence of the potential carbon sources for field denitrification beds on their microbial diversity and the fate of carbon nitrate. *Frontiers in Microbiology* 9: 1313

Griessmeier, V., Leberecht, K., Gescher J. (2019). NO₃⁻ removal efficiency in field denitrification beds: key controlling factors and main implications. *Environmental microbiology reports* 11:3

Vorträge und Konferenzbeiträge

Posterpräsentation auf der 17th International Symposium on Microbial Ecology (ISME) in Leipzig/Deutschland im August 2018

Vortrag im Ministerium für Umwelt, Klima und Energiewirtschaft Baden-Württemberg in Stuttgart/Deutschland im Januar 2018

Posterpräsentation auf der 5th Joint Conference of the DGHM & VAAM Microbiology and Infection in Würzburg/Deutschland im März 2017

Geladener Vortrag auf der Tagung: Moore in Rheinland-Pfalz. Moorschutz in der Praxis. Wiedervernässung und Regeneration von der Umweltstiftung Rheinland-Pfalz in Birkenfeld/Deutschland im September 2016

Vortrag auf der European Nitrogen Cycle (ENC21) Konferenz in Norwich/UK im September 2016

Zusammenfassung

Aufgrund einer steigenden Bevölkerung und der daraus resultierenden wachsenden Lebensmittelnachfrage nimmt auch der Einsatz von Düngemitteln im Agrarsektor kontinuierlich zu. Die Folge ist ein erhöhter Nährstoffeintrag reaktiver Stickstoffspezies, insbesondere Nitrat, in sensible Ökosysteme, wie beispielsweise Moore, was zu einer Eutrophierung und Zerstörung des Lebensraums führen kann. Einen Lösungsansatz um überschüssiges Nitrat zu entfernen, stellen Umweltdenitrifikationsanlagen dar. In diesen unterirdisch angelegten Becken soll mit Hilfe einer organischen Kohlenstoffquelle Nitrat unter anoxischen Bedingungen zu Luftstickstoff (N_2) reduziert werden. Neben der Nitratentfernung besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass umweltwirksame Nebenprodukte wie Ammonium, Nitrit, Methan oder Lachgas produziert werden. Dabei spielt insbesondere die mikrobielle Zusammensetzung innerhalb der Anlage eine bedeutende Rolle, die in bisherigen Studien weniger berücksichtigt wurde.

In dieser Arbeit wurde eine Umweltdenitrifikationsanlage in der Vulkaneifel (Deutschland) untersucht. Diese wurde errichtet, um den Nitratreintrag in das Moor *Mürmes* durch landwirtschaftliches Drainagewasser zu reduzieren. In dieser Arbeit wurde neben der Untersuchung der Funktionalität der Anlage, der limitierenden Faktoren und der Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte, auch das Mikrobiom der planktonischen und festen Phase der Anlage analysiert.

Es konnte gezeigt werden, dass eine Umweltdenitrifikationsanlage in Mitteleuropa funktional betrieben werden kann. Eine Limitation des Systems wurde vorrangig in den niederschlagsreichen und kalten Wintermonaten beobachtet. Die maßgeblich einflussnehmenden äußeren Prozessparameter auf die die Funktionalität der Anlage sind vor allem die Temperatur und die Flussrate. Neben einer hohen Nitratentfernungseffizienz von 100% in mehreren Monaten konnte auch die Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte – Nitrit und Methan – beobachtet werden. Dabei trat Methan vorrangig in warmen und trockenen Monaten auf, wohingegen Nitrit häufig bei hohen Flussraten produziert wurde.

Die Analyse des Mikrobioms zeigte, dass sich denitrifizierende Organismen vorrangig in der planktonischen Phase aufhielten, wohingegen die Hydrolyse des Holzmaterials in der Biofilmphase stattfand. Die mikrobielle Diversität blieb über die analysierten Monate hinweg stabil, wobei das Phylum der Proteobakterien den größten Anteil der mikrobiellen Zusammensetzung ausmachte. Diesem Phylum konnten mit Hilfe der Metagenom- und

Metatranskriptom-Analyse auch die Schlüsselorganismen des Denitrifikationsprozesses zugeordnet werden. Insbesondere in den Ordnungen Burkholderiales, Rhodospirillales, *Candidatus* Accumulibacter, Rhodocyclales und Nitrosomonadales konnten hohe Genexpressionen der Denitrifikationsgene gefunden werden. Dabei schien den meisten Organismen – außer Vertretern der Nitrosomonadales – Acetat als Elektronendonator zu dienen. Im Gegensatz zum Denitrifikationsprozess konnte für die Hydrolyse der (Hemi-)Cellulose eine Beteiligung von Pro- und Eukaryoten festgestellt werden. So nahmen neben Vertretern der Bakterien (Proteobakterien, Bacteroidetes, Actinobakterien, Verrucomicrobia) diesmal auch Mitglieder der Pilze (Ascomycota, Basidiomycota) eine wichtige Rolle im Abbau des Holzsubstrats ein.

Neben der Freilanduntersuchung wurden noch zwei Fragestellungen im Labormaßstab untersucht. Die erste war, ob nach Zugabe hoher Nitratkonzentrationen in Holzhackschnitzel-Reaktoren eine dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) eintritt und wenn ja welche Organismen daran beteiligt sind. In der vorliegenden Arbeit konnte eine Ammoniumproduktion nach Zugabe hoher Nitratkonzentrationen beobachtet werden. Durch eine Metatranskriptom-Analyse konnte gezeigt werden, dass die Ammoniumentstehung durch den DNRA-Prozess zustande kam und dabei vorrangig Organismen aus der Ordnung Ignavibacteriales beteiligt waren. Die zweite zu untersuchende Fragestellung war, ob und warum Reaktoren mit Holzpellets eine Inhibierung von Methanogenen bewirken. Mit einer Ko-Kultur aus methanogenen Modellorganismen (*Methanosarcina bakerii* und *Methanobacterium formicicum*) konnte gezeigt werden, dass Holzpellets einen inhibitorischen Effekt auf methanogene Organismen haben, wobei jedoch der ausschlaggebende Faktor (pH-Wert, biotischer Einfluss) noch nicht final geklärt werden konnte.

Die umfangreiche Charakterisierung der Umweltdenitrifikationsanlage ermöglicht eine Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Forschungsstand, wobei bekannte Hypothesen und Beobachtungen anderer Studien untermauert wurden. Gleichzeitig wurde ein bis dato wenig beachteter Forschungsbereich der Anlagen untersucht, der die Identifikation und Interaktion von Schlüsselorganismen aufzeigte und wichtige Erkenntnisse zu grundlegenden Stoffwechselprozesse lieferte. Aus diesen Erkenntnissen ergeben sich neue Möglichkeiten die Anlagen zukünftig optimieren und umweltverträglicher gestalten zu können.

Inhaltsverzeichnis

Erklärung an Eides statt	I
Veröffentlichungen und Konferenzbeiträge	II
Zusammenfassung	III
Inhaltsverzeichnis	V
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
Abkürzungsverzeichnis	XI
1 Einleitung	1
1.1 Die Denitrifikation im mikrobiellen Stickstoffkreislauf.....	3
1.2 Celluloseabbau.....	5
1.3 Umweltdenitrifikationsanlagen – Aufbau und Langlebigkeit.....	6
1.4 Biotische und abiotische Einflussfaktoren auf die Nitratentfernungseffizienz.....	7
1.5 Mögliche Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte beim Einsatz von Umweltdenitrifikationsanlagen	12
1.6 Untersuchungsgebiet Moor „Mürmes“	15
1.7 Problemstellung und Stand der Forschung	16
1.8 Zielsetzung.....	20
2 Material und Methoden	21
2.1 Umweltdenitrifikationsanlage - Feldversuch.....	21
2.1.1 Aufbau der Umweltdenitrifikationsanlage	21
2.1.2 Errichtung der Online-Monitoring-Station	25
2.1.3 Probenentnahme aus der Umweltdenitrifikationsanlage	27
2.1.4 Ermittlung der Durchflussrate	29
2.1.5 Uranin-Tracerexperiment	30
2.1.6 Berechnungen zur Abschätzung der Denitrifikationsleistung	31
2.2 Laborversuche.....	33
2.2.1 Aufbau der Labor-Denitrifikationsreaktoren.....	33
2.2.2 Probenentnahme und Nitratzugabe im Laborreaktor.....	34
2.2.3 Inhibierung methanogener Organismen durch Holzpellets	34
2.2.4 Kulturmedien.....	36
2.2.5 Primer	38
2.2.6 Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) Materialien	39
2.3 Analytische Methoden	41
2.3.1 Ionenchromatographie (IC)	41
2.3.2 Hach-Küvettestests.....	42
2.3.3 Gaschromatographie (GC).....	43
2.3.4 Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC).....	44
2.4 Molekularbiologische Methoden	44
2.4.1 DNA- und RNA-Isolation	45

2.4.2	Quantifizierung von DNA und RNA.....	46
2.4.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	46
2.4.4	Agarose-Gelelektrophorese	48
2.5	Sequenziermethoden – Illumina Sequenzierung.....	49
2.6	Bioinformatische Auswertung	51
2.6.1	Auswertung der 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung.....	51
2.6.2	Bioinformatische Auswertung der Metagenom- und Metatranskriptom- Sequenzierung	53
2.7	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH).....	54
2.7.1	Fluoreszenzmikroskopie.....	56
3	Ergebnisse	58
3.1	Monitoring der Freilandanlage	58
3.1.1	Stickstoff-Spezies, TOC, pH und Temperatur.....	58
3.1.2	Abflussmessung und Nitratentfernungsrate.....	66
3.1.3	HRT, Fließverhalten und Nitratabbau in der Denitrifikationsanlage	70
3.1.4	Limitierende Faktoren auf die Nitratentfernung.....	73
3.1.5	Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte.....	77
3.1.6	Das Mikrobiom der Umweltdenitrifikationsanlage	87
3.2	Ergebnisse der Laboruntersuchungen	104
3.2.1	DNRA in den Holzhackschnitzel-Reaktoren.....	104
3.2.2	Inhibierung methanogener Organismen durch Holzpellets	112
4	Diskussion.....	118
4.1	Funktionalität und Limitation der Freiland-Umweltdenitrifikationsanlage.....	118
4.1.1	Nitratentfernung und limitierende Faktoren der untersuchten Anlage	119
4.1.2	Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte.....	121
4.1.3	Fließverhalten in der Anlage	127
4.1.4	Das Mikrobiom der Umweltdenitrifikationsanlage.....	128
4.2	Laboruntersuchungen.....	136
4.2.1	DNRA in Holzhackschnitzel-Reaktoren	136
4.2.2	Inhibierung methanogener Organismen durch Holzpellets	138
4.3	Mikrobieller Vergleich der Labor- und Freiland-Umweltdenitrifikationsanlage	139
4.4	Zukünftige Schritte zur Optimierung von Umweltdenitrifikationsanlagen	141
	Literaturverzeichnis.....	144
	Anhang	154

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nitratwerte der Messstellen im Europäische Umweltagentur (EUA)-Messnetz (links) und Nitratwerte von Messstellen aus Gebieten mit hoher landwirtschaftlicher Nutzung (rechts).	2
Abbildung 2: Reaktionen verschiedener Stoffwechselprozesse des Stickstoffkreislaufes, wie die Nitrifikation, Denitrifikation, die DNRA (dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium) und Anaerobe Ammoniumoxidation (Anammox).....	4
Abbildung 3: Skizze einer Umweltdenitrifikationsanlage..	6
Abbildung 4: Einflussfaktoren auf die Denitrifikationsleistung in Umweltdenitrifikationsanlagen...	8
Abbildung 5: Einflussfaktoren und deren Wechselspiel auf die Entstehung potentiell unerwünschter Nebenprodukte.	12
Abbildung 6: Luftaufnahme vom Moor „Mürmes“.	16
Abbildung 7: Nitratkonzentration an den Austrittsstellen der Drainagen D6 und D9 (A) und D7 und D8 (B).....	17
Abbildung 8: Verhalten der Nitratreduktion (schwarz) und Produktion verschiedener Nebenprodukte wie Nitrit (rot), Ammonium (grün) und TOC Gehalt (blau) in den verschiedenen Reaktortypen (Stroh, Holzpellets, Holzhackschnitzel).....	18
Abbildung 9: Bilder von der Errichtung der Umweltdenitrifikationsanlage an der Drainage D7.....	22
Abbildung 10: Skizze des Denitrifikationsbeckens D7 mit genauer Lage und Bezeichnung der Stutzen (St. 1, St. 2, St. 3, St. 4) und Schächte (St. 5 und St. 6) an der Denitrifikationsanlage D7.	23
Abbildung 11: Zulaufschacht mit Bypass-Rohr (1) und Zulaufdrossel (2) an der Anlage D7.	24
Abbildung 12: Ablaufschacht der Anlage (links) mit nach oben ragendem Rohr zur Anstauung des Wassers im Becken.....	24
Abbildung 13: Messstation innerhalb der Hütte.....	26
Abbildung 14: Anbringung der Schläuche im Zulaufrohr (links) und im Ablaufrohr (mitte) der Anlage D7 sowie die unterirdische Verlegung der Schläuche (rechts).....	26
Abbildung 15: Gasprobenentnahme an den Stutzen (links) der Anlage D7 und an den Schächten (rechts) mit vakuumisierten Flaschen.....	28
Abbildung 16: Verlegung der Peek-Gasschläuche zu den einzelnen Stutzen und Schächten (links). Aufbau und Anschluss der Schläuche an dem Mikro GC in der Hütte (rechts).....	29
Abbildung 17: Thomsonwehr im Ablaufschacht der Umweltdenitrifikationsanlage.....	30
Abbildung 18: Skizze des fertigen Laborreaktoraufbaus.	34
Abbildung 19: Von der Messstation detektierte Nitratkonzentrationen (NO_3^-) des Zu- und Ablaufs der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte vom Juni 2016 bis Ende Juni 2019.	61
Abbildung 20: Von der Messstation detektierte Nitritkonzentrationen (NO_2^-) des Zu- und Ablaufs der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte von Juli 2016 bis Ende Juni 2019.	62
Abbildung 21: Ammoniumkonzentration (NH_4^+) der Messstation des Zu- und Ablaufs an der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte von Juli 2016 bis Ende Juni 2019.	63

Abbildung 22: Von der Messstation detektierten TOC-Konzentration des Zu- und Ablaufs an der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte von Juli 2016 bis Ende Juni 2019.....	64
Abbildung 23: Von der Messstation detektierter pH-Wert der Messstation des Zu- und Ablaufs an der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte von Juli 2016 bis Ende Juni 2019.....	65
Abbildung 24: Wassertemperatur des Zu- und Ablaufs an der Denitrifikationsanlage D7 von Juli 2016 bis Ende Juni 2019.	66
Abbildung 25: Vollgelaufener Ablaufschacht im Januar 2018.	67
Abbildung 26: Abflusswerte für die Jahre 2017, 2018 und 2019 mit den monatlich erhobenen Abflusswerten, den kontinuierlichen, Messungen des Wehrs im Abfluss und den simulierten Abflusswerten.....	68
Abbildung 27: Nitratentfernungsrates und theoretische HRT, welche mit den simulierten Abflusswerten berechnet wurden.	69
Abbildung 28: Nitratentfernungsrates und theoretische HRT, welche mit den gemessenen Abflusswerten aus dem Wehr für 2018 und 2019 berechnet wurden.....	70
Abbildung 29: Nitratkonzentration der verschiedenen Probeentnahmestellen (St.), sowie des Zu- und Ablaufs im Messzeitraum.....	72
Abbildung 30: Nitratentfernungseffizienz gegen die simulierte und monatlich gemessene Flussrate für die Jahre 2016, 2017, 2018 und 2019.	74
Abbildung 31: Simulierte Flussrate gegen die Wassertemperatur (A) und Nitratentfernungseffizienz gegen den Temperaturverlauf des Ablaufwassers für die Jahre 2016, 2017, 2018, 2019 (B)..	75
Abbildung 32: Nitratentfernungseffizienz gegen die Nitratkonzentration des Zulaufs für die Jahre 2016, 2017, 2018, 2019.	76
Abbildung 33: Nitratentfernungseffizienz gegen die kontinuierliche und monatlich gemessene TOC-Konzentration des Ablaufs für die Jahre 2016, 2017, 2018, 2019.	77
Abbildung 34: Nitritkonzentration an den verschiedenen Probeentnahmestellen (St. 1 bis 4) sowie vom Zu- und Ablauf im Messzeitraum.....	79
Abbildung 35: Monatliche Analyse der Methanproduktion an den Probeentnahmestellen (St.) sowie die monatliche Flussrate des Zulaufs in die Umweltdenitrifikationsanlage.....	80
Abbildung 36: CH ₄ -Konzentration der Dauermessung für die einzelnen Probeentnahmestellen (A). CH ₄ -Konzentration gegen die O ₂ -Konzentration für den Zeitraum der Dauermessung (B). ...	82
Abbildung 37: Monatliche Analyse der CO ₂ -Emission an den Probeentnahmestellen (St.) sowie die monatliche Flussrate des Zulaufs in die Umweltdenitrifikationsanlage.....	83
Abbildung 38: CO ₂ -Konzentration der Dauermessung für die einzelnen Probeentnahmestellen (A). CO ₂ -Konzentration gegen die CH ₄ -Konzentration für den Zeitraum der Dauermessung (B)..	84
Abbildung 39: Monatliche Analyse der N ₂ O-Produktion an den Probeentnahmestellen (St.) sowie die monatliche Flussrate des Zulaufs in die Umweltdenitrifikationsanlage.....	85
Abbildung 40: N ₂ O-Konzentration der Dauermessung für die einzelnen Probeentnahmestellen (A). N ₂ O-Konzentration gegen die CH ₄ - und CO ₂ -Konzentration für den Zeitraum der Dauermessung (B).....	86
Abbildung 41: Mikrobielle Diversität (OTU Bacteria) der Umweltdenitrifikationsanlage auf Phylum-Ebene für die planktonische (oben) und die feste Phase (unten).....	88

Abbildung 42: OTU Bacteria in der Umweltdenitrifikationsanlage auf Ordnungs-Ebene für die planktonische (oben) und die feste Phase (unten).	89
Abbildung 43: Taxonomische Klassifikation der Metagenom-Sequenzierung vom 24.04.2018 auf Phylum- (A) und Ordnungs-Ebene (B) für die planktonische und feste Phase in der Umweltdenitrifikationsanlage.	92
Abbildung 44: OTU Archaea auf Ordnungs-Ebene für die feste und planktonische Phase der Umweltdenitrifikationsanlage.	93
Abbildung 45: Gesamtanzahl der TPM für Gene, welche am Nitratentfernungsprozess (Denitrifikation und DNRA) beteiligt sind für die planktonische sowie für die feste Phase der Denitrifikationsanlage.	94
Abbildung 46: Gesamtanzahl der TPM der planktonischen Phase für Gene, die am Nitratentfernungsprozess (Denitrifikation und DNRA) beteiligt sind, auf Phylum- und Ordnungsebene innerhalb der Proteobakterien.....	96
Abbildung 47: Gesamtanzahl der TPM der festen Phase für Gene, die am Nitratentfernungsprozess (Denitrifikation und DNRA) beteiligt sind, auf Phylum- und Ordnungsebene innerhalb der Proteobakterien.....	97
Abbildung 48: Gesamtanzahl der TPM für Gene, welche am Hemicellulose- und Celluloseabbau beteiligt sind, für die planktonische und für die feste Phase.	98
Abbildung 49: Expressionsstärke der Gene (in TPM), die für Enzyme mit cellulolytischer oder hemicellulolytischer Aktivität kodieren, in der festen Phase auf Phylum-Ebene (links) und aufgeschlüsselt innerhalb der Bacteria (rechts). Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit sind hier nur Ordnungen aufgelistet, die einen höheren TPM als 0,1 aufzeigten.	100
Abbildung 50: Expressionsstärke der Gene (in TPM), die für Enzyme mit cellulolytischer oder hemicellulolytischer Aktivität kodieren, auf Phylum-Ebene in der planktonischen Phase...	101
Abbildung 51: Nitrat- und Ammoniumkonzentration in den Labor-Holzhackschnitzel-Reaktoren.	105
Abbildung 52: Mikrobielle Diversität (OTU Bakterien) auf Phylum-Ebene (oben) und Ordnungs-Ebene (unten) für die feste und planktonische Phase zu Zeitpunkt A und B der Laborreaktoren mit Holzhackschnitzeln sowie des Inokulums (nach Griebmeier <i>et al.</i> , 2017).	107
Abbildung 53: Archaea auf Ordnungs-Ebene für die feste und planktonische Phase der Laborreaktoren mit Holzhackschnitzeln zu Zeitpunkt A und B.....	108
Abbildung 54: Gesamtzahl der TPM für Gene, die an der Nitratentfernung (Denitrifikation und DNRA) beteiligt sind für die planktonischen und festen Proben sowie zu Zeitpunkt A und Zeitpunkt B (nach Griebmeier <i>et al.</i> , 2017).....	109
Abbildung 55: Relative Abundanz der Genexpression von typischen Genen, die an der Denitrifikation und DNRA beteiligt sind sowie ihre taxonomische Zuordnung.....	111
Abbildung 56: Gaszusammensetzung der Ko-Kultur mit den methanogenen Modellorganismen mit verschiedenen C-Substraten.	113
Abbildung 57: FISH-Mikroskopiebilder der methanogenen Kontroll-Kultur zu den verschiedenen Zeitpunkten t1 (links oben), t2 (rechts oben), t3 (links unten) und t4 (rechts unten).	114
Abbildung 58: FISH Mikroskopiebilder der Kultur mit der methanogenen Ko-Kultur nach Substratzugabe (t3 und t4).....	115
Abbildung 59: Methankonzentration in der methanogenen Ko-Kultur mit Holzpellets, in denen der pH-Wert eingestellt wurde (+) und Kultur, in welcher der pH-Wert nicht eingestellt wurde (-).	117

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Güteklassifikation für Nitrat (LAWA-Arbeitskreis, 1998).	2
Tabelle 2: Zusammensetzung des künstlich nachempfundenen Drainagewasser-Mediums.....	36
Tabelle 3: Zusammensetzung des <i>Methanobacterium</i> -Mediums (DSMZ 119).....	37
Tabelle 4: Zusammensetzung der <i>Fatty acid mixture</i> nach DSMZ 119.....	38
Tabelle 5: Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL-10 (DSMZ 320).	38
Tabelle 6: Übersicht, der in dieser Arbeit verwendeten Primer.	39
Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Sonden für die FISH-Analyse	39
Tabelle 8: Zusammensetzung des 10×-PBS-Puffers	40
Tabelle 9: Zusammensetzung der Fixierlösung.	40
Tabelle 10: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers..	40
Tabelle 11: Zusammensetzung des Waschpuffers..	40
Tabelle 12: Zusammensetzung 20× SSC, pH 6.....	41
Tabelle 13: Zusammensetzung des Einbettpuffers.....	41
Tabelle 14: Standardansatz (25 µl) für die PCR mit der PCRBIO HiFi Polymerase.....	47
Tabelle 15: Standardprogramm der Test-PCR für die 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung mit der Hifi-Polymerase.....	47
Tabelle 16: Standardansatz (25 µl) für die Phusion <i>High-Fidelity</i> -PCR.....	48
Tabelle 17: Standardprogramm der Test-PCR für die 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung mit der Fusion-Polymerase.	48
Tabelle 18: Zusammensetzung des 1x TAE-Puffers.....	49
Tabelle 19: Sequenzanzahl der Metagenom-Analyse mit Metaxa2 für die planktonische und feste Probe mit der SILVA128 Datenbank als Referenz.	90
Tabelle 20: Expressionsstärke von Genen (in TPM) von Bakterien und Pilzen, in der festen und planktonischen Phase, die für cellulolytische and hemicellulolytischer Enzyme kodieren.	98
Tabelle 21: Übersicht wichtiger Enzyme mit EC-Nummer aus verschiedenen Stoffwechselwegen und die dazugehörenden, summierten TPM-Werte aus den Ordnungen Burkholderiales, Rhodospirillales, Candidatus Accumulibacter, Rhodocyclales und Nitrosomonadales	102
Tabelle 22: Verhältnis der TPM-Werte für Schlüsselgene der Nitratreduktion zwischen Zeitpunkt A (niedrige Nitratkonzentration) und B (hohe Nitratkonzentration).....	109
Tabelle 23: Mittelwert (MW) der pH-Wert Messung für Weichholzpellets und Hartholzpellets im <i>Methanobacterium</i> -Medium nach 1, 3, 7, 22 und 33 Tagen.....	116

Abkürzungsverzeichnis

AKS	Aktivkohlesäckchen
ANAMMOX	Anaerobe Ammonium-Oxidation
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaare
cDNA	<i>copy</i> /komplementäre DNA
CDS	<i>coding sequence</i>
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
DNRA	dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium
DO	<i>dissolved oxygen</i>
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Desoxyuridintriphosphat
FA	Formamid
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
G	Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatograph
GH	glykosidische Hydrolase
HRT	hydraulic retention time
IC	Ionenchromatograph
KEGG	<i>Kyoto Encyclopedia for Genes and Genomes</i>
NCBI	<i>National Center for Biotechnological Information</i>
NGS	<i>Next Generation Sequencing</i>
n.v.	nicht vorhanden
OD	Optische Dichte
OTU	<i>operational taxonomic unit</i>
PAO	Polyphosphat-akkumulierender Organismus
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	<i>paired-end</i>
St.	Stutzen/Probenentnahmestelle
TOC	<i>total organic carbon</i>
TIC	<i>total inorganic carbon</i>
TC	<i>total carbon</i>
TPM	<i>transcripts per kilobase million</i>
V1	Tracerversuch 1
V2	Tracerversuch 2

1 Einleitung

Die Erfindung des Haber-Bosch Verfahrens zu Beginn des 20. Jahrhunderts erleichterte die Produktion von landwirtschaftlichen Düngemitteln weltweit. Somit konnte der erforderliche Nahrungsmittelbedarf für eine wachsende Weltbevölkerung gedeckt werden. Eine Folge war jedoch ein kontinuierlich steigender Eintrag von Stickstoffspezies in die Umwelt, um den landwirtschaftlichen Ertrag zu steigern (Brown, 2007). Der anthropogene Eintrag des Stickstoffs mit dem Haber-Bosch Verfahren übersteigt mit inzwischen $9,7 \times 10^{12}$ Mol pro Jahr bereits die natürliche biologische Menge an fixiertem Stickstoff, die bei rund $7,9 \times 10^{12}$ Mol pro Jahr liegt (Canfield *et al.*, 2010). Auch wenn das Haber-Bosch Verfahren viele Nahrungsgengpässe verhindert hat und 40% der Weltbevölkerung ernährt, hat der überhöhte Austrag an Stickstoffspezies auch negative Konsequenzen, insbesondere für die Umwelt und die Gesundheit des Menschen (Brown, 2007). So lag der weltweite Düngemittelverbrauch der Landwirtschaft im Jahr 2000 bei insgesamt 81,7 Millionen Tonnen, wobei Westeuropa, Indien und die USA jeweils circa 11 Mio. Tonnen verbrauchten. Der Düngemiteleinsatz in China lag mit 22,6 Mio. Tonnen sogar bei mehr als dem Doppelten und belegte somit Platz eins (Fixen & West, 2002). Aufgrund dieser hohen Menge an ausgebrachten Düngemitteln im Landwirtschaftssektor ist es den Pflanzen zum Teil nicht möglich alle Stickstoffkomponenten aufzunehmen. Ein beachtlicher Teil aus den Agrarökosystemen gelangt ungenutzt in die Umwelt und belastet diese. Überschüssige Nährstoffe gelangen vor allem in aquatische Ökosysteme, wie das Grund-, Fließ- und Binnengewässer und somit letztendlich auch in die Meere. So wird bereits bei 18% der Grundwassermessstellen in Deutschland der Trinkwasserschwellenwert von 50 mg/l Nitrat überschritten. In Gebieten mit hoher landwirtschaftlicher Nutzung ist dieser Prozentsatz mit 28% sogar noch höher (Abb. 1). Zudem ist zwischen 2011 bis 2014 kein signifikanter Trend zur Verbesserung der Wasserqualität sichtbar und der Anteil der Messstellen mit mangelnder Wasserqualität ist kaum gesunken (BMUB BMEL, 2017). Auf Grundlage der geringfügig ergriffenen Maßnahmen gegen die bedenklichen Nitratwerte im Grundwasser verklagte die Europäische Kommission im Jahr 2016 Deutschland vor dem Gerichtshof der Europäischen Union. Sie forderte Deutschland auf, den Nitratreintrag drastisch zu reduzieren, um milliardenschwere Strafzahlungen zu vermeiden (Brivio und Petsa, 2016).

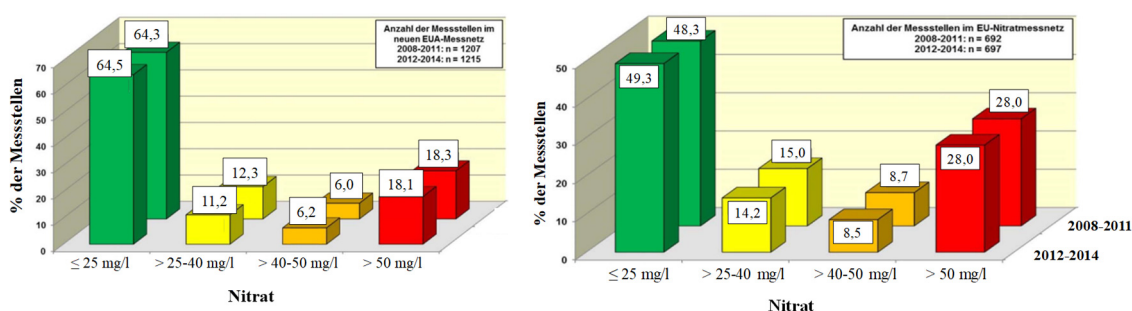


Abbildung 1: Nitratwerte der Messstellen im Europäische Umweltagentur (EUA)-Messnetz (links) und Nitratwerte von Messstellen aus Gebieten mit hoher landwirtschaftlicher Nutzung (rechts) (BMUB BMEL, 2017).

Doch selbst bei Einhaltung des Trinkwasserschwellenwertes von 50 mg/l Nitrat können bestimmte nährstoffarme Ökosysteme, wie zum Beispiel Moore, erheblich beeinträchtigt werden. So darf in Gewässern, die der chemischen Güteklassifikation I oder I-II (unbelastet bis wenig belastet) entsprechen, der Nitrat-Stickstoffgehalt ($\text{NO}_3\text{-N}$) nicht über 1,5 mg/l (entspricht 6,6 mg/l NO_3^-) liegen (Tab. 1). Gewässer mit 50 mg/l NO_3^- würden in die Gewässergüteklasse III-IV eingeordnet werden und besäßen somit den Status „sehr stark verschmutzt“ (LAWA-Arbeitskreis, 1998).

Tabelle 1: Güteklassifikation für Nitrat (LAWA-Arbeitskreis, 1998).

Stoffname	Stoffbezogene chemische Gewässergüteklasse						
	I	I-II	II	II-III	III	III-IV	IV
Nitrat-Stickstoff [mg/l N]	≤ 1	$\leq 1,5$	$\leq 2,5$	≤ 5	≤ 10	≤ 20	> 20
Nitrat [mg/l NO_3^-]	$\leq 4,4$	$\leq 6,6$	$\leq 11,1$	$\leq 22,1$	$\leq 44,3$	$\leq 88,5$	$> 88,5$

Daher ist eine Nitratbelastung von 50 mg/l für nährstoffarme Ökosysteme bereits viel zu hoch und kann zu erheblichen Schäden, z.B. in Form von Eutrophierung, führen. Die Folge sind toxische Algenblüten, gefolgt von Hypoxie und Anoxie, was schlussendlich zur Zerstörung des Lebensraums und dem Verlust der Biodiversität führt (Vitousek *et al.*, 1997). Besonders betroffen sind sensible Naturschutzgebiete in unmittelbarer Nähe zu drainierten landwirtschaftlichen Flächen, welche aufgrund der wachsenden Bevölkerung Deutschlands immer häufiger aneinander angrenzen. Daher sind zweifellos neue Lösungen erforderlich, um die Schadstoffbelastung dieser Schutzgebiete, die auch wichtige Ökosystemfunktionen innehaben, zu minimieren.

Ein Ansatz zur Kompensation zunehmender Stickstoffeinträge, aus beispielsweise landwirtschaftlichem Drainagewasser, basiert auf dem Konzept dezentraler Umweltdenitrifikationsanlagen. Bisher kommen diese Systeme vor allem in den Vereinigten

Staaten von Amerika (Christianson *et al.*, 2013; Woli *et al.*, 2010), Kanada (Blowes *et al.*, 1994; van Driel *et al.*, 2006; Elgood *et al.*, 2010; Robertson & Cherry, 1995) und Neuseeland (Long *et al.*, 2011; Schipper *et al.*, 2010; Schipper & Vojvodić-Vuković, 2001; Warneke, Schipper, Bruesewitz, McDonald, *et al.*, 2011) zum Einsatz. In anderen Teilen der Welt hingegen, fällt der Anteil an intensiven Untersuchungen von Umweltdenitrifikationsanlagen im Feldmaßstab noch eher gering aus, da sie - wenn überhaupt - meist nur im Labormaßstab getestet wurden (Bednarek *et al.*, 2010; Healy *et al.*, 2012).

1.1 Die Denitrifikation im mikrobiellen Stickstoffkreislauf

Das Konzept und die Umsetzung von Umweltdenitrifikationsanlagen basiert auf der mikrobiellen Stoffwechsellistung der Denitrifikation. Bei diesem vorwiegend heterotrophen Prozess wird Nitrat (NO_3^-) über verschiedene Intermediate - Nitrit (NO_2^-), Stickstoffmonoxid (NO), Distickstoffmonoxid (N_2O) - mit Hilfe einer geeigneten Elektronenquelle zu atmosphärischem Stickstoff (N_2) reduziert. Die Elektronenquelle kann dabei zum Beispiel eine organische Säure, wie Acetat oder Propionat, sein. Die Denitrifikation wird unter anoxischen Bedingungen aktiv, da die Mikroorganismen dann Nitrat anstelle von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor verwenden (Fuchs *et al.*, 2014).

Der komplette Denitrifikationsvorgang beinhaltet insgesamt vier enzymatische Reduktionsschritte, die von der Nitratreduktase (Nar/Nap), der Nitritreduktase (Nir), der NO-Reduktase (Nor) und der N_2O -Reduktase (Nos) katalysiert werden (Zumft, 1997). Abbildung 2 zeigt die zugrundeliegende Reaktionsgleichung und die am Denitrifikationsprozess beteiligten Gene sowie weitere Stoffwechselprozesse des Stickstoffkreislaufs.

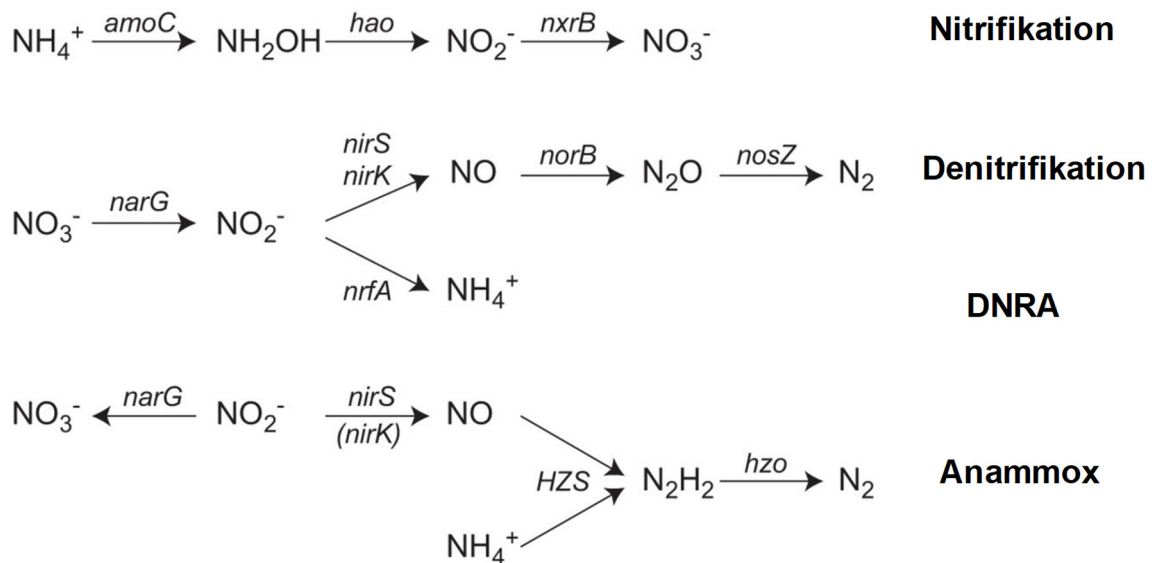


Abbildung 2: Reaktionen verschiedener Stoffwechselprozesse des Stickstoffkreislaufes, wie die Nitrifikation, Denitrifikation, die DNRA (dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium) und Anaerobe Ammoniumoxidation (Anammox). Verschiedene Gene kodieren die an den Prozessen beteiligten Enzyme. Enzyme, die am Denitrifikationsprozess beteiligt sind, werden im Text beschrieben. Weitere beteiligte Gene im Stickstoffkreislauf: *amo* kodiert für die Ammoniummonooxygenase (Ammoniumoxidation), *hao* für die Hydroxylamin-Oxidoreduktase (Ammoniumoxidation), *nrxB* für die Nitrit-Oxidoreduktase (Nitritoxidation), *nrf* für eine Nitritreduktase (Nitritreduktion) die bei der DNRA vorkommt, *HZS* (Gencluster *hzsA*, *hzsB*, *hzsC*) für die Hydrazin Synthase und *hzo* für die Hydrazin Oxidoreduktase (Anammox) (aus Dalsgaard et al., 2014).

Die Fähigkeit zur Denitrifikation beschränkt sich nicht auf spezifische, eng miteinander verwandte Mikroorganismen, sondern erstreckt sich über eine große Diversität physiologischer Gruppen aus verschiedenen Phyla und ist somit weit verbreitet (Tiedje, 1988). Daher werden zur Identifizierung von denitrifizierenden Organismen funktionelle Marker-gene herangezogen. Dies sind meist die Gene *nirS* und *nirK*, welche für die beiden Nitritreduktasen kodieren sowie das für die N_2O -Reduktase kodierende Gen *nosZ* (Ottow, 2011). Jedoch besitzen nicht alle denitrifizierenden Mikroorganismen zwingend das gesamte genetische Set, um jeden Reduktionsschritt durchführen zu können, der für eine vollständige Denitrifikation notwendig ist. So kann Mikroorganismen zum Beispiel die Nitritreduktase fehlen, wodurch sie Nitrit unmittelbar in ihrer Umgebung anreichern. Auch jedes andere Gen, das für den Denitrifikationsprozess notwendig ist, kann den Mikroorganismen fehlen. So auch jenes für die N_2O -Reduktase, wobei dann das klimarelevante Treibhausgas N_2O (300-mal so schädlich wie CO_2) als Endprodukt anfällt und in die Atmosphäre entlassen wird (Rhode, 1990). Allerdings haben Untersuchungen gezeigt, dass es auch Organismen gibt, die nur eine N_2O -Reduktase (*Nos*) besitzen und somit einen positiven Einfluss auf das Klima haben können, indem sie als potentielle N_2O -Senke fungieren (Lycus et al., 2017). Die Art der Nitritreduktase (*Nir*) hat zudem einen Einfluss darauf, ob eine vollständige Denitrifikation durchgeführt wird oder nicht. Organismen mit der *NirS* Reduktase besitzen

häufiger das *nosZ* als auch das *nor* Gen, wodurch eine vollständige Denitrifikation zu Stande kommen kann (Graf *et al.*, 2014). Neben dem Fehlen oder Vorhandensein bestimmter Gene haben auch Umweltbedingungen wie der pH-Wert, der Sauerstoffgehalt oder die Temperatur einen Einfluss auf die Genexpression im Denitrifikationsprozess und spielen dadurch eine entscheidende Rolle, ob eine Denitrifikation nur partiell oder vollständig durchgeführt wird (Schinner & Sonnleitner, 1996).

1.2 Celluloseabbau

Der mikrobielle Abbau der Kohlenstoffquelle ist für eine effiziente und gut funktionierende Denitrifikationsanlage von entscheidender Bedeutung. Häufig kommen in solchen Anlagen Holzprodukte zum Einsatz, welche vorrangig aus Hemicellulose, Cellulose und Lignin bestehen und deren große Moleküle für viele Mikroorganismen nicht direkt verwertbar sind. So ist der Celluloseabbau ein wichtiger Schritt, durch welchen das hartnäckige und schwer zu verarbeitende Cellulosemolekül in kleinere Einheiten zerlegt und dadurch für eine Vielzahl an Mikroorganismen zugänglich gemacht wird.

Zur Zersetzung der kristallinen Cellulose ist der Einsatz mehrerer Enzymarten notwendig, die allgemein Cellulasen genannt werden. Diese werden sekretiert und agieren dann synergistisch am Celluloseabbau (Wilson, 2011). Cellulasen werden vorrangig nach ihrem Wirkmechanismus katalogisiert. Endo-1,4- β -glukanasen spalten die innere Bindung im Cellulosemolekül, wohingegen Exo-1,4- β -glukanasen auf die reduzierenden oder nicht reduzierenden Enden der Cellulosekette wirken. Zuletzt kommen dann sogenannte β -Glukosidasen zum Einsatz, welche Cellobiose in Glukose spalten und die Kohlenstoffquelle erst für ein weites mikrobielles Spektrum verfügbar machen (Horn *et al.*, 2012). Die meisten Enzyme mit einer cellulolytischen Aktivität stellen glykosidische Hydrolasen (GHs) dar und werden in verschiedene Familien klassifiziert. So gibt es mehrere GH-Familien, in denen sich vorrangig Enzyme mit cellulolytischer Wirkung befinden oder auch jene mit einer vorwiegend hemicellulolytischen Wirkweise. Denn auch für den Abbau von Hemicellulose wird ein komplexes Set verschiedener Enzyme benötigt, wie Endoxylanasen, Endomannanasen, Xylosidasen, Glukosidasen, Arabinosidasen, Galaktosidasen, Mannosidasen und Glucuronidasen, die gemeinsam agieren, um das komplexe Molekül zu zerlegen (Lopez-Ponnada *et al.*, 2017).

1.3 Umwelddenitrifikationsanlagen – Aufbau und Langlebigkeit

Umwelddenitrifikationsanlagen haben den Vorteil, dass sie ohne großen Aufwand im Feld über ein Grabensystem installiert werden können (Abb. 3). Zuerst wird ein definiertes Volumen ausgehoben und mit einer Kunststoffolie ausgekleidet. Anschließend wird das Becken mit einer organischen Kohlenstoffquelle befüllt. Dabei kommen meist kostengünstige und leicht erhältliche Holzabfallprodukte, wie zum Beispiel Holzhackschnittel oder Sägespäne, zum Einsatz. Das befüllte Becken wird dann mit Folie zugedeckt und mit Mutterboden aufgefüllt. Das nitratbelastete Wasser wird über einen Zufluss in das Becken eingeleitet und strömt durch das Becken. Dabei wird das Nitrat durch eine komplexe Gemeinschaft an Mikroorganismen, die die organische Kohlenstoffquelle als Elektronendonator und das Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor verwendet, zu atmosphärischem N_2 reduziert. Das nitratarme Wasser wird anschließend auf der anderen Seite des Beckens wieder der Umwelt zugeführt. Ein vorteilhafter Aspekt bei der Entwicklung einer Umwelddenitrifikationsanlage kann die Berücksichtigung eines Bypass-Rohres sein, das bei Ereignissen mit hohem Abflusswerten überschüssiges Wasser um die Anlage herumleitet und so einer Anlagenüberlastung vorbeugt. Darüber hinaus sollte die Größe der Anlage sorgfältig auf die jeweilige Situation in Bezug auf das zu entwässernde Gebiet und die klimatischen Bedingungen wie Niederschläge und Dürreperioden abgestimmt werden. Generell sind viele Modifikationen für diese Anlagen denkbar, wie zum Beispiel die Gestaltung des Zu- und Abflusses, die Errichtung eines vorgeschalteten Filterbeckens oder die Befüllung des Beckens mit (unterschiedlichen) C-Quellen, um somit Anpassungen an die vorherrschenden Umgebungsbedingungen möglich zu machen (van Driel *et al.*, 2006).

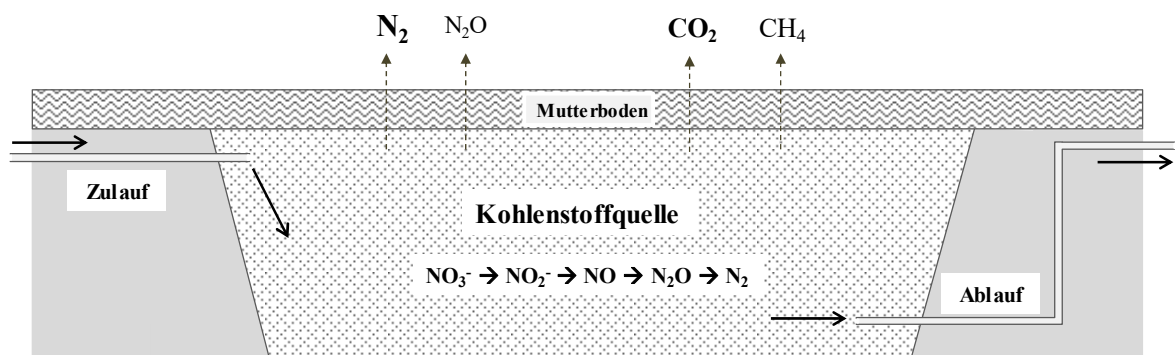


Abbildung 3: Skizze einer Umwelddenitrifikationsanlage. Nitrathaltiges Wasser fließt auf der einen Seite in das Becken, welches von einer mikrobiellen Gemeinschaft denitrifiziert wird. Das von Nitrat gereinigte Wasser wird schließlich auf der anderen Seite des Beckens entlassen. Der verhältnismäßige Größenanteil der produzierten und entlassenen Gase wird in der Abbildung durch die Schriftgröße und -dicke veranschaulicht.

Da der Einsatz dieser Anlagen im Freiland erfolgt, ist es wünschenswert, dass diese Systeme autark und robust über einen langen Zeitraum wartungsarm laufen. Für die Langlebigkeit von Denitrifikationsanlagen sind mehrere Parameter entscheidend. Ein wichtiger Faktor ist die Art und Menge der verwendeten Kohlenstoffquelle und die damit verbundene C-Verfügbarkeit. So war die Langlebigkeit in einem Laborexperiment (2,4 m³) von Saliling *et al.* (2007), bei dem Weizenstroh verwendet wurde, nur in etwa halb so groß wie bei der Verwendung von Holzhackschnitzeln (0,5 vs. 1,2 Jahre). Dies wurde durch den deutlich höheren Massenverlust von Stroh (37,7%) im Vergleich zu Holzhackschnitzeln (16,2%) bestimmt (Saliling *et al.*, 2007).

Neben der Menge und Art der Kohlenstoffquelle spielt auch die Wassersättigung bei der Langlebigkeit dieser Anlagen eine Rolle. Es ist anzunehmen, dass es zu einer schnelleren Zersetzung des organischen Materials kommt, wenn es zeitweise nicht mit Wasser bedeckt ist und so mit Sauerstoff in Kontakt kommt. Die Zersetzungsrate sollte somit geringer ausfallen, wenn die Kohlenstoffquelle dauerhaft mit Wasser gesättigt ist. Diese Hypothese wird von Untersuchungen in einer sogenannten *denitrification wall* (engl. für Denitrifikationswand) von Moorman *et al.* (2010) bestätigt. Über neun Jahre hinweg wurde der Holzverlust in verschiedenen Tiefen der Anlage berechnet. Es konnte festgestellt werden, dass ein signifikant geringerer Gewichtsverlust des Holzes in tieferen Bereichen mit einer dauerhaften Wassersättigung (< 13%) stattfand, als in den oberen Bereichen der Anlage, in denen es häufiger zu einer Sauerstoffexposition kam (bis zu 75% Gewichtsverlust). So unterschied sich auch die daraus errechnete Halbwertszeit deutlich zwischen den tieferen Bereichen (36,6 Jahre) und den oberen Bereichen (4,6 Jahre) der Anlage (Moorman *et al.*, 2010). Eine zuverlässige Vorhersage über die Langlebigkeit der Kohlenstoffquelle in Umweltdenitrifikationsanlagen ist somit schwierig, jedoch wirkt sich eine dauerhafte Bedeckung des Materials mit Wasser vorteilhaft aus.

1.4 Biotische und abiotische Einflussfaktoren auf die Nitratentfernungseffizienz

Mehrere biotische und abiotische Faktoren und deren Wechselwirkungen sind verantwortlich für eine erfolgreiche und zuverlässige Nitratentfernung in Umweltdenitrifikationsanlagen. Abbildung 4 zeigt eine Übersicht der wichtigsten Parameter, die einen Einfluss auf die Denitrifikationsleistung haben. In den folgenden Abschnitten wird auf diese Einflussfaktoren genauer eingegangen und mögliche Wechselwirkungen erläutert.

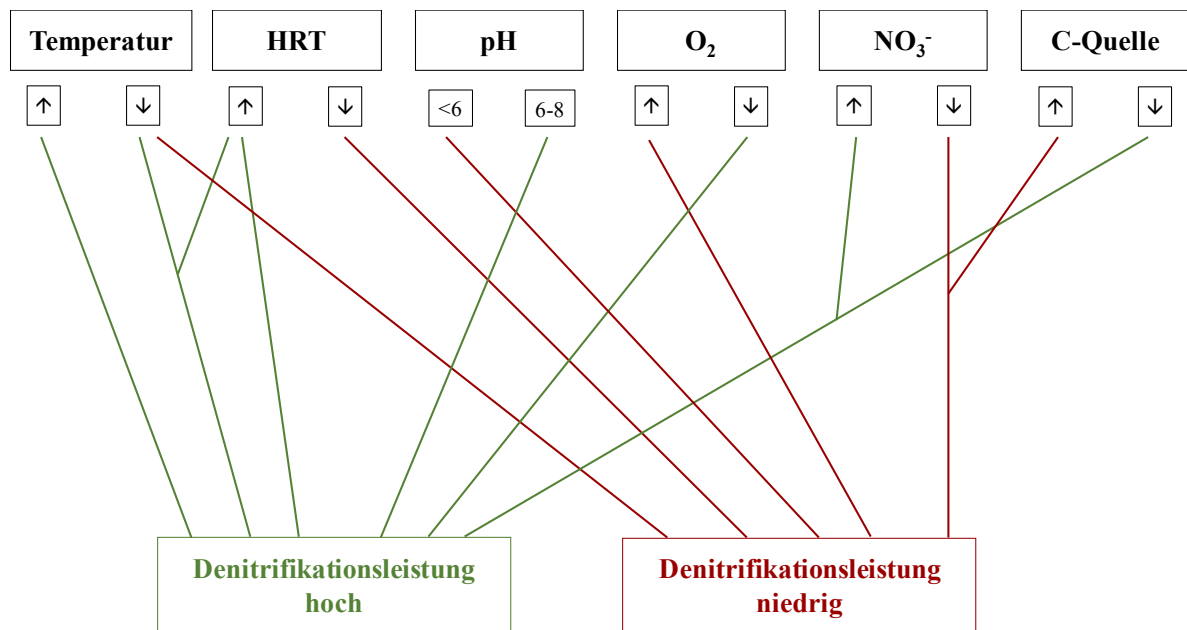


Abbildung 4: Einflussfaktoren auf die Denitrifikationsleistung in Umweltdenitrifikationsanlagen. Manche Faktoren müssen gemeinsam auftreten, um auf die Denitrifikationsleistung einzuwirken, wie zum Beispiel die Temperatur. Höhere Temperaturen beeinflussen die Denitrifikationsleistung positiv, bei niedrigen Temperaturen hingegen muss eine längere hydraulische Verweilzeit bestehen, um eine gute Denitrifikationsleistung zu erhalten. Abk.: HRT = hydraulische Verweilzeit (engl. für *Hydraulic retention time*).

Kohlenstoffquelle

Die in Umweltdenitrifikationsanlagen eingesetzte Kohlenstoffquelle ist ein häufig untersuchtes Forschungsgebiet und ein wichtiger Faktor für deren erfolgreichen und nachhaltigen Einsatz. Der Großteil der Untersuchungen fokussierte sich auf Substrate aus Holz, insbesondere Holzhackschnitzel (Weich- und Hartholz) und Sägespäne. Jedoch gibt es auch Studien, die ausgefallener Substrate wie Zeitungs- oder Kartonpapier, Baumwolle, Nussschalen oder auch Meeresalgen als Kohlenstoffquelle untersucht haben (Volkita *et al.*, 1996; Volkita *et al.*, 1996; Díaz *et al.*, 2003; Greenan *et al.*, 2006; Ovez *et al.*, 2006).

Die meisten Untersuchungen ergaben, dass labilere Kohlenstoffquellen wie Stroh, Maiskolben oder Grünabfälle eine bessere Nitratentfernungsrate bewirken als die meisten Holzprodukte. Allerdings geht mit diesen Kohlenstoffquellen meist auch ein höheres Vorkommen an negativ wirkenden Nebenprodukten einher, wie erhöhte Treibhausgasemission, Nitritakkumulation oder Anreicherung von organischem Kohlenstoff (TOC, engl. für *total organic carbon*). Daher empfehlen viele Untersuchungen Holzprodukte auf Basis von Weichholz als Kohlenstoffquelle für Freilandanlagen aufgrund der besser zu handhabenden Entstehung von Nebenprodukten. Trotz der geringeren Nitrateliminierungsrate sind sie zuverlässiger und langlebiger als labilere Kohlenstoffquellen

und damit für den Einsatz im Freiland besser geeignet (Cameron & Schipper, 2010; Gibert *et al.*, 2008; Greenan *et al.*, 2006; Griebmeier *et al.*, 2019; Saliling *et al.*, 2007; Warneke, Schipper, Matiasek, *et al.*, 2011).

Mikrobielle Zusammensetzung

Neben der Kohlenstoffquelle trägt auch die mikrobielle Zusammensetzung mit Schlüsselorganismen wesentlich zur erfolgreichen Funktionalität von Umwelt-denitrifikationsanlagen bei, wobei der aktuelle Forschungsstand hierzu bislang noch gering ausfällt. Eine detailliertere Kenntnis über die mikrobielle Diversität in diesen Anlagen kann jedoch viele Hinweise zur Optimierung der Denitrifikationsleistung liefern und Informationen über mögliche negative Nebeneffekte, wie der Treibhausgasproduktion, geben. Insbesondere Archaea sind in diesen Systemen wenig erforscht, selbst wenn gerade methanogene Organismen, welche zu dieser Domäne gehören, durchaus in diesen Anlagen auftreten und zur Treibhausgasemission beitragen können.

Viele Studien untersuchten mit Hilfe der funktionellen Gene *nirS*, *nirK* und *nosZ* die mikrobielle Zusammensetzung in Laborreaktoren mit verschiedenen Kohlenstoffsubstraten. Dabei stellten sie fest, dass Holzhackschnitzel von Kiefern oder Eukalyptusbäumen optimale Bedingungen für Denitrifizierer liefern, im Vergleich zu Maiskolben oder Grünschnitt, bei denen der organische Kohlenstoff vorrangig von Mikroorganismen verbraucht wurde, die keine Denitrifikation durchführen (Warneke, Schipper, Matiasek, *et al.*, 2011). Ähnliches konnte auch von Healy *et al.* (2015) beobachtet werden (Healy *et al.*, 2015).

Diese Studien liefern Einblicke, welchen Einfluss das Kohlenstoffsubstrat auf die mikrobielle Zusammensetzung haben kann und abhängig davon auf die Denitrifikationsleistung. Sie zeigen jedoch nicht, welche Spezies genau am Denitrifikationsprozess oder am Celluloseabbau beteiligt sind. Insbesondere die mikrobielle Einflussnahme auf den Abbau des Kohlenstoffsubstrats wird häufig vernachlässigt und inwieweit Pilze und/oder Bakterien als Hauptakteure der Zersetzung pflanzlicher Biopolymere fungieren. Die Identifizierung mikrobieller Schlüsselorganismen ist jedoch ein wichtiger Bestandteil bei der Charakterisierung dieser Anlagen, da sie wesentlich zur Optimierung dieser Systeme beitragen können.

Hydraulische Verweilzeit

Die hydraulische Verweilzeit (HRT, engl. für *hydraulic retention time*) des Wassers in Umwelddenitrifikationsanlagen ist für deren Leistungsfähigkeit von enormer Bedeutung. Grundsätzlich muss eine bestimmte Aufenthaltszeit des Wassers in der Anlage gegeben sein, damit der gesamte Denitrifikationsprozess abgeschlossen werden kann und das Risiko einer Entstehung von potentiell toxischen Intermediaten wie NO_2^- oder N_2O auf ein Minimum reduziert wird (Fujinuma *et al.*, 2011). Jedoch kann auf der anderen Seite auch eine zu lange HRT zu unerwünschten Nebenprozessen führen, wie Methan (CH_4) (Lepine *et al.*, 2015; Woli *et al.*, 2010).

Lepine *et al.* (2015) verglichen in einer Untersuchung verschiedene HRTs zwischen 6,6 und 55 Stunden und kamen zu dem Schluss, dass eine HRT von 24 Stunden zu einer 65% N-Entfernungseffizienz und zu einer N-Entfernungsrate von immerhin $18 \text{ g N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ führt. Die Nitratentfernungseffizienz könnte bei einer längeren HRT noch deutlich höher ausfallen, jedoch würde das wiederum N-limitierende Bedingungen hervorrufen und damit eine Sulfatreduktion begünstigen (Lepine *et al.*, 2015).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die optimale HRT ein Schlüsselfaktor für die Leistungsfähigkeit von Umwelddenitrifikationsanlagen ist, jedoch in jeder Feldstudie erneut für sich betrachtet werden muss. Allgemein stellt sie einen Balanceakt zwischen optimaler Nitratentfernungseffizienz und minimalem Schadstoffaustausch dar, was bedeutet, dass die Entfernung eines Schadstoffs (Nitrat) zur Produktion eines neuen Schadstoffes (z.B. CH_4 , H_2S) führen würde.

Sauerstoff, Temperatur, pH-Wert

Neben der hydraulischen Verweilzeit haben auch weitere abiotische Parameter einen Einfluss auf die Nitratentfernungsleistung solcher Anlagen, wie der Sauerstoffgehalt, die Temperatur und der pH-Wert. Die Sauerstoffkonzentration, insbesondere der gelöste Sauerstoff (DO, engl. für *dissolved oxygen*) bestimmt zusammen mit der Kohlenstoff- und Nitratverfügbarkeit die Denitrifikationskinetik. So hemmt Sauerstoff die Synthese der für die Denitrifikation benötigten Enzyme, insbesondere die Enzyme Nar und Nir (Körner & Zumft, 1989). Zwar kann unter gewissen gelösten Sauerstoffkonzentrationen (0,2 bis 0,5 mg/l DO) noch eine Denitrifikation stattfinden, jedoch nur zu einem Ausmaß von 33% bzw. 17% der maximalen Denitrifikationsrate (Metcalf & Eddy *et al.*, 2003). Auch Christianson *et al.* (2013) konnten aufgrund der DO-Konzentration die schwache Performance einer ihrer Denitrifikations-

reaktoren erklären, da die Konzentration des gelösten Sauerstoffs im einfließenden Wasser zwischen 3-6 mg/l betrug und der Schwellenwert von 0,5 mg/L DO bis zum Auslass der Anlage meist nicht unterschritten wurde (Christianson *et al.*, 2013).

Ein weiterer abiotischer Faktor, der in vielen Studien als limitierender Faktor für Umweltdenitrifikationsanlagen angesehen wird, ist die Temperatur. Allgemein beträgt die optimale Temperatur für denitrifizierende Organismen in Böden zwischen 10 bis 35°C (Gisi, 1997) und es ist daher nicht verwunderlich, dass jahreszeitliche Temperaturschwankungen einen Einfluss auf die Nitratabbauraten haben können, wie es auch Ghane *et al.*, (2015) beobachtet haben. Auch Halaburka *et al.* (2019) zeigten eine positive Abhängigkeit der Nitratentfernung gegenüber höheren Temperaturen, was eine kostengünstigere und effizientere Nutzung dieser Anlagen in wärmeren Klimazonen befürwortet (Halaburka *et al.*, 2019). Allgemein untersuchten mehrere Studien den Einfluss dieses Parameters auf die Anlagenleistung im Labormaßstab. Dabei wurde unter anderem eine 1,5-fach höhere Nitratentfernungsraten in Reaktoren beobachtet, die bei 23,5°C bzw. 27,1°C inkubiert wurden als in Reaktoren mit 14°C bzw. 16,8°C Inkubationstemperatur (Cameron & Schipper, 2010; Warneke, Schipper, Matiassek, *et al.*, 2011). Weitere Studien bestätigten diese Beobachtung und stellten sogar eine bis zu dreimal höhere Denitrifikationsrate bei 25°C bis 32°C fest als bei 14°C (Díaz *et al.*, 2003; Michal Volokita *et al.*, 1996). Jedoch kamen nicht nur Untersuchungen im Labormaßstab zu übereinstimmenden Schlussfolgerungen, auch Felduntersuchungen beobachteten den Zusammenhang einer besseren Nitratentfernungseffizienz bei höheren Temperaturen (Addy *et al.*, 2016; Robertson *et al.*, 2005), die einerseits mit einer höheren Stoffwechselleistung der Mikroorganismen und andererseits mit dem geringeren Gehalt an gelöstem Sauerstoff in wärmeren Wasser zusammenhängen kann (Christianson *et al.*, 2013; Skerman & MacRae, 1957). Wenn Denitrifikationsanlagen auch bei niedrigen Wassertemperaturen erfolgreich betrieben werden sollen, bedarf es einer längeren HRT, womit Robertson *et al.* (2005) auch die erfolgreiche Nitratentfernungseffizienz eines Untersuchungsstandortes erklärten, bei dem die Wassertemperatur nur 3 bis 6°C betrug (Robertson *et al.*, 2005). Jedoch kann dies eine Herausforderung für die Optimierung der Anlagen darstellen, da beide Faktoren - lange HRT, niedrige Temperatur - in gemäßigten Breiten im Winter selten gemeinsam auftreten.

Ein weiterer Einflussfaktor ist der pH-Wert des einfließenden Wassers. Der optimale pH-Wert für denitrifizierende Organismen liegt zwischen 6 bis 8 (Gisi, 1997). Untersuchungen zeigten, dass ein niedrigerer pH-Wert generell zu einer verringerten Denitrifikationsperformance führen kann und zudem vermehrt N₂O als Endprodukt anfallen

kann, was die Performance der Anlage negativ beeinflussen würde (Saleh-Lakha *et al.*, 2009; Šimek & Cooper, 2002). Über die direkte Einflussnahme des pH-Wertes auf die Leistung in Umwelddenitrifikationsanlagen ist bisher nur wenig bekannt. Intensivere Forschungsarbeit auf dem Gebiet könnte weitere Erkenntnisse bringen, da es ein ausschlaggebender Faktor für die Denitrifikationsleistung sowie für die Bildung unerwünschter Neben- oder Zwischenprodukte zu sein scheint.

1.5 Mögliche Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte beim Einsatz von Umwelddenitrifikationsanlagen

Neben der Denitrifikation können in Umwelddenitrifikationsanlagen auch eine Reihe anderer mikrobieller Prozesse ablaufen, die deren Funktionalität und Umweltverträglichkeit mindern und negativ beeinflussen können. Das Auftreten und die Wechselwirkung gewisser abiotischer und biotischer Faktoren fördert bestimmte Prozesse, die in Folge zu unerwünschten Nebenprodukten führen. Abbildung 5 zeigt einige Faktoren und deren Einflussnahme auf die Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte.

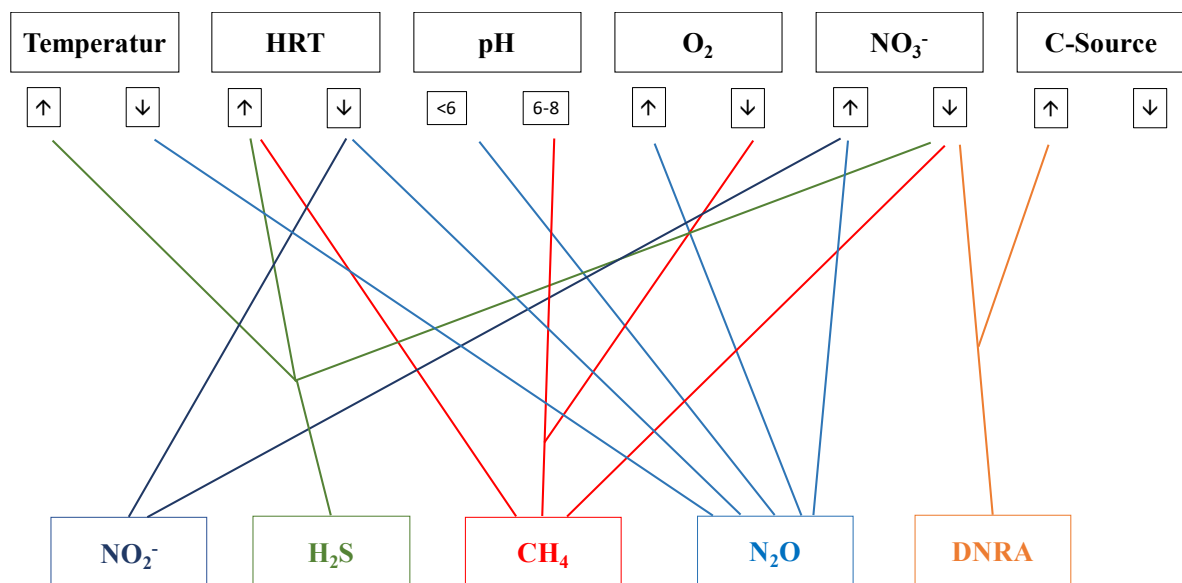


Abbildung 5: Einflussfaktoren und deren Wechselspiel auf die Entstehung potentiell unerwünschter Nebenprodukte.

Für die Nachhaltigkeit und den Erfolg solcher Anlagen ist es wichtig, dass der positive Effekt der Nitratentfernung überwiegt und nicht durch eine übermäßige Produktion von umweltschädlichen Nebenprodukten minimiert oder geschmälert wird.

Treibhausgase

So gut Denitrifikationsanlagen zur Beseitigung von überschüssigem Nitrat sein können, so gibt es andererseits auch potentielle Nebenwirkungen, wie die Bildung von Treibhausgasen. Neben dem extrem klimaschädlichen Treibhausgas N_2O , welches wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, durch eine unvollständige Denitrifikation entsteht, kann noch ein weiteres Treibhausgas - Methan (CH_4) - gebildet werden, das 25-mal klimaschädlicher ist als CO_2 (Forster *et al.*, 2007). Denn das zerfallende Kohlenstoffmaterial sowie vorherrschende Fermentationsprozesse schaffen optimale Bedingungen für methanogene Organismen, die sich am Ende der Kette des anaeroben Stoffabbaus befinden. Die aus der Fermentation entstehenden Acetat- oder Methylsubstrate sowie H_2 und CO_2 werden von diesen Mikroorganismen zu Methan umgesetzt (Fuchs *et al.*, 2014). In einem anoxischen Lebensraum, wie in einer Umweltdenitrifikationsanlage, könnten denitrifizierende und methanogene Organismen potenziell um die gleichen Substrate wie Acetat oder H_2 konkurrieren. Allerdings erzielt die Denitrifikation eine höhere Energieausbeute als die Methanogenese, wodurch bei Verfügbarkeit eines günstigeren Elektronenakzeptors (wie Nitrat) die Elektronen vorrangig im Denitrifikationsprozess verwendet werden und die Methanogenese somit unterdrückt wird. Eine weitere Hypothese versucht die Unterdrückung der Methanogenese bei Anwesenheit von Nitrat aufgrund der Zwischenprodukte der Denitrifikation (NO_2^- , NO , N_2O) zu erklären, da diese toxische Auswirkungen auf methanogene Organismen zu haben scheinen (Klüber & Conrad, 1998; Roy & Conrad, 1999; Tugtas & Spyros, 2006). Neben diesen Beobachtungen gibt es jedoch auch Studien, die zeigen, dass eine simultane Methanogenese und Denitrifikation unter bestimmten Bedingungen stattfinden kann (Andalib *et al.*, 2011). So wurde auch in manchen Umweltdenitrifikationsanlagen eine Methanproduktion beobachtet, jedoch scheint hierbei vor allem die Art der Kohlenstoffquelle der entscheidende Parameter zu sein. Die Bildung von CH_4 erfolgte vorzugsweise in Reaktoren, die mit Maiskolben, Grünabfällen oder, in einer anderen Studie, mit Karton und Gerstenstroh befüllt waren. In Reaktoren mit Holzhackschnitzeln hingegen wurde keine oder nur eine geringe Methanproduktion festgestellt (Healy *et al.*, 2012; Warneke, Schipper, Matiasek, *et al.*, 2011).

Nitritakkumulation

Auch die Entstehung von Nitrit (NO_2^-) als ein Nebenprodukt in Umweltdenitrifikationsanlagen ist äußerst unerwünscht, da Nitrit eine höhere Toxizität als Nitrat aufweist und fatale Folgen für viele aquatische Lebewesen hätte (Kocour Kroupová *et al.*, 2018). Es wirkt

zudem hemmend auf viele, vor allem heterotrophe Mikroorganismen und könnte somit auch Denitrifizierer und die Denitrifikationsleistung solcher Anlagen inhibieren (Glass & Silverstein, 1998; Görner & Hübner, 2013). Es gibt viele Erklärungen, warum während einer Denitrifikation und damit auch in Denitrifikationsanlagen eine Anreicherung von NO_2^- auftreten kann. Eine Möglichkeit kann ein unvollständiger Denitrifikationsprozess sein, der auftritt, wenn entweder die NO_3^- -Konzentration zu hoch oder die HRT im Becken nicht lang genug ist. Das Nitrit wird dann am Abfluss entlassen, bevor es weiter reduziert werden kann (Shen *et al.*, 2013; Michal Volokita *et al.*, 1996). Zudem kann auch die Art der C-Quelle eine Nitritakkumulation auslösen. Rocher *et al.* (2014) beobachteten in Laborstudien nur eine geringe Akkumulation von Nitrit (0,05 bis 0,1 g N- NO_2^- /g N- NO_3^-), wenn Alkohole wie Methanol oder Ethanol als C-Quelle dienten im Vergleich zu Kohlenhydrate oder organischen Säuren (0,2 bis 0,3 g N- NO_2^- /g N- NO_3^-) (Rocher *et al.*, 2015). Dass die Art der Kohlenstoffquelle einen Einfluss auf die Akkumulation von Nitrit hat, wurde auch von Rijn *et al.* (1996) festgestellt, jedoch in konträrer Weise. Die Autoren erklärten eine Nitritakkumulation mit einer Limitierung des Elektronendonors, was die Bevorzugung des thermodynamisch günstigeren Elektronenakzeptors - Nitrat und nicht Nitrit - bewirken würde (Van Rijn *et al.*, 1996).

Neben der Kohlenstoffquelle als einflussnehmenden Faktor bewirkt auch die mikrobielle Zusammensetzung, die sich zumindest teilweise aus der jeweiligen C-Quelle ergibt, das Auftreten von Nitrit. So gibt es mehrere Organismen, die nur eine Nitratreduktase (Nar) besitzen und die Reduktion daher mit Nitrit als Endprodukt beenden. Kürzlich haben Lycus *et al.* (2017) bei Isolierungen von Mikroorganismen aus Umweltproben gezeigt, dass diese Organismen mitunter sogar die größte Gruppe darstellen (Lycus *et al.*, 2017). Neben den Organismen, die nur eine Nitratreduktase besitzen, gibt es auch jene, die durchaus das genetische Potential zu einem vollständigen Denitrifikationsprozess besitzen, jedoch zwischenzeitlich trotzdem Nitrit akkumulieren, bevor sie mit dem nächsten Schritt fortfahren (Betlach & Tiedje, 1981). Wenn sich viele dieser Organismen in Umwelddenitrifikationsanlagen ansiedeln, könnte die Performance signifikant sinken, da ökotoxisches Nitrit entstehen und in die Umwelt gelangen würde (Grießmeier *et al.*, 2019).

Dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA)

Einen weiteren zur Denitrifikation konkurrierenden mikrobiellen Stoffwechselprozess stellt die dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) dar. Hierbei wird Nitrat nicht zu molekularem N_2 reduziert, sondern über Nitrit zu Ammonium (NH_4^+). Ein

Nährstoffaustausch ist die Folge, da sich ein erhöhter Ammonium- wie auch Nitratgehalt umweltwirksam auswirkt und eine Eutrophierung begünstigen würde. Daher ist eine Frage bei der Erforschung von Umweltdenitrifikationsanlagen häufig, ob die Nitratentfernung in den Becken wirklich auf eine Denitrifikation zurückzuführen ist oder durch DNRA zu Stande kommt, da beide Prozesse potentiell um dieselben Substrate konkurrieren und ähnliche Bedingungen benötigen: Anoxie, die Anwesenheit von Nitrat und eine organische Kohlenstoffquelle. Jedoch scheint es, dass vor allem das Verhältnis von organischem Kohlenstoff (Elektronendonator) zu Nitrat (Elektronenakzeptor) darüber entscheidet, ob eine Denitrifikation oder eine DNRA eintritt. Eine hohe Verfügbarkeit an organischem Kohlenstoff im Verhältnis zu Nitrat (hohes C_{org}/NO_3^- Verhältnis) soll die Reduktion von Nitrat zu Ammonium begünstigen, wohingegen bei Umweltbedingungen mit einem niedrigen C_{org}/NO_3^- Verhältnis - folglich ein Nitratüberschuss - eher die Denitrifikation überwiegt (Rütting *et al.*, 2011; Tiedje, 1988). Somit beeinflusst nach dieser Theorie vor allem die Kohlenstoffquelle und noch wichtiger, die Menge an freigesetztem organischen Kohlenstoff, ob eine Denitrifikation oder eine DNRA stattfindet.

Bisher scheint die DNRA für viele Freilandanlagen keine problematische Angelegenheit zu sein, da mehrere Studien belegten, dass die Nitratentfernung vorrangig durch die Denitrifikation erfolgte und die DNRA in Umweltdenitrifikationsanlagen eher eine untergeordnete Rolle spielt (Gibert *et al.*, 2008; Healy *et al.*, 2015; Long *et al.*, 2011; Warneke, Schipper, Matiasek, *et al.*, 2011). Einige Studien zeigten jedoch, dass bei Auftreten einer DNRA die Kohlenstoffquelle wieder ein wichtiger Einflussfaktor ist. Gibert *et al.* (2008) beobachteten in Reaktoren, die mit Weidematerial oder Mulch gefüllt waren, dass 8% bzw. 9% der Nitratentfernung der DNRA zugeschrieben werden konnte, wohingegen es bei anderen Materialien weniger als 5% waren (Gibert *et al.*, 2008)(Grießmeier *et al.*, 2019).

1.6 Untersuchungsgebiet Moor „Mürmes“

Das Moor „Mürmes“ liegt im Landkreis Daun in der Vulkaneifel (Deutschland) und dient der vorliegenden Arbeit als Modellökosystem zur Untersuchung des Pilotprojekts einer Umweltdenitrifikationsanlage. In dem durch vulkanische Aktivität im Jahr 10550 v. Chr. entstandenen Maarkessel bildete sich mit der Zeit ein durch Grundwasser gespeistes Flachmoor mit ausgedehnten Schwingrasenflächen (Abb. 6). Neben dem regelmäßigen Torfabbau ab dem 19. Jahrhundert bis zum zweiten Weltkrieg, wurden in den 1960er Jahren am Rand des nördlichen/nördwestlichen Teil des Moores im Rahmen der intensiven landwirtschaftlichen Nutzung Drainagen verlegt. Insbesondere vier Drainagen (D6, D7, D8, D9)

entwässern bis heute insgesamt 19 ha landwirtschaftlich genutzte Äcker, wovon die Drainage D7 die größte Fläche von 8,9 ha entwässert, auf welcher vorrangig Mais und Weizen angebaut wird.

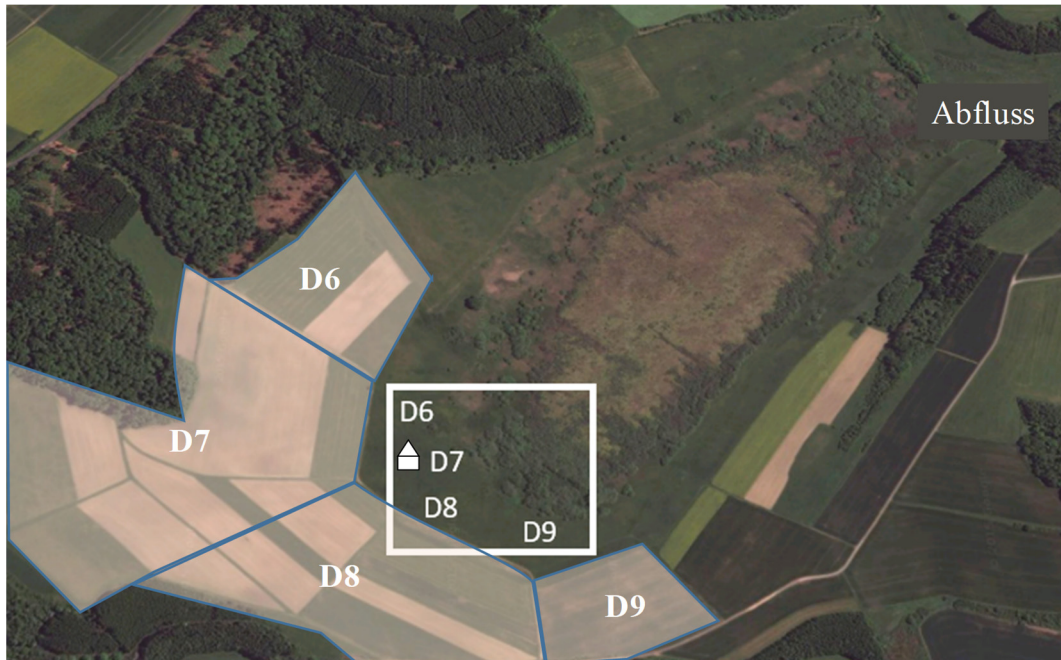


Abbildung 6: Luftaufnahme vom Moor „Mürmes“. Die landwirtschaftlich genutzten Einzugsgebiete und die Drainagen D6 bis D9 sowie deren Austrittspunkt an der Erdoberfläche kurz vor dem Übergang zum Moorkessel, sind skizziert, sowie die Lage der späteren Online-Monitoring-Station (Häuschen) (Quelle: Google Maps).

Das aufgrund von Düngung nährstoffreiche Drainagewasser tritt kurz vor dem Moorkessel in den Brachwiesen an die Erdoberfläche, fließt anschließend direkt in das oligotrophe Ökosystem ein und führt hier zu einer Eutrophierung. Im Jahre 1975 wurde das Gebiet als Naturschutzgebiet ausgewiesen, jedoch veränderte dies nicht die problematische Situation der Drainagen und deren Nährstoffbelastung für das Moor (Forst *et al.*, 1997).

1.7 Problemstellung und Stand der Forschung

In einer dieser Arbeit vorangestellten Untersuchung (Masterarbeit) wurde seit Dezember 2014 einmal monatlich der Nährstoffgehalt am Austritt der Drainagen D6, D7, D8, D9 analysiert. Dabei zeigte sich, dass der Nitratgehalt meist über dem Trinkwasserswellenwert von 50 mg/l Nitrat und vor allem deutlich über dem Grenzwert für unbelastetes Wasser (6,6 mg/l Nitrat) lag, insbesondere an den Drainagen D7 und D8 (Abb. 7B) (Grießmeier, 2015).

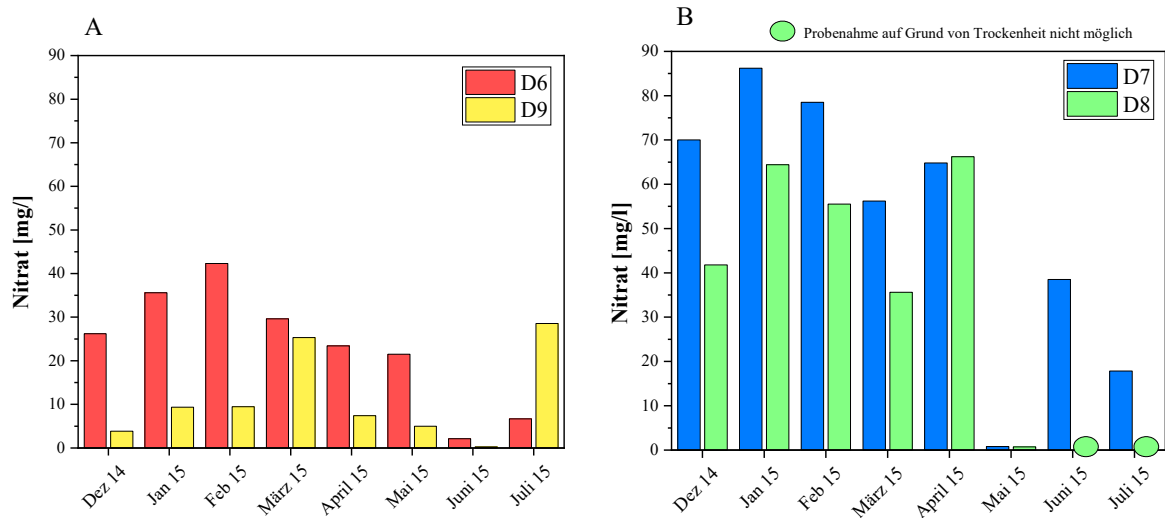


Abbildung 7: Nitratkonzentration an den Austrittsstellen der Drainagen D6 und D9 (A) und D7 und D8 (B). Im Juni und Juli 2015 war eine Probenahme an der Drainage D8 aufgrund von Trockenheit nicht möglich.

Aufgrund der hohen Nitratbelastung des Moores kam es zu der Entscheidung, an den Drainagen D7 und D8 jeweils eine Umweltdenitrifikationsanlage zu errichten. Im Vorfeld wurden in Laborreaktoren drei verschiedene Kohlenstoffquellen - Stroh, Holzpellets und Holzhackschnitzel - auf ihre Denitrifikationsleistung und mikrobielle Zusammensetzung hin untersucht und zudem getestet, ab welcher Nitratkonzentration der jeweilige Reaktortyp seine Auslastung erfährt. Um dies zu testen, wurde die Nitratzugabe um das Zweifache, Fünffache, Zehnfache und zuletzt 20-fache des Nitratstartwerts von 1,17 mM (Stand: D7 Dez. 2014) kontinuierlich angehoben.

Wie in Kapitel 1.4.1 beschrieben, beeinflusst die Art der Kohlenstoffquelle die Nitratentfernungseffizienz, die Produktion potentiell schädlicher Nebenprodukte und die mikrobielle Zusammensetzung. Das Ergebnis der Untersuchung bestätigte dies, da alle drei Reaktortypen bezüglich der Denitrifikationsrate, Nebenprodukte und der mikrobiellen Diversität große Unterschiede zeigten, wie in Abbildung 8 A-C dargestellt.

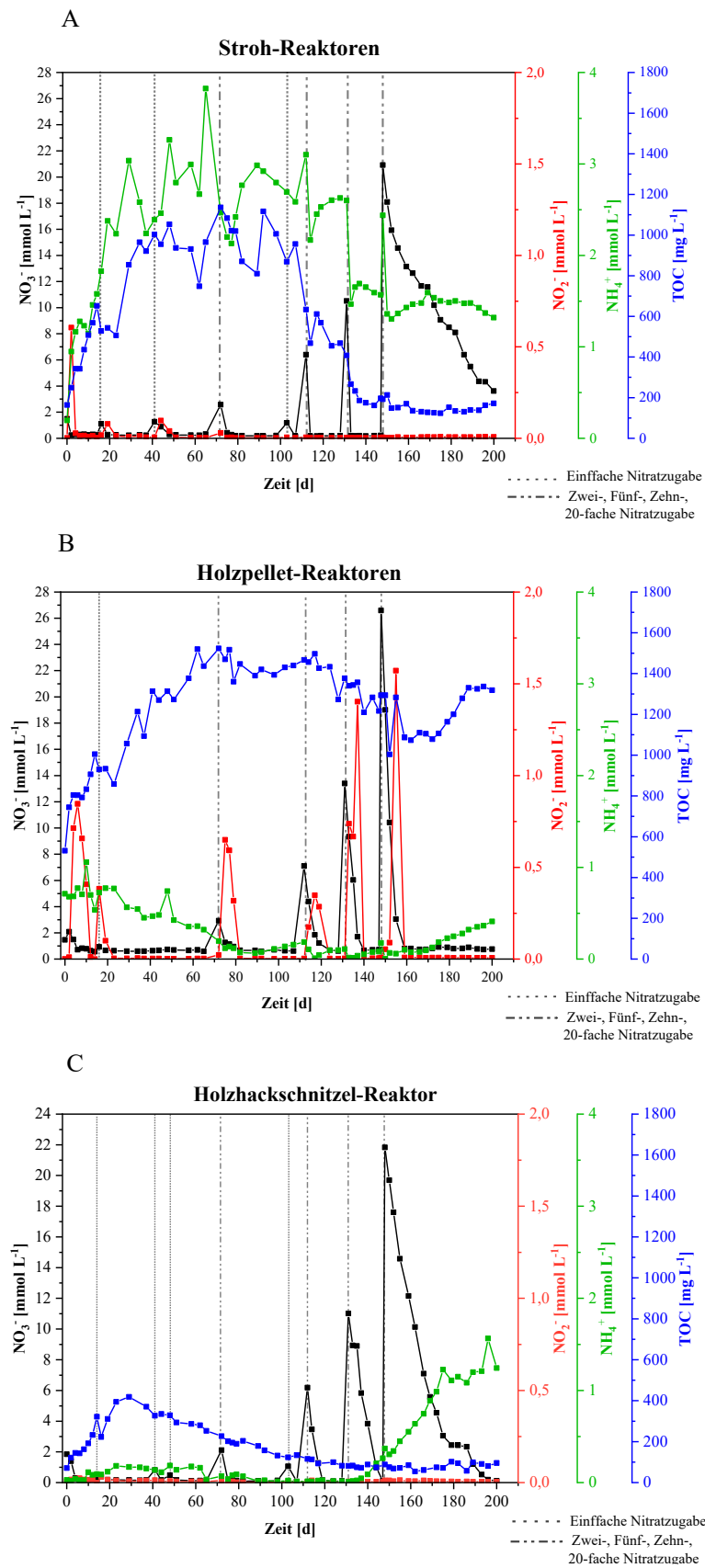


Abbildung 8: Verhalten der Nitratreduktion (schwarz) und Produktion verschiedener Nebenprodukte wie Nitrit (rot), Ammonium (grün) und TOC Gehalt (blau) in den verschiedenen Reaktortypen (Stroh, Holzpellets, Holzhackschnittel). Gestrichelte Linien markieren die verschiedenen Nitratzugaben (aus Griebmeier & Gescher, 2018).

So zeigten die mit Stroh befüllten Reaktoren zum einen eine hohe Ammoniumkonzentration ab Start des Experiments und zum anderen, dass die Denitrifikationsleistung mit zunehmender Nitratkonzentration abnahm. Gegensätzlich hierzu verhielt sich der mit Holzpellets befüllte Reaktor. Bei diesem nahm bei zunehmender Nitratkonzentration die Denitrifikationsleistung nicht ab, sondern zu. Bei den mit Holzhackschnitzeln beladenen Reaktoren ergab sich eine stabile Denitrifikationsleistung bei niedrigeren und höheren Nitratkonzentrationen. Zudem war bei diesem Reaktortyp eine niedrigere TOC-Freisetzung zu beobachten als bei den anderen beiden Reaktortypen. Außerdem konnte keine Nitritakkumulation festgestellt werden, welche bei dem mit Holzpellets befüllten Reaktor kurz nach Nitratzugabe deutlich zu beobachten war.

Insgesamt produzierten zwei der Reaktoren (Stroh, Holzhackschnitzel) Methan als klimaschädliches Nebenprodukt. Bei dem Holzpellet-Reaktor wurde die Methanproduktion aus bis dato nicht erklärbaren Gründen unterdrückt. Dies konnte auch durch die 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung bestätigt werden, da hier eine Zuordnung der sequenzierten *reads* zu methanogenen Organismen nicht möglich war. Eine weitere unerwartete Beobachtung konnte in den Holzhackschnitzel-Reaktoren gemacht werden, nachdem die zehnfache Nitratkonzentration (11,8 mM) zugegeben wurde. Das $C_{\text{org}}/\text{NO}_3^-$ Verhältnis war zu diesem Zeitpunkt niedrig, so dass, laut Fachliteratur, eine Denitrifikation bevorzugt stattfinden sollte. Jedoch wurde stattdessen ein Anstieg der Ammoniumkonzentration festgestellt. Dies könnte auf den Beginn einer DNRA hindeuten (Abb. 8C) und somit der Theorie widersprechen, dass vorrangig ein hohes $C_{\text{org}}/\text{NO}_3^-$ Verhältnis eine DNRA begünstigt (Grießmeier & Gescher, 2018).

Die Wahl für die Befüllung der Freilandanlage fiel schlussendlich nichtdestotrotz auf die Holzhackschnitzel, da hier die Vorteile über die negativen Nebenprodukte (Ammonium- und Methanproduktion nach hoher Nitratzugabe) überwiegen. So wies diese Kohlenstoffquelle eine stabile Denitrifikationsleistung, keine Nitritakkumulation sowie niedrige TOC-Werte auf. Außerdem zeigte sie die höchste mikrobielle Diversität im Vergleich zu den anderen beiden Kohlenstoffquellen, was sie potentiell resilienter gegenüber Störungen machen kann (Grießmeier & Gescher, 2018). So kam es, dass im Oktober 2015 im Auftrag von der „Stiftung Natur und Umwelt Rheinland-Pfalz“ zwei Umweltdenitrifikationsanlagen an der Drainage D7 und D8 errichtet wurden.

1.8 Zielsetzung

Das Hauptziel der Arbeit war es die Hypothese zu verifizieren, dass eine Umweltdenitrifikationsanlage in Mitteleuropa funktional betrieben werden kann. Dafür sollte auch untersucht werden, von welchen Parametern die Funktionalität am meisten abhängt. Neben äußeren Prozessparametern spielte dabei die Untersuchung des Mikrobioms und seiner Interaktion eine vorherrschende Rolle.

Zur Erreichung dieser Ziele sollte die an der Drainage D7 errichtete Umweltdenitrifikationsanlage über mehrere Jahre hinweg untersucht werden. Hierfür sollte eine permanente Online-Monitoring-Station installiert werden, die regelmäßig verschiedene Parameter (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+ , TOC, pH, Temperatur) vom Zu- und Ablauf der Anlage misst. Diese Messergebnisse dienen der Bewertung der Funktionalität und der nachhaltigen Denitrifikationsleistung der Anlage. Ein weiteres Ziel war es, mögliche unerwünschte Nebenprodukte zu identifizieren und festzustellen, unter welchen Umweltbedingungen diese auftreten. Regelmäßige Analysen der Gasemission der Anlage sowie der Abflussmengen und daraus resultierende HRT der Anlage sollten zur Beantwortung der Frage nach der Auslastung und Limitation des Systems dienen.

Die Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung sowie potentieller mikrobieller Schlüsselorganismen sollte mit Hilfe von *Next Generation Sequencing* (NGS) Methoden erfolgen. Dabei stellte sich auch die Frage, wie stabil die mikrobielle Gemeinschaft über die Jahreszeiten hinweg ist und welche Mikroorganismen, insbesondere beim Denitrifikationsprozess und beim Celluloseabbau, eine maßgebende Rolle spielen.

Weiterhin sollten offene Fragestellungen aus den vorangegangenen Laboranalysen genauer untersucht werden. Hierbei handelt es sich zum einen um die Frage, ob eine DNRA in Holzhackschnitzel-Reaktoren nach Zugabe hoher Nitratkonzentrationen wirklich stattfindet und wenn ja, welche Organismen daran beteiligt sind. Dies sollte mit Hilfe einer 16S-rDNA-Amplikon sowie mit einer Metatranskriptom-Sequenzierung analysiert werden.

Außerdem sollte die Frage geklärt werden, aus welchen Gründen Archaea, insbesondere methanogene Organismen, in Reaktoren mit Holzpellets inhibiert werden und wie diese Erkenntnis möglicherweise positiven Einfluss auf die zukünftige Gestaltung von Umweltdenitrifikationsanlagen haben könnte.

2 Material und Methoden

2.1 Umweltdenitrifikationsanlage - Feldversuch

Im Nachfolgenden sind alle Materialien und Geräte sowie das Vorgehen beschrieben, die in dieser Arbeit für die Analyse der Umweltdenitrifikationsanlage im Freiland verwendet wurden.

Da zur Untersuchung und Charakterisierung ausschließlich die Anlage an der Drainage D7 herangezogen wurde, wird sich die folgende Beschreibung auf diese Anlage konzentrieren.

2.1.1 Aufbau der Umweltdenitrifikationsanlage

Die Planung und Umsetzung der Denitrifikationsanlagen führte das Ingenieurbüro SWT Schulz Wassertechnik durch. Da der bisherige Forschungsstand zu Umweltdenitrifikationsanlagen in Deutschland bisher gering ist, bestehen für die Errichtung solcher Anlagen keine Regelwerke oder DIN-Normen.

Im vorliegenden Fall begann der Bau der Umweltdenitrifikationsanlagen, indem zuerst eine definierte Fläche zwischen den landwirtschaftlichen Äckern und dem Moorkessel ausgehoben und mit einer Folie ausgekleidet wurde. Anschließend wurden die Becken mit Holzhackschnitzeln aus Buchenholz befüllt. Die Filterfläche der Drainage D7 beträgt 180 m^2 ($10 \times 18 \text{ m}$), was bei einer Beckentiefe von $1,2 \text{ m}$ einem Filtervolumen von 216 m^3 entspricht. Zur Auslegung des Beckenvolumens wurden Abflusswerte aus dem Wintersemester 92/93 ($168 \text{ m}^3/\text{d}$) von Forst *et al.*, aktuellere Nitratkonzentrationen aus dem Jahr 2014 sowie eine berechnete Reaktionszeit von $16,8$ Stunden, herangezogen (Forst *et al.*, 1997; Gießmeier, 2015). Nach Befüllung des Beckens mit der Kohlenstoffquelle wurde das Becken mit Folie zugedeckt und auf der Oberseite mit Mutterboden aufgefüllt (Abb. 9).



Abbildung 9: Bilder von der Errichtung der Umweltdenitrifikationsanlage an der Drainage D7. Die ausgehobene Fläche von 1,20 m Tiefe (links oben) wurde zuerst mit einer Folie ausgekleidet (rechts oben), danach mit Holzhackschnitzeln befüllt (links unten) und abschließend wieder mit einer Folie zugedeckt (rechts unten) (Fotos: Christian Schulz, SWT Schulz Wassertechnik).

Zusätzlich wurden an der Anlage Entgasungsstutzen (DN1000) und Schächte (KG DN200), zur Entnahme von Substratproben, angebracht. Die Schächte sowie die Stutzen sind allesamt nach oben hin mit einem Deckel verschlossen. Abbildung 10 skizziert die Lage der vier Entgasungsstutzen (St. 1 bis St. 4) sowie der zwei Entnahmeschächte (St. 5 und St. 6).

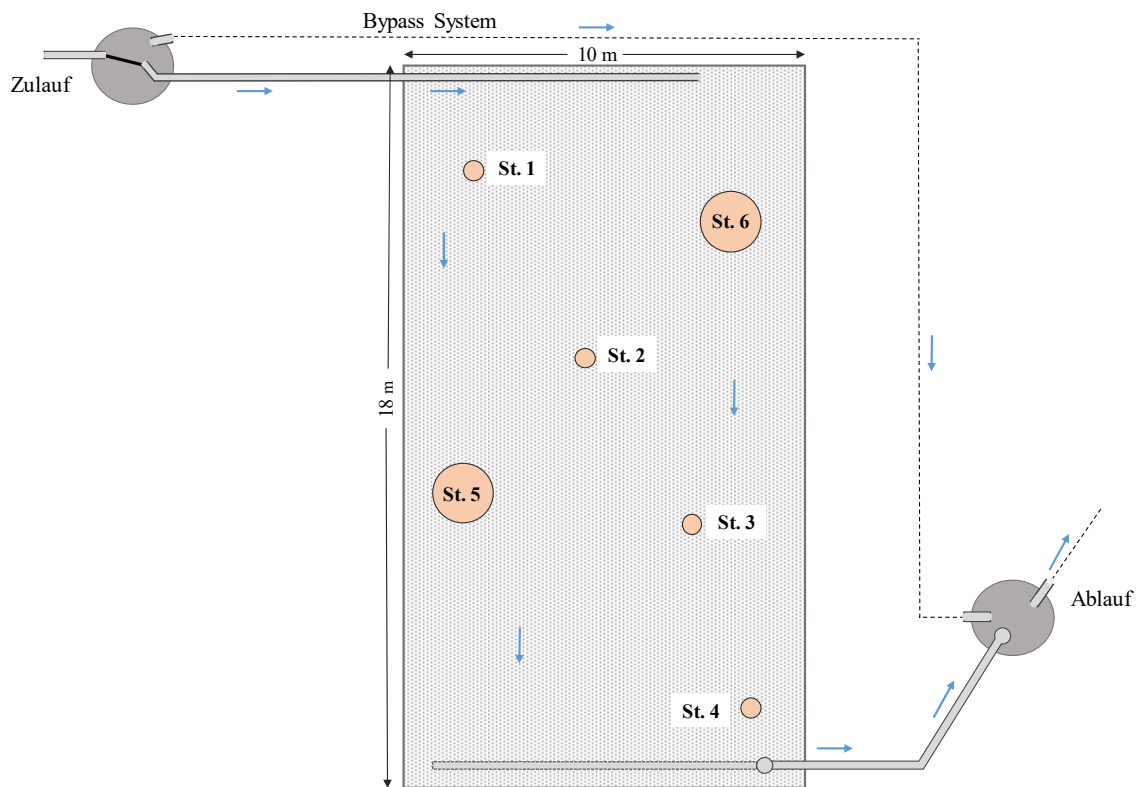


Abbildung 10: Skizze des Denitrifikationsbeckens D7 mit genauer Lage und Bezeichnung der Stutzen (St. 1, St. 2, St. 3, St. 4) und Schächte (St. 5 und St. 6) an der Denitrifikationsanlage D7.

Der Zulauf und Ablauf des Wassers, in beziehungsweise aus der Anlage, erfolgt über Rohre (KG DN100), die in Schächten (DN1000) installiert und somit zugänglich sind. Eine Zulaufdrossel im Zulaufschacht stellt einen definierten Maximalzufluss sicher. Überschüssiges Wasser wird über ein Bypass-System um das Becken herumgeleitet, um einer Überlastung der Anlage vorzubeugen.

Die Einleitung des Wassers erfolgt über vier auf die Länge des Zuleitungsrohres verteilte Auslässe (KG DN100). So kann das Wasser im Freigefälle über die Beckenbreite zufließen und das Becken dann über dessen gesamte Breite durchströmen (Abb. 11).



Abbildung 11: Zulaufschacht mit Bypass-Rohr (1) und Zulaufdrossel (2) an der Anlage D7 (links). Zulaufverteiler in das Denitrifikationsbecken (rechts) (Fotos: Victoria Griebmeier; Christian Schulz, SWT Schulz Wassertechnik).

Um ein anaerobes Milieu und eine dauerhafte Wassersättigung der Holzhackschnitzel zu gewährleisten, wird das Wasser durch ein vertikal nach oben ragendes Rohr im Ablaufschacht in der Anlage angestaut. Die Sammeldrainage im Ablauf befindet sich, im Gegensatz zum Zulaufverteiler, auf der Beckensohle und besteht aus einem über die gesamte Breite verlegtes, perforiertes Rohr (KG DN100) (Abb. 12). Erst kurz vor der Foliendurchdringung werden geschlossene Rohre verwendet. Abfließendes Wasser wird anschließend vom Ablaufschacht in die alten Drainagerohre geleitet und dem Moorkessel zugeführt.



Abbildung 12: Ablaufschacht der Anlage (links) mit nach oben ragendem Rohr zur Anstauung des Wassers im Becken. Das Ablaufsammelrohr (rechts) am Beckenboden der D7 (Fotos: Victoria Griebmeier; Christian Schulz, SWT Schulz Wassertechnik).

2.1.2 Errichtung der Online-Monitoring-Station

Die Monitoring-Station, welche die Anlagenfunktionalität kontinuierlich und autark überwacht, wurde im Rahmen dieser Arbeit nur an der Umweltdenitrifikationsanlage D7 am 03.07.2016 errichtet. Hierfür wurde eine Gartenhütte mittig zwischen Zu- und Ablauf auf der Anlagenoberfläche aufgebaut. Auf dem Dach der Hütte wurden zwei Solarpaneele der Firma Offgrid (Eggenfelden) angebracht, die zur Stromversorgung der Monitoring-Station dienen. Die Parametererfassung erfolgte mit einem Monitool der Firma s::can (Wien). Zwei Sensoren, spectro::lyser und ammo::lyser sowie das Bedienterminal, con::cube, zusammen mit einem Kompressor zur Druckluftreinigung der Sensoren wurden auf einer Durchflussarmatur montiert (Abb. 13). Die Sensoren ragten dabei in ein Rohr, durch welches das Zu- oder Ablaufwasser der Anlage geleitet wurde.

Der spectro::lyser ist ein Spektrometer, das über das Absorptionsspektrum (UV 220 – 390 nm) folgende Parameter misst: NO_3^- , NO_2^- , TOC und Trübung. Während einer Messung wird eine Lichtquelle (Xenon) in die Flüssigkeit emittiert und dabei absorbiert jedes Molekül Strahlung einer bestimmten Wellenlänge. Je höher die Konzentration eines Stoffes in der Flüssigkeit ist, desto stärker wird der Lichtstrahl gedämpft und die Intensität anschließend von einem Detektor gemessen. Mit dem ammo::lyser können folgende Parameter gemessen werden: NH_4^+ , pH und Temperatur. Das Messprinzip beruht auf einer elektrochemischen Methode über eine ionenselektive Elektrode mit einer speziellen Membran, die für einen bestimmten Ionentyp (z.B. NH_4^+) durchgängig ist. Im Inneren dieser Elektrode befindet sich ein Elektrolyt, worüber das Redoxpotential dieses Stoffes genau bestimmt werden kann. Über die Nernst'sche Gleichung und eine Referenzelektrode kann die gemessene Spannung dann in eine stoffspezifische Konzentration umgerechnet werden.

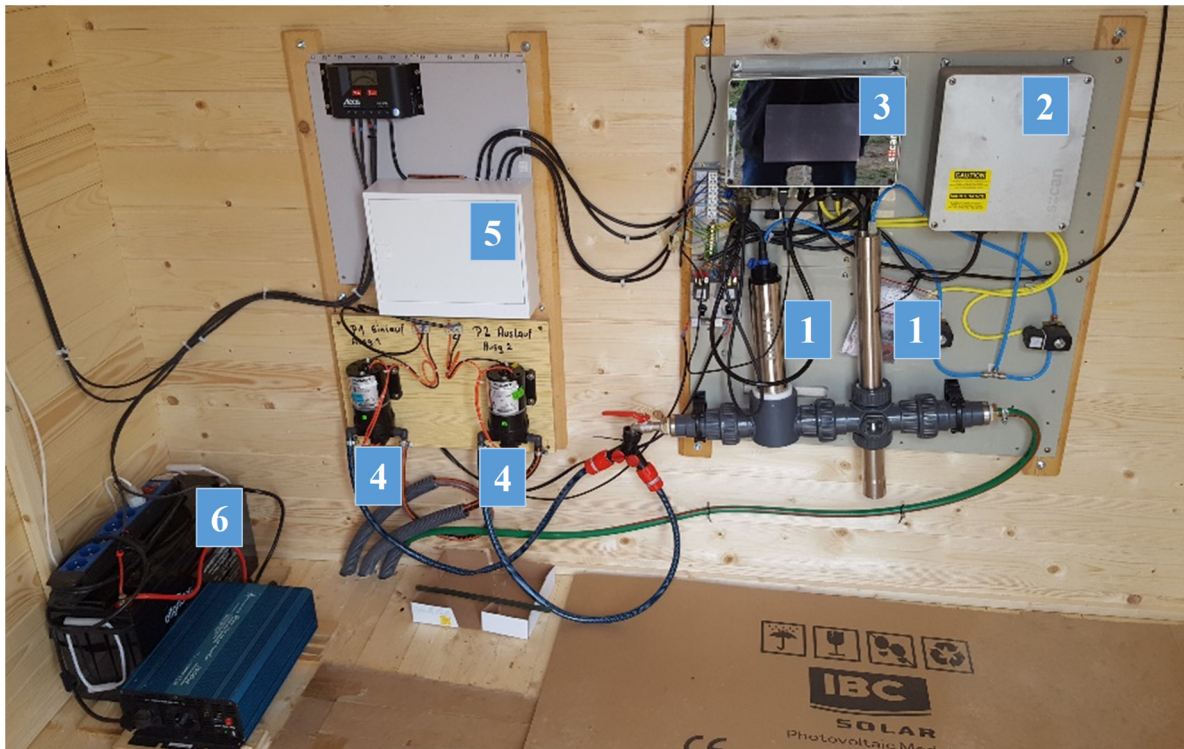


Abbildung 13: Messtation innerhalb der Hütte. Das Bild zeigt sowohl die Durchflussarmatur mit den beiden Sensoren (1), dem Kompressor (2) und das Bedienterminal con:cube (3) sowie die beiden Pumpen (4) und den Schaltkasten (5) plus Batterie der Solaranlage (6) (Foto: Victoria Griebmeier).

Zwei Flojet-Doppelmembranpumpen (12 Volt, 4 L/min) der Firma VipTech (Großbottlingen) förderten abwechselnd Wasser vom Zu- bzw. Ablaufschacht durch das Durchflussrohr der Monitool-Armatur. Für die Zuleitung wurden Gartenschläuche der Firma Gardena (Ulm) verwendet, welche unterirdisch zum Zu- und Ablauf verlegt und direkt im Zu- bzw. Ablaufrohr installiert wurden (Abb.14). Aufgrund von Verunreinigungen der Pumpen erfolgte nachträglich noch die Installation von 10-Zoll-Pumpenfiltern mit 100 µm Einsätzen der Firma VipTech vor die Pumpen, um grobe Partikel von diesen fernzuhalten.



Abbildung 14: Anbringung der Schläuche im Zulaufrohr (links) und im Ablaufrohr (mitte) der Anlage D7 sowie die unterirdische Verlegung der Schläuche (rechts). (Fotos: Victoria Griebmeier).

Mittels des Bedienterminals konnten die Pumpen so konfiguriert werden, dass sie stündlich wechselnd Wasser für drei bis fünf Minuten zur Messstrecke beförderten. Somit bestand genügend Zeit, um das im Schlauch stehende Wasser auszutauschen, bevor die automatische Messung der Sensoren startete. Eine Druckluftreinigung vor jedem Pumpvorgang entfernte zusätzlich altes Wasser der vorherigen Messung von den Sensoren. Zusätzlich erfolgte eine monatlich manuelle Reinigung der Sensoren. Dabei wurde der spectro::lyser mit 98% Ethanol, ddH₂O und einer mitgelieferten Bürste und der ammo::lyser mit Leitungswasser, einem Mikrofasertuch und Wattestäbchen gesäubert. Die Sensoren wurden zudem in regelmäßigen Abständen kalibriert, indem ihre Messwerte mit Laborergebnissen abgeglichen wurden. Da die Sensoren sehr empfindlich gegenüber niedrigen Temperaturen und Frost sind, musste die Monitool-Armatur über die Wintermonate abgebaut werden und wurde erst mit Beginn der Frühlingsmonate (März) nach der Frostperiode, wiederaufgebaut.

2.1.3 Probenentnahme aus der Umweltdenitrifikationsanlage

Einmal pro Monat wurden im Untersuchungsgebiet verschiedene Proben (Fest-, Flüssig-, und Gasproben) zur analytischen Untersuchung und mikrobiellen Diversitätsanalyse genommen. Die Details werden im Folgenden erläutert.

2.1.3.1 Entnahme flüssiger Proben für analytische Untersuchungen

Die Entnahme von Flüssigproben (Drainagewasser) erfolgte vom Zu- sowie vom Ablauf der Anlage D7 für analytische Laboruntersuchungen. Im späteren Verlauf der Arbeit (ab März 2017) kam es zusätzlich noch zur zeitweisen Beprobung von St. 1, 3 und 4. Da bei St. 2, 5 und 6 keine Flüssigphase vorhanden war, konnten hier auch keine Flüssigproben entnommen werden. Das Probenmaterial wurde mit sterilen 50 ml Reaktionsgefäßen von Sarstedt (Nümbrecht) entnommen und anschließend bis zur analytischen Untersuchung bei -20°C gelagert.

2.1.3.2 Entnahme von Gasproben

Gasproben wurde an allen Stutzen (St. 1 bis 4) der Anlage D7 sowie an den beiden Substratentnahmeschächten (St. 5 und 6) genommen. Da die Annahme bestand, dass sich die Gaszusammensetzung bei den Probeentnahmestellen ähnlich verhält, wurden ab Oktober 2016 zuerst nur St. 1, 2, 3 und 5 monatlich beprobt. Da aber alle Probeentnahmestellen Unterschiede aufzeigten, kam es zusätzlich noch zur Beprobung von St. 4 ab Nov. 2017 und

St. 6 ab Aug. 2018. Hierfür wurden 500 ml Schott-Flaschen mit Anaerobdeckeln verschlossen und für 4 - 5 Minuten im Labor vakuumisiert. An der Außenwand jedes Stutzens wurde ein Loch gebohrt und ein gasdichter Polyamidschlauch der Firma Ehlgötz (Karlsruhe) ins Innere der Stutzen eingebracht. Das andere Ende des Schlauches wurde zunächst an kleinere, vakuumisierte Schottflasche (100-150 ml) angeschlossen, um das im Gasschlauch befindliche Totvolumen zu entfernen. Anschließend wurde die Gasprobe mit vakuumierten 500 ml Schott-Flaschen entnommen, die für 2 min angeschlossen und so mit dem Gasinhalt des Stutzens befüllt wurden (Abb. 15). Die Gasprobenentnahme an den Schächten St. 5 und 6 erfolgte, indem der Deckel einen kleinen Spalt geöffnet wurde. Der Schlauch konnte somit in den Schacht eingebracht und an die vakuumierten Flaschen angeschlossen werden. Die genaue Analyse der Gaszusammensetzung erfolgte anschließend im Labor mittels Gaschromatographie (siehe Kapitel 2.3.3).



Abbildung 15: Gasprobenentnahme an den Stutzen (links) der Anlage D7 und an den Schächten (rechts) mit vakuumisierten Flaschen (Fotos: Victoria Griebmeier).

Eine längerfristige Analyse der Gase über mehrere Tage hinweg erfolgte zusätzlich noch mit einem Agilent 490 Mikro GC der Firma Teckso (Neukirchen-Vluyn), der in der Messstation aufgebaut wurde. Um eine direkte Messung der Gaszusammensetzung vor Ort zu bewerkstelligen, wurden zu jeder Probenentnahmestelle (St.) Peek-Kapillaren (1/16" AD x 0,75 mm ID) der Firma SCP Seitz Chromatographie Produkte GmbH (Weiterstadt) verlegt. Das Einbringen der Kapillaren in die Stutzen bzw. in die Schächte erfolgte analog durch entsprechende Löcher im Stutzen. Das andere Ende wurde an das Multipositionsventil des Mikro GCs in der Hütte angeschlossen (Abb. 16) und die Analyse, wie in Kapitel 2.3.3 beschrieben, durchgeführt.



Abbildung 16: Verlegung der Peek-Gasschläuche zu den einzelnen Stützen und Schächten (links). Aufbau und Anschluss der Schläuche an dem Mikro GC in der Hütte (rechts) (Fotos: Victoria Griebmeier).

2.1.3.3 Probenentnahme für die Sequenzierungen

Für die Analyse der mikrobiellen Diversität via 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung sowie für die Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse wurden Flüssig- sowie Festproben (Holzhackschnitzel) entnommen. Hierfür wurde die Flüssigphase der Anlage aus St. 3 mit einer Teleskopstange und einem, an deren Ende befindlichen, sterilen 50 ml Reagiergefäß entnommen. Die Holzhackschnitzel zur Analyse der Festphase (Biofilm auf dem Substrat) wurden aus St. 2 auch mit einer Teleskopstange und einem, an deren Ende befindlichen, sterilen Skalpell entnommen und wieder in sterile 50 ml Reagiergefäße gegeben. Die Fest- sowie die Flüssigproben für die 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung wurden direkt nach Entnahme auf Eis gelagert und transportiert. Die Proben für diese Analyse wurden an folgenden Daten gesammelt: 26.08.2016 (Aug. 16), 10.11.2016 (Nov. 16), 28.03.2017 (März 17), 23.09.2017 (Sept. 17), 30.11.2017 (Nov. 17), 24.04.2018 (April 18). Die Proben für die Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse wurden nach der Entnahme direkt auf Trockeneis gegeben, um ein schnelles Einfrieren der Proben zu gewährleisten. Diese Probenentnahme erfolgte am 24.04.2018. Alle Proben wurden bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C gelagert.

2.1.4 Ermittlung der Durchflussrate

Die Flussrate von Zu- und Ablauf wurden ab Januar 2017 regelmäßig mit einem Becherglas mit zwei Liter Fassungsvermögen und einer Stoppuhr gemessen. Hierfür wurde das Rohr im

Zulaufschacht zur Seite geschoben, das Becherglas darunter gestellt und die Füllzeit des Becherglases ermittelt. Ende November 2017 (30.11.2017) errichteten Kooperationspartner des Instituts für Wasser und Gewässerentwicklung aus dem Bereich Hydrologie des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) im Ablaufschacht ein Wehr (Thomsonwehr), das zur regelmäßigen Erfassung der Flussrate diente (Abb. 17). Das rechteckige Wehr mit den Maßen (L×B×H) 85×32×30 cm hatte einen dreieckförmigen Auslass mit einem Winkel von 60° und einer maximalen Auslasshöhe von 19,2 cm. Dieser Auslass verengte den Fließquerschnitt und führte dadurch zu einer Anstauung des Wassers im Wehr. Der Füllstand wurde mit einer Drucksonde, DCX-38 VG der Firma Keller (Winterthur, Schweiz) und mit dem BARO-DIVER DI500 der Firma VanEssen (Delft, Niederlande) gemessen und über diesen anschließend mit einer Näherungsformel die Abflussmenge berechnet.



Abbildung 17: Thomsonwehr im Ablaufschacht der Umweltdenitrifikationsanlage zur kontinuierlichen Erfassung der Flussrate (Foto: Victoria Griefmeier).

Für den Zeitraum ohne regelmäßige Abflussmessung wurden die Abflusswerte mit dem Computerprogramm R (Core Team) simuliert. Die Simulation sowie die Errichtung und Dimensionierung des Wehres und die Berechnung der Ablaufwerte erfolgte durch Dr. Jan Wienhöfer und Julia Solar des Instituts für Wasser und Gewässerentwicklung aus dem Bereich Hydrologie des KIT.

2.1.5 Uranin-Tracereperiment

Wie die Analyse des Wehres, erfolgte auch die Durchführung des Tracerversuchs sowie dessen Auswertung durch dieselben Mitarbeiter des Instituts für Wasser und Gewässerentwicklung, Bereich Hydrologie des KIT.

Mit Tracerversuchen kann die Fließdynamik in ober- und unterirdischen Gewässern ermittelt werden. Sie dienen dazu, die Durchmischung und Bewegung der Wasservolumina besser charakterisieren zu können. Häufig, wie auch in dieser Arbeit, wird Uranin als künstlicher Fluoreszenztracer eingesetzt. Tracer dieser Art werden aktiv und punktuell in ein hydrologisches System eingebracht und geben somit einen Einblick in das System für einen gewählten Versuchszeitraum. Daher ist es wichtig, einen geeigneten Zeitpunkt zu wählen, der den hydrologischen Zustand des Systems gut repräsentiert. Die Durchgangszeit des Uranins beschreibt zum einen die Transportzeit des Tracers mit der mobilen Wasserphase und zum anderen den diffusen Austausch des Tracers zwischen mobiler und stationärer Phase. Der in dieser Arbeit durchgeführte Tracerversuch sollte somit bei dieser Denitrifikationsanlage über die HRT des Beckens sowie über die Auslastung und Durchmischung des Wassers in der Anlage aufklären. Die Fluoreszenzmessung der Uraninkonzentration erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit einer CYCLOPS-7 Analog Detector-Fluoreszenzsonde (San Jose, USA), welche im Ablaufschacht der Denitrifikationsanlage installiert wurde.

Insgesamt wurden zwei Tracerversuche zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführt. Der erste Tracerversuch (V1) erfolgte am 30.11.2017 und der zweite (V2) am 24.04.2018. Da V2 aufgrund eines fehlenden Abflusses ab dem 15.05.2018 abgebrochen werden musste, wird sich im Rahmen dieser Arbeit nur auf die Ergebnisse von V1 bezogen.

Zusätzlich erfolgte mit uraninabsorbierenden Aktivkohlesäckchen (AKS) noch eine Bestimmung der räumlichen Verteilung des Tracers während der Durchführung von V2. Insgesamt wurden vier AKS in die Probeentnahmeschächte St. 1, 3, 4, 5 eingebracht. Die AKS in St. 1, 3 und 4 befanden sich alle circa 1 m unter der Wasseroberfläche. Bei St. 5 gestaltete sich die Einbringung schwieriger, da das Säckchen hier durch die Holzschnitzel nach unten eingegraben werden musste, um es mit Wasser zu bedecken.

Die anschließende Auswertung der AKS auf die Uraninkonzentration erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Angewandte Geowissenschaften, Abteilung Hydrogeologie des KIT.

2.1.6 Berechnungen zur Abschätzung der Denitrifikationsleistung

Um die Leistungsfähigkeit der Anlage zu bestimmen, wurden verschiedene Berechnungen durchgeführt. Zunächst erfolgt die Berechnung der Nitratentfernungseffizienz (Formel 1).

$$\text{NO}_3\text{-N Entfernungseffizienz [\%]} = (C_{\text{Zu}} - C_{\text{Ab}}) / C_{\text{Zu}} \times 100 \quad (\text{Formel 1})$$

C_{Zu} = NO₃-N Konzentration im Zufluss [mg/l]

C_{Ab} = NO₃-N Konzentration im Abfluss [mg/l]

Neben der Nitratentfernungseffizienz wurde auch die Nitratentfernungsrate (NR) pro m³ Anlagenmaterial, beziehungsweise die eliminierte Nitratfracht durch die Anlage (in g N m⁻³ Anlagenmaterial d⁻¹) mit Formel 2 nach Warneke *et al.* (2011) berechnet:

$$\text{NR} = Q \times (C_{\text{Zu}} - C_{\text{Ab}}) / V_{\text{Anlage}} \quad (\text{Formel 2})$$

C_{Zu} = NO₃-N Konzentration im Zufluss [g/m³]

C_{Ab} = NO₃-N Konzentration im Abfluss [g/m³]

Q = Flussrate [m³/d]

V = Reaktorvolumen [m³]

Zusätzlich konnte mit Hilfe des Beckenvolumens und der Porosität von Holzhackschnitzeln eine theoretische HRT berechnet werden (Formel 3), welche darauffolgend mit den Ergebnissen des Tracerversuchs und der daraus resultierenden realen HRT verglichen werden sollte. Somit wäre eine Abschätzung der realen Beckendurchströmung möglich. Für die Berechnung der theoretischen HRT wurde ein Porositätswert (θ) für Holzhackschnitzel von 0,7 aus der Literatur verwendet (Christianson *et al.*, 2012).

$$\text{HRT}_{\text{theoretisch}} = V \times \theta / Q \quad (\text{Formel 3})$$

V = Reaktorvolumen [m³]

θ = Porosität [%]

Q = Flussrate [m³/d]

Die effektive Porosität, mit welcher nachfolgend die reale HRT berechnet werden konnte, wurde mit Formel 4 bestimmt:

$$\theta_{\text{effektiv}} = Q / v \times A \quad (\text{Formel 4})$$

Q = Flussrate [m³/s]

v = Schwerpunktgeschwindigkeit [m/s]

A = Querschnittsfläche [m]

Letztere Berechnung erfolgte durch Mitarbeiter des Instituts für Wasser und Gewässerentwicklung, Bereich Hydrologie des KIT.

2.2 Laborversuche

Im Nachfolgenden sind alle Materialien und Geräte beschrieben, die in dieser Arbeit für die Analyse der Laborversuche verwendet wurden.

2.2.1 Aufbau der Labor-Denitrifikationsreaktoren

Zur Untersuchung der Fragestellung, ob nach Zugabe hoher Nitratkonzentrationen eine DNRA eintritt, wurden Experimente in Denitrifikationsreaktoren im Labormaßstab durchgeführt, welche bereits in vorangegangenen Untersuchungen zum Einsatz kamen (Grißmeier und Gescher, 2018). Der Aufbau bestand aus Schott Vakuum-Exsikkatoren DN 150 der Firma neolab (Heidelberg), deren seitliche Öffnung zur Probenentnahme diente. Verschlossen wurden die Reaktoren mit einer Deckeldichtung der Firma Bola (Grünsfeld) und einem Schott-Schraubverschluss (GL 32). Durch die Dichtung wurde ein 6 mm dicker PTFE-Schlauch der Firma neoLab (Heidelberg) bis zum Boden der Exsikkatoren geführt. Die Deckelöffnung wurde mit einem Gummistopfen abgedichtet.

Die Exsikkatoren wurden mit 200 g Holzhackschnitzeln aus Pappelholz befüllt. Dabei waren zwei Drittel der Holzhackschnitzel frisches Material vom Baumpflegeservice Beideck (Karlsruhe) und ein Drittel stammte aus Reaktoren aus den in Kapitel 1.7 beschriebenen Untersuchungen, die bereits ein Jahr in Betrieb waren. In diesen Reaktoren konnte bereits eine Ammoniumproduktion nach Zugabe höherer Nitratkonzentrationen beobachtet werden und die Holzhackschnitzel dienten daher als Inokulum. In der Mitte der Exsikkatoren befand sich ein Metallgitter, auf welches die Holzhackschnitzel auflagen, so dass der Probeentnahmeschlauch am Boden des Reaktors vor einer Verstopfung durch das Kohlenstoffsubstrat geschützt wurde. Um ein Aufschwimmen der Holzhackschnitzel an der Wasseroberfläche zu vermeiden, beschwerte ein Metallgitter mit autoklavierten Steinen diese nach unten. Die Exsikkatoren wurden mit einem künstlich nachgestellten Drainagewassermedium (Kap. 2.2.4, Tabelle 2) befüllt und anschließend verschlossen. Das Medium enthielt zum Startzeitpunkt 1,18 mM Nitrat, was dem Nitratwert an der Drainage D7 vom 8.12.2014 entsprach. Der Reaktordeckel wurde mit KWS-Schliff fett der Firma Carl Roth (Karlsruhe) luftdicht auf dem Exsikkator-Unterteil befestigt. Der fertige Reaktor wurde auf einem Magnetprüher der Firma neolab (Heidelberg) platziert und ein Magnetprühfisch auf dem Boden des Reaktors sorgte für eine Durchmischung bei 125 rpm/min. Abbildung 18 zeigt eine Skizze des fertigen Aufbaus. Alle Versuche wurden im Triplikat durchgeführt.

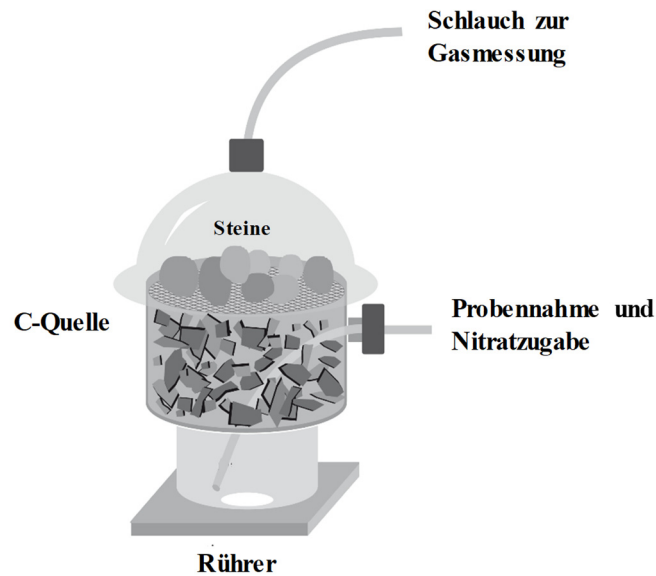


Abbildung 18: Skizze des fertigen Laborreaktoraufbaus.

2.2.2 Probenentnahme und Nitratzugabe im Laborreaktor

Die Probenentnahme zur analytischen Untersuchung erfolgte über die seitliche Öffnung des Reaktors. Dabei wurde eine Spritze (10 ml) an den Dreiwegehahn angeschlossen und mehrere Male durchgespült, so dass sichergestellt wurde, dass frische Flüssigkeit aus dem Reaktor und nicht aus dem Schlauch entnommen wurde. Insgesamt wurden immer circa 7 ml Probe entnommen. Die im Schlauch verbleibende Flüssigkeit wurde mit N_2 zurück in den Reaktor gedrückt. Die Probenverarbeitung für analytische Verfahren erfolgte entweder direkt im Anschluss oder die Proben wurden bei -20°C gelagert. Die Probenentnahme fand dreimal wöchentlich statt.

Sobald das Nitrat in den Reaktoren aufgebraucht war, wurde KNO_3 zugegeben, um den Startwert von 1,18 mM Nitrat wiederherzustellen. Nach mehreren dieser Nitratzugaben, erfolgte eine Erhöhung der Zugabe um die zweifache, fünffache, zehnfache und 20-fache Nitratmenge des Ausgangwertes. Dadurch sollte festgestellt werden, ob der Ammoniumgehalt nach höheren Nitratzugaben wieder zu steigen begann.

2.2.3 Inhibierung methanogener Organismen durch Holzpellets

Die zweite offene Fragestellung von vorangegangenen Laboruntersuchungen - warum Archaeen, insbesondere methanogene Organismen, in Laborreaktoren mit Holzpellets als C-

Quelle gehemmt werden - sollte mit einer Ko-Kultur aus den Modellorganismen *Methanobacterium formicicum* und *Methanosarcina barkerii* untersucht werden. Hierfür wurden 100 ml des Methanobacterium-Mediums (Kap. 2.2.4, Tabelle 3) mit dieser Ko-Kultur angeimpft und bei 37°C und 180 rpm inkubiert bis sich eine dichte Zellkultur entwickelt hatte. Vor der Inokulation wurde die Gasphase des Mediums für den t₀-Wert mit dem Micro GC gemessen. Nachdem die Kulturen dicht angewachsen waren, wurden sie auf den Verbrauch von H₂ und CO₂ und die Produktion von CH₄ hin untersucht. Hierfür wurden die Kulturen vor der Messung frisch mit H₂/CO₂ [80/20 Vol.-%] begast und der Verbrauch anschließend zwei bis fünf Stunden später mit Hilfe des Micro GCs ermittelt. Die Kulturen wurden über Peek-Kapillaren (1/16" AD x 0,75 mm ID) der Firma SCP Seitz Chromatographie Produkte GmbH (Weiterstadt) und einer Kanüle, welche in die Gasphase der Kultur eingebracht wurde, an den Micro GC angeschlossen. Nachdem sich die Gaszusammensetzung aller Kulturen ähnlich verhielt und mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie optisch keine Kontamination festgestellt werden konnte, kam es nach 13 Tagen der Inkubation zur Substratzugabe. Einem Triplikat wurden Holzpellets (6,4 g) der Firma Bauhaus (Belp), die aus 30% Laubholz (Buche und Eiche) und 70% Nadelholz (Kiefer) bestanden, zugegeben. Ein weiteres Triplikat wurde mit Pappel-Holzhackschnitzel (6 g) befüllt und dem dritten Triplikat wurde kein Substrat zugegeben, da dieses als Kontroll-Kultur dienen sollte. Um eine Kontamination und Beeinflussung der methanogenen Organismen, durch die auf dem Substrat befindliche Mikroorganismen zu vermeiden, wurden die Holzpellets sowie die Holzhackschnitzel vor Zugabe 30 min lang mit UV-Licht bestrahlt. Weiterhin wurde vor Substratzugabe nach 25 Tagen Kultivierung (t₁) von jeder Kultur 1 ml für die spätere Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) entnommen, über welche die Anzahl und Aktivität der methanogenen Organismen beobachtet sowie eine mögliche Kontamination detektiert werden sollte. Die Substratzugabe erfolgte im Anaerobenzelt unter anoxischen Bedingungen. Aus Gründen der Vergleichbarkeit wurden auch die Kontroll-Kulturen, bei denen keine Substratzugabe erfolgte, geöffnet. Im Anschluss wurden alle Kulturen frisch mit H₂/CO₂ begast und 2 Stunden später mit dem Micro GC gemessen.

Allgemein wurden alle Kulturen zwei Mal täglich in einem regelmäßigen Abstand von drei bis fünf Stunden nach der Begasung auf den H₂/CO₂ Verbrauch und die CH₄-Produktion hin untersucht. Sobald H₂/CO₂ aufgebraucht war, wurden die Kulturen frisch begast. Zudem wurde am selben Tag vor Substratzugabe (t₂) sowie drei (t₃) und 14 Tage danach (t₄) 1 ml von jedem Triplikat entnommen und für die FISH-Analyse fixiert (Kap. 2.7).

Dieses Experiment wurde später wiederholt, jedoch diesmal unter leicht veränderten Bedingungen. Hierfür wurden diesmal nur Holzpellets als Substrat verwendet, welche vorab in autoklaviertem ddH₂O gelöst wurden. Bei einem Triplikat wurde der pH-Wert auf 7 bis 7,1 eingestellt. Bei dem anderen Triplikat wurde dies nicht durchgeführt, womit dort der pH-Wert bei 4 bis 4,1 lag. Die gelösten Holzpellets wurden anschließend wieder in eine angewachsene Ko-Kultur der methanogenen Modellorganismen gegeben und in einem zweistündigen Abstand nach der H₂/CO₂-Begasung mit dem Mikro GC auf ihre Gaszusammensetzung untersucht. Zusätzlich wurde täglich eine Probe für die Bestimmung des pH-Wertes entnommen.

Weiterhin wurde noch ein abiotischer Versuch durchgeführt, in welchem ausschließlich das Methanobacterium-Medium mit Holzpellets, jedoch ohne die Ko-Kultur versetzt wurde. Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, ob die Holzart einen Einfluss auf den pH-Wert des Mediums und somit auf die Aktivität der methanogenen Organismen hat. Dabei kamen zum einen die gleichen Holzpellets, wie im oben beschriebenen Versuch, mit Kiefernholz zum Einsatz und zusätzlich noch weitere Holzpellets, die nur aus Hartholz (Laubholz) bestanden. Die Ansätze mit den verschiedenen Holzpellets wurden exakt gleich behandelt wie die zuvor beschriebenen Ko-Kultur-Versuche.

2.2.4 Kulturmedien

Soweit nicht gesondert angemerkt, wurden alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien bei den Firmen Carl Roth (Nürnberg), Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Steinheim), Life Technologies (Darmstadt), Roche (Mannheim), AppliChem (Darmstadt) oder VWR (Darmstadt) bestellt.

Tabelle 2: Zusammensetzung des künstlich nachempfundenen Drainagewasser-Mediums.

Komponente	Menge
CaCl ₂ x H ₂ O	64 mg
MgSO ₄ x H ₂ O	53,2 mg
K ₂ HPO ₄	0,08 mg
NH ₄ Cl	0,97 mg
KNO ₃	118,6 mg
ddH ₂ O	ad 1 L
pH-Wert	6,8

Die Anreicherung der methanogenen Modellorganismen *Methanobacterium formicicum* und *Methanosarcina barkerii* fand in dem *Methanobacterium*-Medium (Tab. 3) statt.

Tabelle 3: Zusammensetzung des *Methanobacterium*-Mediums (DSMZ 119).

Komponente	Menge
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	0,4 g
NaCl	0,4 g
NH ₄ Cl	0,4 g
CaCl ₂ × 2 H ₂ O	0,05 g
Spurenelementlösung SL-10	1 ml
Hefeextrakt	1 g
Na-Acetat	1 g
<i>Fatty acid mixture</i>	20 ml
Na-Resazurin	1 mg
NaHCO ₃	4 g
L-Cysteine-HCL × H ₂ O	0,5 g
Na ₂ S × 9 H ₂ O	0,5 g
ddH ₂ O	ad 1 L
pH-Wert mit 1 M HCl	7

Hierfür wurden alle Komponenten abgewogen und ddH₂O aufgeköcht und entgast. Im Anaerobenzelt wurden alle Komponenten vermischt und verrührt bis der gesamte Sauerstoff entwichen und das Medium klar war. Der pH-Wert wurde mit pH-Indikatorpapier überprüft und mit 1 M HCl auf 7 gebracht. Anschließend wurden 100 ml des Mediums in 250 ml Schott-Flaschen aliquotiert, gasdicht verschlossen und anschließend mit H₂/CO₂ [80/20 Vol.-%] für ein bis zwei Minuten begast und autoklaviert.

Tabelle 4: Zusammensetzung der *Fatty acid mixture* nach DSMZ 119. Valeriansäure und Isovaleriansäure wurden dem Medium nicht hinzugefügt.

Komponente	Menge
2-Methylbuttersäure	25 g
Isobuttersäure	25 g
ddH ₂ O	ad 1 L
pH-Wert mit konz. NaOH	7,5

Tabelle 5: Zusammensetzung der Spurenelementlösung SL-10 (DSMZ 320).

Komponente	Menge
HCl (25%; 7,7 M)	10 ml
FeCl ₂	1,5 g
ZnCl ₂	70 mg
MnCl ₂ × 4 H ₂ O	100 mg
H ₃ BO ₃	6 mg
CoCl ₂ × 6 H ₂ O	190 mg
CuCl ₂ × 2 H ₂ O	2 mg
NiCl ₂ × 6 H ₂ O	24 mg
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	36 mg
ddH ₂ O	990 ml

2.2.5 Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer dienten zur Überprüfung der isolierten DNA, bevor eine 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung durchgeführt wurde (Tabelle 6). Die Primer-Synthese fand bei der Firma Sigma-Aldrich Biochemie GmbH (Hamburg) statt.

Tabelle 6: Übersicht, der in dieser Arbeit verwendeten Primer.

Bezeichnung	Sequenz von 5' nach 3'	Verwendung
Bact_341F	CCTACGGGNGGCWGCAG	Degenerierter <i>Forward</i> -Primer zur Detektion der 16S-rDNA von Bakterien für die Illumina-Amplikon- Sequenzierung
Bact_805R	GACTACHVGGGTATCTAATCC	Degenerierter <i>Reverse</i> -Primer zur Detektion der 16S-rDNA von Bakterien für die Illumina-Amplikon- Sequenzierung
A519F	CAGCMGCCGCGGTAA	Degenerierter <i>Forward</i> -Primer zur Detektion der 16S-rDNA von Archaea für die Illumina-Amplikon- Sequenzierung
A906R	CAATTCMTTAAAGTTTC	Degenerierter <i>Reverse</i> -Primer zur Detektion der 16S-rDNA von Archaea für die Illumina-Amplikon- Sequenzierung

2.2.6 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) Materialien

2.2.6.1 Sonden

Für die FISH-Analyse wurden die in Tabelle 7 aufgelisteten Sonden verwendet, die bei MWG (Ebersberg) oder Sigma-Aldrich (Steinheim) bestellt wurden.

Tabelle 7: Übersicht über die verwendeten Sonden für die FISH-Analyse in dieser Arbeit. FA steht für Formamidkonzentration.

Sonden-Name	Ziel	Sequenz von 5' nach 3'	Spezifität	Referenz	FA [%]
EUB388-I	16S-rRNA	[CY3]GCTGCCTCCCGTA GGAGT	Eubacteria	(Stahl & Amann, 1991)	0-50
ARCH915	16S-rRNA	[FITC]GTGCTCCCCGCC AATTCCT	Archaea	(Stahl & Amann, 1991)	20

2.2.6.2 Puffer und Lösungen

Die Zusammensetzung der benötigten Puffer und Lösungen für die FISH-Analyse sind in Tabelle 8 bis 13 aufgelistet.

Tabelle 8: Zusammensetzung des 10×-PBS-Puffers (engl. für *phosphate buffered saline*, phosphatgepufferte Salzlösung).

Substanz	Menge
NaCl	40 g
KCl	1 g
Na ₂ HPO ₄ × 2 H ₂ O	3,82 g
KH ₂ PO ₄	1 g
ddH ₂ O	ad 500 ml

Tabelle 9: Zusammensetzung der Fixierlösung.

Substanz	Menge
10 × PBS	10 ml
37% Formaldehyd	10,8 ml
ddH ₂ O	79,2 ml

Tabelle 10: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers. FA steht für Formamid.

Substanz	Menge für 20%ige FA-Konz
5 M NaCl	1,08 ml
1 M Tris-HCl pH 8,0	0,12 ml
ddH ₂ O	3,6 ml
20% SDS	3 µl
FA	1,2 ml

Tabelle 11: Zusammensetzung des Waschpuffers. FA steht für Formamid.

Substanz	Menge für 20%ige FA-Konz.
5 M NaCl	2,15 ml
1 M TrisHCl pH 8,0	1 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	0,5 ml
20% SDS*	25 µl
ddH ₂ O	ad 50 ml

* SDS am Ende zugegeben

Tabelle 12: Zusammensetzung 20× SSC, pH 6.

Substanz	Menge
NaCl	87,65 g
Tri-Natrium-Citrat Dihydrat	44,1 g
ddH ₂ O	ad 500 ml

Tabelle 13: Zusammensetzung des Einbettpuffers.

Substanz	Menge
Citifluor AF1 (Citifluor Lt. London)	11 ml
Vectashield H1000 (Linaris, Wertheim)	2 ml
1× PBS	1 ml

2.3 Analytische Methoden

In der vorliegenden Arbeit wurden mehrere analytische Verfahren durchgeführt, um die Funktionalität der Denitrifikationsanlage beurteilen zu können.

2.3.1 Ionenchromatographie (IC)

Die Bestimmung verschiedener Ionen erfolgte in dieser Arbeit mit dem Ionenchromatographen Dionex ICS-1100 der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA). Damit wurden folgende Ionen analysiert und quantifiziert: NO₃⁻, NO₂⁻, PO₄³⁻, SO₄²⁻, NH₄⁺. Allgemein besteht ein IC aus einer Pumpe, einem Eluenten (mobile Phase), einem Injektor plus Autosampler, einer Vor- und einer Trennsäule (stationäre Phase), einem elektrolytischen Suppressor und einem Leitfähigkeitsdetektor. Die Pumpe befördert den Eluenten durch das gesamte System. Der Injektor injiziert die zu analysierende Probe in die mobile Phase, wodurch sie zur analytischen Trennsäule transportiert wird, an der eine Ionenaustauschreaktion zwischen Analyt und Trennsäule stattfindet. Jede Substanz weist eine unterschiedliche Affinität zur stationären Phase auf. Der Eluent löst nach einer gewissen Zeit (Retentionszeit) die gebundenen, ausgetauschten Ionen wieder von der Säule, wodurch mit Hilfe des Leitfähigkeitsdetektors (DS6 Heated Conductivity Cell, Thermo Fisher Scientific) ein qualitativer und quantitativer Nachweis des Analyten stattfindet, da jeder Analyt eine spezifische Retentionszeit aufweist. Bevor die mobile Phase jedoch zum Leitfähigkeitsdetektor gelangt, durchströmt sie in den meisten Fällen noch einen Suppressor,

eine Ionenaustauschsäule in Form von Wasserstoff. Er dient dazu, die Grundleitfähigkeit des Eluenten zu verringern.

Je nachdem, ob Anionen oder Kationen bestimmt werden sollen, kommen unterschiedliche Säulen (Anionenaustausch- oder Kationenaustauschsäule) zum Einsatz. In der vorliegenden Arbeit wurden zwei unterschiedliche Säulen verwendet: eine Anionenaustauschsäule IonPac™ AS9-HC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) und eine Kationenaustauschsäule IonPac™ SCS 1 (Thermo Fisher Scientific) mit jeweils zugehörigen Vorsäulen (Dionex™ IonPac™ AG9-HC Guard Column und Dionex™ IonPac™ SCG 1 Guard Column).

Kam die IonPac™ AS9-HC zum Einsatz, wurde zusätzlich auch ein Suppressor AERS 500 (2 mm) (Thermo Fisher Scientific) verwendet, welcher bei 12 mV betrieben wurde. Der Eluent bestand aus 9 mM NaHCO₃ (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). Die Trennsäule IonPac™ SCS 1, die zur Analyse von Kationen zum Einsatz kam, wurde hingegen ohne Suppressor betrieben. Der Eluent war hier 3 mM CH₃SO₃H (Sigma-Aldrich). Der Fluss wurde bei beiden Säulen auf 0,25 ml/min eingestellt und ein Lauf dauerte 30 min.

Die Probenvorbereitung erfolgte, indem jede Probe mit 0,2 µm PTFE-Spritzenvorsatzfiltern der Firma VWR (Radnor, USA) filtriert wurde. Anschließend wurden 2 ml der Probe in IC-Vials (Thermo Fisher Scientific) gefüllt und mit dem dazugehörigen Filterdeckel verschlossen. Bei hohen Konzentrationen wurden die Proben mit ddH₂O entsprechend verdünnt, so dass eine Konzentration von 1,5 mM nicht überschritten wurde. Die Quantifizierung der verschiedenen Ionen wurde über eine Kalibration bewerkstelligt. Hierfür wurde für die Anionenaustauschsäule eine Stocklösung aus 20 mM KNO₃, 10 mM NaNO₂, 10 mM K₂HPO₄, 10 mM (NH₄)₂SO₄ und für die Kationenaustauschsäule eine Stocklösung aus 20 mM NH₄Cl, 20 mM KNO₃, 20 mM NaNO₂ hergestellt, welche anschließend entsprechend verdünnt wurde, so dass eine Kalibriermessreihe mit zehn Messpunkten (0,025 mM bis 1,5 mM) zu Stande kam. Mit Hilfe der Eichgerade und der Software Chromeleon 7 (Thermo Fisher Scientific) konnte dann eine qualitative und quantitative Aussage über die Analyten getroffen werden.

2.3.2 Hach-Küvettentests

In manchen Fällen war die Bestimmung von Stickstoffverbindungen mit dem IC nicht möglich, wie zum Beispiel bei der Kalibration der Messsensoren der Monitoring-Station vor Ort. Um hierfür einen direkten Vergleichswert zeitnah zu erhalten, wurden die Parameter (NO₃⁻, NO₂⁻, NH₄⁺) mit Küvettentests der Firma Hach (Loveland, USA) bestimmt. Die

Proben wurden wieder durch PTFE 0,2 µm Spritzenvorsatzfilter (VWR, Radnor, USA) gegeben. Im weiteren Verlauf wurde für den jeweiligen Test nach Angaben des Herstellers verfahren. Insgesamt kamen vier verschiedene Küvettentests zum Einsatz: Nitrat 0,23-13,5 mg/l NO₃-N (LCK 339), Nitrit 0,015-0,6 mg/l NO₂-N (LCK 341), Nitrit 0,6-6,0 mg/l NO₂-N (LCK 342) und Ammonium 0,015-2,0 mg/l NH₄-N (LCK304). Falls die Konzentration außerhalb des Messbereiches lag, wurde die Probe entsprechend mit ddH₂O verdünnt. Die Messung der Proben erfolgte mit einem DR3900 Spektralphotometer der Firma Hach (Loveland, USA).

2.3.3 Gaschromatographie (GC)

Bei der Gaschromatographie handelt es sich um eine Verteilungschromatographie, die zur Auftrennung verschiedener Gasgemische eingesetzt wird. Wie bei der Ionenchromatographie gibt es hier eine mobile (Inertgase beispielsweise Helium) und eine stationäre (flüssige) Phase (meist Kapillarsäulen). Die Probensubstanz wird wieder in die mobile Phase injiziert und so zur Säule transportiert, wobei sie zuvor im Injektor stark erhitzt wird und somit verdampft. An der Säule verweilen die Analyten je nach Polarität und Dampfdruck unterschiedlich lang und werden nach Verlassen an einem Detektor gemessen. Allgemein gibt es verschiedene Detektortypen von sehr selektiven wie zum Beispiel dem Elektronenfangdetektor (ECD) oder dem Flammenphotometrischen Detektor (FPD) hin zu universellen Detektoren wie dem Flammenionisationsdetektor (FID) oder dem Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD).

Die Analyse der Gaszusammensetzung erfolgte in dieser Arbeit mit einem Agilent 490 Mikro Gaschromatographen (GC) der Firma Teckso (Neukirchen-Vluyn). Der Mikro GC enthielt zwei installierte Säulen, eine Molekularsieb 5A PLOT (MS5A) (0,25 mm ID, 10 m) und eine PoraPLOT U PLOT (PPQ) (0,25 mm ID, 10 m). Die Detektion der Gase erfolgte mit einem Mikro-Wärmeleitfähigkeitsdetektor (WLD). Der Mikro GC wurde im Freiland mit nur einem Trägergas (Helium 5.0) und im Labor mit zwei Trägergasen (Helium 5.0 und Argon 5.0), der Firma Basi Schöberl GmbH & Co. KG (Rastatt), betrieben. Die Probennahme erfolgte über eine integrierte Membranpumpe. Die Pumpzeit für die Analysen im Freiland betrug 255 Sekunden. Im Labor war aufgrund der kürzeren Schlauchlänge eine deutlich geringere Anpumpzeit von 15 bis 20 Sekunden ausreichend. Laborproben konnten über Kanülen direkt an den Mikro GC angeschlossen werden und über das Multipositionsventil (zehn Anschlüsse) nacheinander angesteuert und gemessen werden. Ein Lauf dauerte in der Regel fünf Minuten bei einer Temperatur von 70°C für die MS5A-Säule und 45°C für die

PPQ-Säule sowie bei einem Druck von 150 kPa für beide Säulen. Die Temperatur des Injektors betrug immer 110°C. Die Säulen wurden vor Partikeln und Feuchtigkeit durch einen integrierten Genie Membranfilter geschützt. Zusätzlich wurde der Mikro GC regelmäßig bei 180°C Säulentemperatur und 300 kPa zur Reinigung ausgeheizt. Die Kalibration verschiedener Gase (CH₄, CO₂, H₂, N₂, O₂, N₂O) wurde mit Gasgemischen bestimmter Konzentrationen bewerkstelligt. Kalibriergasgemische waren zum einen 1 Vol.-% CH₄, 1 Vol.-%, CO₂, 1 Vol.-% H₂, 97 Vol.-% N₂ und 500 ppm N₂O (Rest N₂) sowie 80 Vol.-% H₂, 20 Vol.-% CO₂, welche bei der Firma Air liquide (Paris, Frankreich) gemischt und bestellt wurden. Zudem wurde zur Kalibration noch Raumluft (78 Vol.-% N₂, 21 Vol.-% O₂, 0,03 Vol.-% CO₂) verwendet. Die Auswertung und Kalibration erfolgte mit der Software OpenLAB CDS EZChrom Compact (Agilent, Santa Clara, USA).

2.3.4 Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC)

Der gesamte organische Kohlenstoff einer Probe wurden mit dem TOC-Analysator TH 600, Multi N/C 2100S von Analytik Jena (Jena) untersucht. Der TOC-Gehalt berechnet sich dabei aus der Messung des gesamten Kohlenstoffs TC (engl. für *total carbon*) abzüglich der Konzentration des anorganischen Kohlenstoffs TIC (engl. für *inorganic carbon*).

Für die Bestimmung des TIC wird die Probe zuerst mit 10%-iger Ortho-Phosphorsäure angesäuert, wodurch der anorganische Kohlenstoff zu CO₂ reagiert und ausgetrieben wird. Der CO₂-Gehalt wird mit einem nichtdispersiven Infrarotsensor (NDIR) gemessen. Anschließend wird der TC auf ähnliche Weise ermittelt, allerdings wird hier die Probe direkt ins Verbrennungsrohr injiziert und bei 800°C verbrannt und anschließend das entstandene CO₂ vom NDIR-Detektor gemessen.

Proben wurden immer unfiltriert, jedoch je nach TOC-Gehalt in verschiedenen Verdünnungen in entweder 7 ml oder 2 ml Probegefäße gegeben. Insgesamt wurde jede Probe drei Mal analysiert. Die Auswertung erfolgte mit der Software multiWin® (Analytik Jena).

2.4 Molekularbiologische Methoden

Neben den analytischen Methoden, kamen auch mehrere molekularbiologische Methoden zum Einsatz, die vor allem der Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung dienten.

2.4.1 DNA- und RNA-Isolation

Die Isolation genomischer DNA erfolgte in dieser Arbeit mit drei unterschiedlichen kommerziell erhältlichen Kits. Für die Sequenzierung der 16S-rDNA via Illumina MiSeq wurde die DNA über das innuSPEED Soil DNA Kit von Analytic Jena gewonnen. Als Ausgangsmaterial dienten entweder 12 bis 15 ml des Drainagewassers bzw. des Laborreaktormediums oder 200 mg der Holzhackschnitzeloberfläche. Die Flüssigprobe wurde für 1 min bei maximaler Geschwindigkeit abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 600 µl Lysepuffer (ELS) resuspendiert. Die Holzhackschnitzeloberfläche wurde steril mit einem Skalpell abgenommen und direkt in das Lyse-Reagiergefäß mit *beads* (engl. für Kugeln) gegeben und anschließend ELS-Puffer hinzugegeben. Im weiteren Verlauf wurde mit allen Proben gleich, entsprechend dem Herstellerprotokoll, verfahren. Die mechanische Zellaufspaltung fand in der Zelmühle Mixer Mill 400 (Retsch, Haan) für 7 Minuten bei 30 Hz statt. Die Elution der DNA von der Säule erfolgte anstatt mit 80 µl mit 30 µl Elutionspuffer, um die DNA-Konzentration zu erhöhen. Von jeder Probe wurde dreimal DNA isoliert, damit in der Auswertung ein Triplikat zur Verfügung stand.

Um eine höhere DNA-Ausbeute für die Metagenom-Sequenzierung zu erhalten, wurden noch zwei weitere Kits verwendet. Für die Flüssigphase des Freilandreaktors wurde das DNeasy Power Water Kit (Qiagen, Hilden) verwendet und für die Festphase das DNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen, Hilden). Für die DNA-Isolation der Flüssigphase wurden zuerst 80 ml des Wassers über einen Nitrocellulosemembranfilter (MCE) (0,22 µm, 47 mm) der Firma neolab (Heidelberg) filtriert. Der Filter wurde anschließend in das im Kit enthaltene *bead tube* gegeben und gemäß dem Herstellerprotokoll weiterverarbeitet. Die Vorbereitung für die DNA-Isolation der Festphase erfolgte auf die gleiche Weise wie für die Isolation der 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung.

Die RNA-Isolation für die Metatranskriptom-Sequenzierung der Proben aus der Freilandumweltdenitrifikationsanlage wurde von der Firma IMGW Laboratories GmbH (Martinsried) durchgeführt. Hierfür wurde entweder das RNeasy PowerSoil total RNA Kit von Qiagen (Hilden) für die Flüssigphase oder das miRNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden) für die Festphase (Holzhackschnitzel) verwendet.

Um zu untersuchen, ob eine DNRA nach höheren Nitratzugaben eintritt, wurde DNA und RNA von den Proben (Fest- und Flüssig) isoliert. Hierfür wurden Proben vor Zugabe hoher Nitratkonzentrationen (Tag 27 = Zeitpunkt A) und danach (Tag 173 = Zeitpunkt B) aus den Reaktoren entnommen. Die DNA-Isolation erfolgte wie zuvor beschrieben mit dem

InnuSPEED Soil DNA Kit. Die Flüssigproben (15 ml) für die RNA-Isolation wurden direkt nach Entnahme bei 4°C für 10 min bei 9000 g zentrifugiert. Zuvor wurde noch die optische Dichte (OD) der Kultur bestimmt, damit die passende Menge RNA Protect (Qiagen, Hilden) zugegeben werden konnte, so dass eine OD von 1 erreicht wurde. Dafür wurde dem Pellet die entsprechenden Menge Tris-EDTA (TE)-Puffer der Firma Sigma-Aldrich (Darmstadt) zugegeben. Anschließend wurde die zweifache Menge RNA Protect zugegeben, für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend für 10 min bei 9000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgossen und das Pellet in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bis zur RNA-Isolation bei -80°C gelagert. Der Festphase (Holzhackschnitzel) wurde RNA Protect direkt nach der Entnahme zugegeben, so dass sie bedeckt waren. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

Die RNA-Isolation erfolgte für beide Phasen (flüssig und fest) bei der Laboranalyse mit dem InnuSPEED Bacteria/-Fungi RNA Kit von Analytic Jena gemäß dem Herstellerprotokoll. Bei der Festphase (Holzhackschnitzel) wurde zuvor die Oberfläche abgeschnitten und in kleinen Stücken in das Reagiergefäß gegeben und anschließend mit 100 µl der RL Solution versetzt. Nach der RNA-Isolation wurde die RNA mit dem DNA-free™ DNA Removal Kit (Promega, Fitchburg, USA) behandelt, um verbliebene DNA zu entfernen. Die Durchführung erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. Die Lagerung der Proben fand bis zur Sequenzierung wieder bei -80°C statt.

2.4.2 Quantifizierung von DNA und RNA

Die nach der Isolation erhaltene DNA und RNA wurde mittels eines NanoDrop 2000 von Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) quantifiziert. Hierfür wurde 1 µl der DNA/RNA-Probe aufgetragen und bei 260 nm photometrisch gemessen.

2.4.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Bevor die DNA und RNA sequenziert wurde, erfolgte eine Überprüfung mittels PCR, ob die DNA-Isolation, beziehungsweise die Hydrolyse der DNA bei der RNA-Isolation, erfolgreich war. Mit Hilfe thermostabiler Polymerasen, Primer und dNTPs lassen sich bestimmte DNA-Abschnitte vervielfältigen. In dem vorliegenden Fall war das Ziel-Gen jenes, welches für die 16S-rRNA kodiert. Bei einer PCR wird die DNA zuerst bei 95°C bis 98°C denaturiert. Anschließend wird die Temperatur primer-spezifisch gesenkt, so dass diese an die

komplementäre DNA binden können. Eine Erhöhung der Temperatur auf 72°C bewirkt die Aktivierung der Polymerase, welche den komplementären DNA-Strang mit Hilfe von dNTPs amplifiziert. Dabei handelt es sich um eine Kettenreaktion, da die neu gebildeten DNA-Stränge im nächsten Durchlauf als Vorlage dienen. Auf diese Weise werden bestimmte Abschnitte vervielfältigt.

Mit der genomischen DNA, welche für die 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung gewonnen wurde, erfolgte eine Test-PCR mit jenen Primern, die später auch für die Sequenzierung verwendet wurden (Kap. 2.2.5, Tabelle 6). Hierfür wurde entweder die PCR-BIO HiFi Polymerase der Firma PCR Biosystems Ltd. (London) oder die Phusion High-Fidelity DNA Polymerase der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) verwendet. Beide Polymerasen beinhalten eine Korrekturlese-Funktion, welche Ergebnisse akkurater und schneller amplifiziert als eine Taq-Polymerase, womit die Fehlerrate gering gehalten werden sollte. Standardansätze für die beiden Polymerasen sind in Tabelle 14 und 16 aufgeführt sowie die dazugehörigen Programme in Tabelle 15 und 17. Bei jedem PCR-Lauf wurde auch eine Positiv- und Negativkontrolle analysiert.

Tabelle 14: Standardansatz (25 µl) für die PCR mit der PCR-BIO HiFi Polymerase.

Komponente	Menge [µl]
Primer <i>forward</i> (2 pmol/µl)	2
Primer <i>reverse</i> (2 pmol/µl)	2
5× Hifi Buffer	5
HiFi Polymerase	0,25
DMSO	0,75
Nuklease-freies Wasser	14
Template	1

Tabelle 15: Standardprogramm der Test-PCR für die 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung mit der Hifi-Polymerase.

Temperatur [°C]	Zeit [min]	Schritt
95	5:00	Initiale Denaturierung
95	0:15	Denaturierung*
Spezifische Primer-Temp. (56 Bakterien-Primer, 48-50 Archaea-Primer)	0:30	Primer-Bindung*
72	0:20	Elongation*
72	10:00	Finale Elongation

* 30 Zyklen

Tabelle 16: Standardansatz (25 μ l) für die Phusion *High-Fidelity*-PCR.

Komponente	Menge [μ l]
Primer <i>forward</i> (10 μ M)	1,25
Primer <i>reverse</i> (10 μ M)	1,25
2 \times Phusion Master Mix	12,5
DMSO	0,75
Nuklease-freies Wasser	8,25
Template	1

Tabelle 17: Standardprogramm der Test-PCR für die 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung mit der Fusion-Polymerase.

Temperatur [$^{\circ}$ C]	Zeit [min]	Schritt
98	0:30	Initiale Denaturierung
98	0:10	Denaturierung*
Spezifische Primer-Temp. (56 Bakterien-Primer, 48-50 Archaea-Primer)	0:30	Primer-Bindung*
72	0:20	Elongation*
72	10:00	Finale Elongation

* 30 Zyklen

2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Amplifizierte PCR-Produkte können der Größe nach über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt werden und somit das Vorhandensein eines spezifischen Gens überprüft werden. Hierbei wandert die negativ geladene DNA abhängig ihrer Größe schneller oder langsamer durch das Agarose-Gel zur Anode. Die Gele wurden dementsprechend hergestellt, dass sie 1% Agarose beinhalten. Die Agarose wurde mit TAE-Puffer (Tabelle 18) erhitzt und anschließend pro 10 ml Lösung 1 μ l Midori Green Advance (Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf) zugegeben. Midori Green bindet an die DNA und emittiert nach Anregung mit UV-Licht grünes Licht, wodurch die DNA-Fragmente sichtbar gemacht werden. Das erhitzte Gel wurde in einen mit Kämmen versehenen Gelschlitten gegossen, um kleine Taschen im Gel zu formen. Nachdem das Gel ausgehärtet war, wurde es in eine Elektrophoresekammer (PerfectBlue™ Mini S, PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen) mit TAE-Puffer gegeben und die amplifizierte DNA zusammen mit DNA Gel Loading Dye (6 \times) (Thermo Fisher Scientific, Waltham) in die Taschen pipettiert. Als Größenstandard

wurde bei jedem Lauf noch ein 1kb-DNA-Marker (*GeneRuler*) von Thermo Fisher Scientific geladen. Durch das Anlegen einer konstanten Spannung von 120 V (PowerPac™ HC, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) wanderten die DNA-Fragmente in Richtung Anode. Die Auswertung der Gele erfolgte über einen ChemiDoc™ XRS+ (Bio-Rad Laboratories GmbH, München) und die zugehörige Software Image Lab 5.1.

Tabelle 18: Zusammensetzung des 1x TAE-Puffers.

Substanz	Menge
Tris-HCl, pH 8	4,85 g
EDTA	0,37 g

* pH-Wert mit Acetat auf 8 eingestellt

2.5 Sequenziermethoden – Illumina Sequenzierung

In der vorliegenden Arbeit kam für die Analyse der mikrobiellen Diversität via 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung sowie für die Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse der Umweltdenitrifikationsanlage und der Laborversuche die Illumina-Sequenzierung zum Einsatz. Im Gegensatz zur Sanger-Sequenzierung gehört diese Technologie zu den *Next Generation Sequencing* (NGS) Methoden. Ein Vorteil der NGS Technologie ist, dass Millionen DNA-Fragmente gleichzeitig sequenziert werden können, was zu einem sehr hohen Durchsatz bei vergleichsweise niedrigen Kosten führt.

Da die Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung über verschiedene Jahreszeiten hinweg mit Hilfe der 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung mit 2×250 bp stattfinden sollte, war es wichtig, dass das DNA-Fragment eine Größe von ungefähr 500 bp besaß, wonach dementsprechend die Primer gewählt werden mussten (Kap. 2.2.5, Tabelle 6). Bei der Metagenom-Analyse findet die Sequenzierung primerunabhängig statt, da hier das gesamte Metagenom und nicht nur ein spezifischer Teil des Genoms sequenziert wird. Die DNA wird daher zuerst enzymatisch fragmentiert. Anschließend erfolgt eine Reparatur der Enden, eine 5' Phosphorylierung sowie ein dA-Tailing, wodurch die Ligation der Illumina-kompatiblen Adapter möglich wird. Bei der Metatranskriptom-Analyse muss für die Sequenzierung die RNA zuerst in cDNA umgeschrieben werden. Hierfür wird, ähnlich wie bei der Metagenom-Analyse, die RNA zuerst enzymatisch fragmentiert, nachdem die rRNA abgereichert wurde. Anschließend kann die reverse Transkription erfolgen, bei welcher der erste Strang cDNA generiert wird. Bei der Synthese des zweiten Stranges wird anstelle von Desoxythymidintriphosphat (dTTP) Desoxyuridintriphosphat (dUTP) eingebaut, um eine

Amplifikation zu verhindern. Zusätzlich werden die 3'-Enden adenyliert, wodurch hier die Adapterbindung ermöglicht wird.

Anschließend wird für die Metagenom-, Metatranskriptom-Analyse und die 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung ähnlich verfahren. Zuerst werden über *reduced cycle amplification* Adapter ligiert, die verschiedene Motive enthalten. Diese beinhalten zum einen die Primerbindestelle, welche für die spätere Sequenzierung benötigt werden und sogenannte Index-Regionen, welche der kundenspezifischen Unterscheidung der Proben dienen. Des Weiteren werden noch Bindestellen, die komplementär zu den an der *Flow-cell* (engl. für Glasobjektträger) angebrachten Oligos sind, eingebracht. Diese fixieren die zu sequenzierende DNA auf dem Objektträger. Im nächsten Schritt erfolgt die *Cluster generation* (engl. für Clusterbildung). Hierfür wird die DNA auf die *Flow-cell* aufgebracht, die mit zwei verschiedenen Oligo-Typen versehen ist, wobei ein Oligo-Typ zuerst noch blockiert ist. Somit können die Fragmente nur mit der einen Adapterregion an die komplementären Oligos auf der *Flow-cell* binden. Polymerasen amplifizieren dann den an der *Flow-cell* gebundenen Strang, welcher nach der Amplifizierung gewaschen wird. Anschließend erfolgt die sogenannte *bridge amplification* (engl. für Brückenvervielfältigung). Dabei biegt sich der DNA-Strang mit dem ungebundenen Ende zum anderen Oligo-Typ auf der *Flow-cell* und bindet daran. Eine Polymerase amplifiziert wieder den komplementären Strang. Nach anschließender Denaturierung sind zwei Kopien des Fragments entstanden. Anschließend beginnt der Prozess wiederholend von vorne, wobei viele Cluster aus klonal amplifizierten DNA-Fragmenten des Original-Fragments entstehen. Der *reverse*-Strang wird abgeschnitten und gewaschen, wodurch nur noch der *forward*-Strang vorhanden ist.

Nun kann die Sequenzierung beginnen, die mit dem ersten Sequenzierprimer startet, welcher an die komplementäre Sequenz in der Adapterregion bindet und somit den *read 1* produziert. Charakteristisch für die Illumina-Sequenzierung ist die sogenannte *sequencing-by-synthesis* (SBS)-Methode. Die *Flow-cell* wird mit vier unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Nukleotiden geschwemmt und nur eines wird passend zur Sequenz der Template-DNA eingebaut. Anschließend wird die Fluoreszenzgruppe abgespalten, das Lichtsignal detektiert sowie die Terminatorgruppe entfernt, wodurch ein weiteres fluoreszenzmarkiertes Nukleotid eingebaut werden kann. Für ein Cluster werden alle identischen Stränge gleichzeitig ausgelesen, wodurch das Fluoreszenzsignal verstärkt und für den Detektor messbar wird. Mehrere hundert Cluster können somit parallel sequenziert werden. Nach Sequenzierung des ersten *reads*, wird dieser gewaschen und die Sequenzierung von *read 2* beginnt. Hierbei biegt sich der *forward*-Strang wieder zum anderen *Flow-cell* Adapter und wird amplifiziert.

Anschließend wird der *forward*-Strang abgewaschen und der zweite *read* wird auf dieselbe Weise wie *read* 1 sequenziert. Dabei kommt es zur sogenannten *paired-end* Sequenzierung, wobei eine festgelegte Leseweite zu einer Überlappung der beiden *reads* führt, die später zusammengesetzt (engl.: *merge*) werden können.

Die Amplikonsequenzierungen der 16S-rRNA-Gene für Bacteria und Archaea sowie die Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung in dieser Arbeit wurde von der Firma IMG/M Laboratories GmbH (Martinsried) durchgeführt. Die 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung erfolgte auf einer Illumina MiSeq Plattform mit 2×250 bp (PE250). Die Metagenom-Sequenzierung erfolgte auf einer Illumina NovaSeq 6000 Plattform mit dem S2 Sequenzierreagenzien-Kit (300 Zyklen) und die Metatranskriptom-Analyse wurden auf einer Illumina NextSeq 500 Sequenzierungsplattform und dem High Output Kit v2.5 (150 Zyklen) mit einer erwarteten *coverage* (engl. für Abdeckung) von 100 Millionen *reads* pro Probe durchgeführt. Bei der Metagenom-Analyse wurden *paired-end* 150 bp *reads* (PE150) und bei der Metatranskriptom-Analyse *single-end* 150 bp *reads* (SR150) sequenziert. Die *library* Erstellung der Metagenom-Analyse erfolgte mittels des NEBNext UltraTM II FS DNA Library Prep Kit für Illumina (New England Biolabs, Frankfurt am Main), jene für die Metatranskriptomanalyse mit dem TruSeq Stranded total RNA HT und dem Ribo-Zero Bacteria Kit für die rRNA Abreicherung (Illumina, San Diego, USA).

Das Ausgangsmaterial für die Analysen stellte die in Kapitel 2.4.1 isolierte DNA und RNA dar.

2.6 Bioinformatische Auswertung

Die bioinformatische Auswertung des in Kapitel 2.5 sequenzierten Materials wurde mit verschiedenen Softwareprogrammen bewerkstelligt, welche im Folgenden vorgestellt werden. Die bioinformatische Auswertung des Metatranskriptoms der Laboranalyse erfolgte durch Dr. Andreas Bremges unter der Leitung von Prof. Alice McHardy vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung in Braunschweig.

2.6.1 Auswertung der 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung

Die Auswertung der Triplikate der 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung, welche die mikrobielle Zusammensetzung des Biofilms auf den Holzhackschnitzeln sowie der

planktonischen Phase aufzeigen sollte, wurde mit der CLC Genomic Workbench Software 12.0 sowie dem Plugin Microbial genomic module 4.0 bewerkstelligt. Zuvor wurde von der Firma IMG/M Laboratories GmbH (Martinsried, Deutschland) mit der Illumina-Software MiSeq Reporter (MSR) v2.5.1.3 und dem Illumina Analysis Viewer (SAV) v1.9.1 die Performance und technische Qualität des Sequenzierlaufs visualisiert, bearbeitet und evaluiert. Hierfür wurden die Adaptersequenzen am 3'-Ende getrimmt und die Sequenzen anhand der Indices *de-multiplexed*. Diese Roh-Sequenzen wurden dann mit der CLC Genomic Workbench weiter ausgewertet. Der *Workflow* umfasste sechs Schritte:

1. Trimmen der *reads* (Primersequenzen und Qualität)
2. Zusammenführen (engl.: *merge*) der *reads*
3. Trimmen nach *read*-Länge
4. *Operational taxonomic unit* (OTU)-Clustering
5. Entfernung von OTUs mit geringer Abundanz
6. Weitere bioinformatische Analysen wie die Bestimmung der alpha- und beta-Diversität

Im ersten Schritt wurden, die für die Sequenzierung benötigten Primersequenzen, getrimmt und *reads* mit einer geringen Qualität entfernt. Als Grenzwert der Qualität wurde ein p-Wert von 0,05 angegeben, zudem wurden mehrdeutige Nukleotide mit einer maximalen Anzahl von zwei getrimmt. Zusätzlich wurden noch die entsprechenden Primer-Sequenzen getrimmt. Schritt zwei und drei wurden in späteren Versionen des CLC *Workflows* intern gehandhabt und somit mussten hierfür keine Parameter eingegeben werden. Anschließend kann mit dem OTU-Clustering fortgefahren werden, wobei die 16S-rDNA-Sequenzen zu *Clustern*, sogenannte OTUs, zugeordnet werden. Hierfür werden die *reads* für jede Probe gebündelt und auf repräsentativen Sequenzen reduziert, die 97% Ähnlichkeit zu jedem Mitglied des Clusters aufweisen. Als Referenzdatenbank für die phylogenetische Zuordnung der OTUs kam die SILVA 16S v128 Datenbank zum Einsatz. Außerdem wurden noch chimäre Sequenzen, welche häufig Artefakte aus PCR-Reaktionen darstellen, erkannt und entfernt. Zusätzlich wurden, um die Visualisierung des OTU-Clustering Ergebnisses zu vereinfachen, aus den Proben, die mit Bakterien-Primern sequenziert wurden, alle OTUs entfernt, die über alle Proben hinweg eine geringere Abundanz als 50 *reads* aufwiesen. Bei den Proben, die mit Archaea-spezifischen Primern sequenziert wurden, kam es zu keiner Entfernung von OTUs, da hier insgesamt deutlich weniger OTUs gebildet werden konnten also für die Bakterienproben.

2.6.2 Bioinformatische Auswertung der Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung

Eine funktionale und taxonomische Annotation sollte für die Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung der Freilanddenitrifikationsanlage durchgeführt werden, wobei mehrere kommandozeilenbasierte Programme verwendet wurden. Für die funktionale Annotation - folglich welche Gene vorhanden sind und von welchem Organismus diese stammen - wurden zuerst alle Rohsequenzen nach Qualität gefiltert und noch vorhandene Adapter entfernt. Hierfür wurde die Software Trimmomatic (v.0.38) mit den folgenden Argumenten: “LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:4:15 MINLEN:1014“ verwendet (Bolger *et al.*, 2014). Da längere *reads* das anschließende Metagenom-*Assembly* (engl. für Zusammenfügen) verbessern können, wurden die getrimmten überlappenden *paired-end reads* noch vereinigt. Dies wurde mit der Software FLASH (v1.2.11) und den folgenden Einstellungen: -m 50 -r 150 -f 250 -s 100 -x 0.15 -z -t4 bewerkstelligt (Magoč und Salzberg, 2011). Die zusammengefügte Sequenzen wurden anschließend mit dem Programm Megahit assembliert (Li *et al.*, 2015). Dabei wurden folgende Parameter verwendet: ein k-mer Umfang von 21 – 141 und eine Schrittgröße von 20. Nach dem *Assembly* des Metagenoms ist es notwendig die CDS (engl. *coding sequence*) zu bestimmen, also jene Regionen der DNA, die für Proteine kodieren. Hierfür kam das Programm Prodigal (v2.6.1) zum Einsatz (Hyatt *et al.*, 2010). Da es sich im vorliegenden Fall um ein Metagenom handelte, wurden die Einstellungen -p meta verwendet und zusätzlich auch mit -a die Protein-Translationsdatei ausgegeben. Bei der Annotation der Gene werden die CDS gegen bekannte Datenbanken abgeglichen, um somit die Funktion und die zugehörige phylogenetische Zuordnung herauszufinden.

Die Annotation der Gene erfolgte im vorliegenden Fall auf zwei verschiedene Weisen. Zum einen wurden mit Hilfe des Programms DIAMOND (v.0.9.24) die translatierten CDS mit blastp im *sensitive mode* gegen die gesamte Uniprot-Datenbank (Freigabe 28.05.2019, *entry version 36*) als Referenzdatenbank abgeglichen (Buchfink *et al.*, 2014). Zum anderen erfolgte eine weitere funktionale Annotation mit der Software eggNOG gegen die aktuellste KEGG-Datenbank als Referenzdatenbank mit einem Protein-Protein Blast (Huerta-Cepas *et al.*, 2019). Dies erfolgte, da mit diesem Programm die KEGG *Orthology* Nummer (KO) mitgeliefert wurden mit deren Hilfe Markerenzyme bestimmter Stoffwechselwege einfacher identifiziert werden können. Die Annotationen der Uniprot und KEGG-Datenbank wurden für die Enzyme von Interesse verglichen und bei einem nicht übereinstimmenden Ergebnis

nochmals einem Protein-BLAST gegen die NCBI-Datenbank unterzogen, um eines der Annotationsergebnisse zu verifizieren.

Das Vorhandensein eines Gens sagt noch nichts über dessen Aktivität aus. Daher ist das Metatranskriptom von Bedeutung, mit dessen Hilfe eine Aussage möglich ist, ob und wie stark ein Gen exprimiert ist, was in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von TPM (engl.: *Transcripts per Kilobase Million*) angegeben wird. Der TPM ist eine Normalisierungsmethode für RNA-Seq Proben und wird wie folgt berechnet: Zuerst wird die Roh-read-Anzahl durch die Länge der einzelnen Gene in Kilobasen dividiert, was die *reads* pro Kilobase (RPK) beschreibt. Anschließend werden all RPK-Werte in einer Probe zusammengezählt und anschließend durch 10^6 geteilt, womit ein Skalierungsfaktor erhalten wird. Durch anschließende Division dieses Werts durch die RPK-Werte wird der TPM erhalten. Die Summe aller TPMs in jeder Probe ist dieselbe, wodurch eine bessere Vergleichbarkeit verschiedener Proben erreicht wird. Die Expression eines Gens in TPM wurden in dieser Arbeit mit dem Programm Kallisto (v0.45.0) berechnet (Bray *et al.*, 2016). Zuerst musste ein Index erstellt werden, wofür die kodierenden Sequenzen des Metagenoms als Input verwendet wurden. Anschließend wurden die getrimmten und qualitativ hochwertigen FASTQ-Dateien des Metatranskriptoms gegen diesen Index mit *kallisto quant* und den Standardeinstellungen *pseudo-aligned*. Anschließend konnten die TPMs entsprechender Enzyme mit der zugehörigen funktionalen Annotation über die *gene identifier*-Nummer zusammengefügt werden.

Neben der funktionalen Annotation des Metagenoms wurde auch noch eine taxonomische Klassifikation der Metagenom-Sequenzierung durchgeführt. Hierfür kam die Software Metaxa2 (v2.2) zum Einsatz (Bengtsson-Palme *et al.*, 2015). Aus den qualitätsgetrimmten Sequenzierdatensätzen wurden mit Hilfe dieser Software die Markergene der kleinen ribosomalen Untereinheit (SSU; 16S/18S) bestimmt und anschließend deren taxonomische Herkunft zugewiesen. Als Referenzdatenbank wurde hier, wie bereits zuvor bei der 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung, die SSU_SILVA128 Datenbank verwendet. Diese wurde über den Metaxa2 *database builder* installiert sowie weitere Analysen mit den Metaxa2 Diversität-Tools durchgeführt (Bengtsson-Palme *et al.*, 2018).

2.7 Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH)

Mit Hilfe der FISH können Zellen kultivierungsunabhängig in ihrem natürlichen Lebensraum spezifisch angefärbt und somit nachgewiesen werden. Hierfür werden rRNA-bindende DNA-Sonden mit einem gekoppelten Fluoreszenzfarbstoff in die Mikroorganismen eingebracht.

Bevor die Hybridisierung der Sonde stattfinden kann, müssen die Zellen zuerst noch mit Formaldehyd fixiert werden und die Zellmembran für die Sonde durchlässig gemacht werden. Da die Sonde an die rRNA bindet, ist die Nachweisbarkeit von Mikroorganismen gewissermaßen auch von der Anzahl der Ribosomen abhängig, worüber auch eine Aussage über die Aktivität der Organismen getroffen werden kann.

In dieser Arbeit wurde mit allen Triplikaten der Methanogenen-Kulturen zu den jeweiligen Zeitpunkten (t1, t2, t3, t4) eine FISH-Analyse mit Eubacteria- und Archaea-Sonden (Kap. 2.2.6.1, Tab. 7) durchgeführt.

Probenfixierung

Die Zellen müssen zuerst getötet und aufgrund des schnellen rRNA-Abbaus nach dem Zelltod fixiert werden. Hierfür wurde 1 ml der Zellkultur bei 16000 g für zwei Minuten abzentrifugiert und das Pellet anschließend mit 1 ml einer 4%-igen Formaldehydlösung in 1×PBS-Puffer resuspendiert und bei 4°C 1 Stunde fixiert. Anschließend folgten zwei Waschriffe mit 1×PBS (Kap. 2.2.6.2, Tab. 8) und zum Schluss wurde das Pellet in 1 ml eines 50:50 Gemisch aus 100% Ethanol und 1×PBS aufgenommen. Die Proben können anschließend bei -20°C gelagert werden.

Immobilisierung

Die Proben mussten vor der Permeabilisierung auf einem Objektträger immobilisiert werden. Je 10 µl jeder Probe wurden auf einen PTFE-beschichteten Objektträger (Diagnostic Microscope Slide, 8 well, Thermo Fisher Scientific) aufgetragen und anschließend bei 37°C getrocknet. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% (*low melt*) Agarose in 1×PBS zusätzlich auf dem Objektträger befestigt, indem ein bis zwei Tropfen auf die Probe gegeben und anschließend bei 37°C getrocknet wurden. Anschließend folgte die Dehydrierung der Zellen mit Hilfe einer Ethanolreihe (50%, 80%, 100%), in welcher sich die Objektträger jeweils für 3 Minuten befanden.

Permeabilisierung

Die Permeabilisierung der Zellen musste vor der Hybridisierung der Sonde stattfinden, damit diese in die Zelle eindringen kann. Dies erfolgte mit einer 10-minütigen Inkubation in 0,1 M HCl, welche auch endogene Peroxidasen inhibieren sollte. Nach einem kurzen Eintauchen in ddH₂O und der anschließenden Trocknung bei 37°C waren die Proben bereit für die Hybridisierung.

Hybridisierung

Pro Probe wurden 15 µl Hybridisierlösung (13 µl Hybridisierungspuffer + 1 µl Sonde 1 + 1 µl Sonde 2) aufgetropft. Da die hier verwendeten Sonden dieselbe FA-Konzentration benötigten (20%), konnten diese zeitgleich zugegeben werden. Aufgrund der Lichtempfindlichkeit der Farbstoffe, musste ab diesem Zeitpunkt im Dunkeln gearbeitet werden. Die Objektträger wurden in feuchte Kammern mit Kimtech-Tüchern (Roth, Karlsruhe), die dieselbe Formamidkonzentration wie die Sonden hatten, gegeben und anschließend für 1,5 bis 3 h bei 46°C inkubiert. Die Sonden und ihre entsprechende FA-Konzentration, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Kapitel 2.2.6.1., Tab. 7 aufgelistet.

Die Objektträger wurden im Anschluss in einem auf 48°C vorgewärmten Waschpuffer (Kap. 2.2.6.2, Tab. 11) getaucht, um die Hybridisierlösung abzuwaschen und danach 15 min in einen neuen Waschpuffer für dieselbe FA-Konzentration bei 48°C inkubiert. Es folgte ein kurzes Eintauchen in ddH₂O und ein 10-minütiger Waschschrift in 1×SSC-Puffer (Kap. 2.2.6.2 Tab. 12) bei Raumtemperatur, welcher die Hintergrundfluoreszenz verringern sollte. Anschließend wurden die Objektträger wieder kurz in ddH₂O getaucht und bei 37°C getrocknet.

DAPI-Färbung

Eine Gegenfärbung der Proben erfolgte mit DAPI (4',6'-Diamidin-2-Phenylindol; 1 µg/ml). DAPI bindet an jegliche DNA und färbt somit alle Zellen einer Probe an. Hierfür wurden 15 µl DAPI pro Probe aufgetragen und 5 min im Dunkeln inkubiert. Es folgten zwei Waschriffe in ddH₂O und ein kurzes Eintauchen in 100% Ethanol. Ein Einbettpuffer (Kap. 2.2.6.2, Tab. 13) sollte das vorzeitige Ausbleichen der Farbstoffe sowie die Befestigung des Deckgläschens auf dem Objektträger bewerkstelligen, indem auf jede Probe ein Tropfen gegeben und das Deckgläschen sanft angedrückt wurde. Die anschließende Lagerung der Objektträger erfolgte bei -20°C.

2.7.1 Fluoreszenzmikroskopie

Die Fluoreszenzmikroskopie ist eine lichtmikroskopische Methode, bei der fluoreszente Substrate (Fluorophore) kurzwelligeres Licht absorbieren, somit kurzzeitig auf ein höheres Energieniveau gelangen und beim Zurückkehren in den Grundzustand Licht einer längeren Wellenlänge emittieren (Stokes-Verschiebung). Ein Anregungsfilter filtert die geeignete

Wellenlänge heraus und leitet diese über einen dichromatischen Spiegel zur Probe. Dieser besitzt eine kritische Wellenlänge, der kürzere Wellenlängen zum Präparat reflektiert und das längerwellige, emittierte Licht durchlässt. Durch einen Emissionsfilter wird das restliche Anregungslicht herausgefiltert und so nur die entsprechende Emissionsfarbe über den Detektor wahrgenommen.

Das für die FISH-Analyse verwendete Fluoreszenzmikroskop war eine Leica Typ DM5500B. Die Proben auf dem Objektträger wurden durch ein 100× Objektiv (HCX PL PLOUTAR 100×/1,3 Oil) betrachtet. Dieses war verbunden mit entsprechenden Filterwürfeln (A4, L5, Y3) für die jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe. Für den Anregungsbereich UV wurden der Anregungsfilter BP 360/40 und Entstörfilter BP 470/40 verwendet, für den blauen Anregungsbereich der Filter BP 480/40 und Entstörfilter BP 527/30 und für den grünen Anregungsbereich der Anregungsfilter BP 545/30 und Entstörfilter BP 610/75. Bilder der Mikroskopie wurden mit der Kamera DFC360FX sowie der Leica Software LAS-AF erstellt.

3 Ergebnisse

3.1 Monitoring der Freilandanlage

3.1.1 Stickstoff-Spezies, TOC, pH und Temperatur

Im Folgenden werden die Messergebnisse der Monitoring-Station für Stickstoffverbindungen (NO_3^- , NO_2^- , NH_4^+) sowie für den TOC, den pH-Wert und die Temperatur beschrieben. Bei den Messungen wurde das Wasser abwechselnd vom Zulauf und jeweils eine Stunde später vom Ablauf angepumpt und analysiert.

Nitrat

Abbildung 19 zeigt die Nitratkonzentrationen des Zu- und Ablaufs der Umweltdenitrifikationsanlage D7 (A) sowie die Nitratentfernungseffizienz in Prozent (B) für den Zeitraum vom 03.07.2016 bis zum 26.06.2019. Zudem sind die monatlich analysierten Kontrollwerte für den Zu- und Ablauf dargestellt, die in den meisten Fällen mit der Messung der Nitratkonzentrationen der Messstation übereinstimmen. Lediglich im November 2017 lag der Nitratkontrollwert des Ablaufs etwas höher als der gemessene Wert der Monitoring-Station, während im April 2018 eine höhere Nitratkonzentration des Zulaufs gemessen wurde als beim Kontrollwert.

Die Messstation wurde am 03.07.2016 errichtet und war ab dem 04.07.2016 in Betrieb. Zunächst erfolgten die Messungen bis zum 26.07.2016. In diesem Zeitraum wurde eine durchschnittliche Nitratreduktion von 66,7 mg/l NO_3^- gemessen, dies entspricht 77,4%. Anfang August führten Verschmutzungen der Pumpen zum Versagen dieser. Der Einbau zusätzlicher Filter vor den Pumpen konnte diese Problematik lösen. In den Sommer- und Herbstmonaten (17.08.2016 bis 22.11.2016) war aufgrund von Trockenheit ebenso keine Messung möglich, da kein Wasser in die Anlage hinein- oder hinausfloss, daher sind für diese Ereignisse auch keine Messpunkte in Abbildung 19 zu finden. In den Herbst-/Wintermonaten 2016, als aufgrund von vermehrtem Niederschlag wieder ein Zulauf beobachtet werden konnte, kam es zum Ausfall der Stromversorgung durch die Solarpaneele. Aufgrund dessen fiel das Monitool regelmäßig aus und erklärt die geringen Messpunkte im November. Für November 2016 gibt es zudem keine Kontrollwerte für den Ablauf, da zu diesem Zeitpunkt, nach der Trockenperiode, nur Wasser in die Anlage floss, aber noch nicht hinaus. Das Problem der Stromversorgung wurde durch Aktivierung einer *Sleeptimer*-Funktion in der Programmierung der Software behoben, welche bewirkte, dass das Monitool zwischen jeder

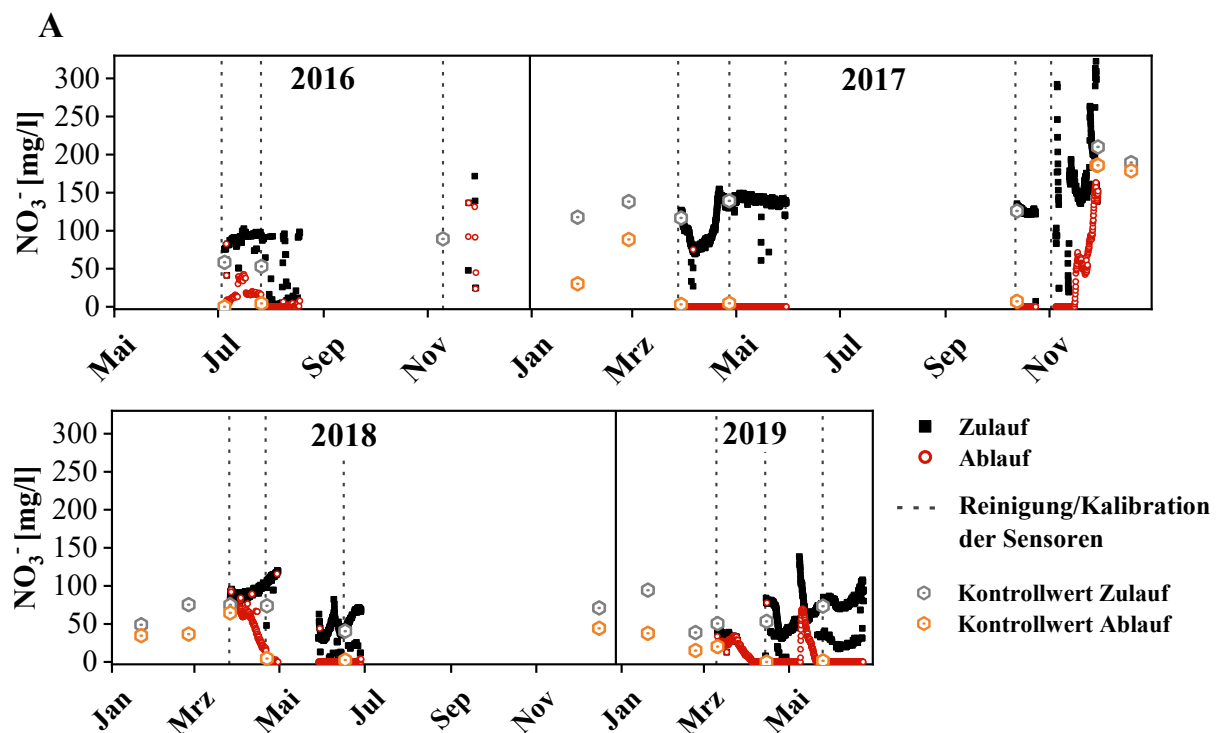
Messung in einen *Stand-by*-Modus verfiel und somit Strom sparte. Wie bereits erwähnt, mussten die Sensoren ab Dezember 2016 aufgrund der Witterung abgebaut werden, weswegen für diesen Zeitraum nur die Werte der Kontrollmessungen vorhanden sind. Im Dezember 2016 war auch keine Probenentnahme möglich, da es entweder keinen Abfluss gab oder das Wasser eingefroren war.

Am 28.03.2017 wurde die Messstation wieder betrieben und die Messungen verliefen in diesem Jahr reibungsfreier als im Jahr zuvor, da viele Problemfaktoren eliminiert wurden. Vom 28.03.2017 bis 30.05.2017 zeigte die Anlage eine hohe Nitratreduktionsleistung von durchschnittlich 99,8%, (119,8 mg/l NO₃⁻). Wie im Jahr zuvor, war auch im Jahr 2017 wieder eine Trockenperiode von über vier Monaten (30.05.2017 bis 10.10.2017) zu verzeichnen, in welcher kein Wasser durch die Anlage floss und das ganze System für diesen Zeitraum wie in einem *Batch*-Versuch zu betrachten ist. Nach diesem Zeitraum wies die Anlage für kurze Zeit (12.10.2017 bis 23.10.2017) eine Nitratreduktionsleistung von fast 100% auf, wonach wieder eine kurze Trockenperiode folgte. Ab dem 15.11.2017 ließ die Nitratreduktionsleistung dann deutlich nach. Die Nitratentfernung lag im Zeitraum 15.11.2017 bis 30.11.2017 zwischen 20,8% und 53,4%, was einer durchschnittlichen Nitratentfernung von 94,3 mg/l entspricht. Aufgrund niedriger Temperaturen wurde die Messanlage am 30.11.2017 wieder abgebaut. Zusammengefasst betrug die durchschnittliche Nitratentfernungseffizienz für das Jahr 2017, in welchem Daten mit der Messstation erhoben werden konnten, 93,5%.

Am 29.03.2018 wurde die Anlage erneut aufgebaut und diesmal fiel die Nitratentfernungseffizienz für die Frühlingsmonate deutlich geringer aus als im Jahr zuvor. Diese lag bis zum 11.4.2018 durchschnittlich bei 19,5%, stieg ab diesem Zeitpunkt dann stetig an und erreichte ab dem 26.04.2018 wieder eine Nitratentfernungseffizienz von knapp 100% (Abb. 19B). Nach einer kurzen Trockenperiode im Mai 2018 wurde im Juni 2018 eine konstant hohe Nitratentfernungsleistung beobachtet. Insgesamt war das Jahr 2018 ein sehr trockenes Jahr mit wenig Niederschlag. Die Folge war, dass zwischen Anfang Juli bis Anfang Dezember kein Wasser durch die Anlage floss und somit keine Messungen erfolgen konnten. Im Dezember war wieder ein Abfluss vorhanden, die Messstation musste aufgrund des beginnenden Frostes jedoch bereits abgebaut werden.

Am 13.03.2019, nachdem die Anlage wieder installiert wurde, verhielt sich die Nitratentfernungseffizienz ähnlich wie im Jahr zuvor. Die Anlage zeigte deutliche Verluste in der Denitrifikationsperformance, da die Nitratentfernungseffizienz am 13.03.2019 bei nur 46% lag (Abb. 19B). Die Nitrat-Zulaufwerte sind vom 01.04.2019 bis zum 17.04.2019 nicht im Diagramm dargestellt, da bei dem Kontrollbesuch am 17.04.2019 festgestellt wurde, dass

sich der Zulaufschlauch nicht mehr im Einlassrohr befand und somit keine zuverlässigen Messwerte lieferte. Der Schlauch wurde vermutlich aufgrund eines sehr hohen Durchflusses aus dem Rohr herausgespült. Die Ablaufwerte hingegen sind zuverlässig und daher auch in Abbildung 19A dargestellt. Eine vollständige Nitratentfernung am Ablauf konnte erst wieder am 08.04.2019 festgestellt werden. Vom 12.05.2019 bis zum 23.05.2019 kam es wieder zu erhöhten Nitratwerten im Zulauf von bis zu 130 mg/l Nitrat bei einer unvollständigen Nitratentfernung von durchschnittlich 50,6%. Nach dem 23.5.2019 bis zum Einsetzen der Trockenheit Ende Juni (24.06.2019) erreichte die Denitrifikationsanlage hingegen wieder eine 100%ige Nitratentfernungseffizienz.



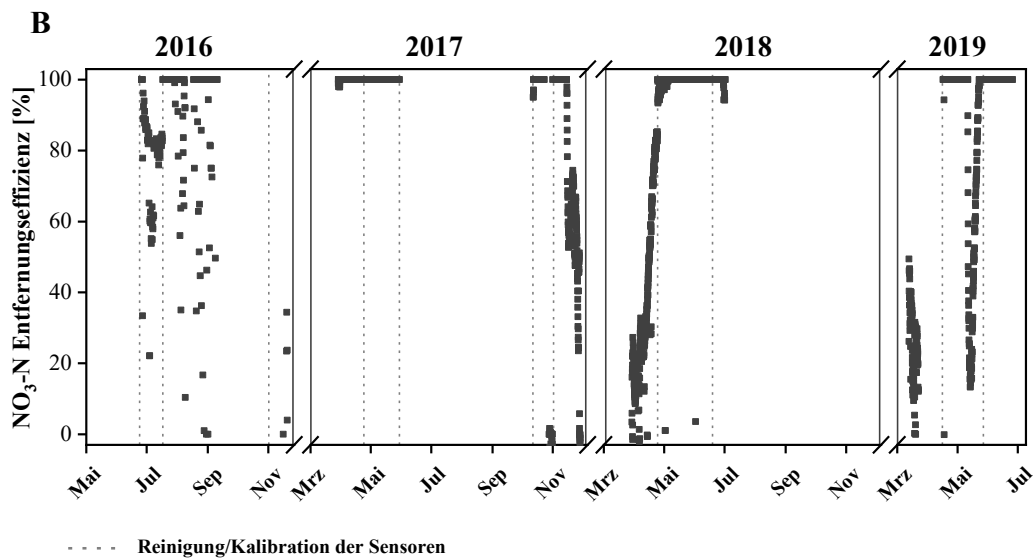


Abbildung 19: Von der Messstation detektierte Nitratkonzentrationen (NO_3^-) des Zu- und Ablaufs der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte vom Juni 2016 bis Ende Juni 2019 (A). (B) zeigt die Nitratentfernungseffizienz in Prozent für die gemessenen Werte der Monitoring-Station. Da die Anlage über den Winter abgebaut war, sind für diese Zeiträume keine Daten dargestellt.

Insgesamt kann gesagt werden, dass die Denitrifikationsanlage - für den mit der Monitoring-Station analysierten Zeitraum - häufig eine hohe Nitratentfernungseffizienz aufwies. Nichtsdestotrotz muss auch bedacht werden, dass in den Wintermonaten nur eine monatliche Messung stattfinden konnte und für diese Zeiträume keine dauerhafte Messung vorhanden ist, worüber sich keine Aussage über die Nitratentfernungseffizienz für das gesamte Jahr ableiten lässt.

Nitrit

Im Vergleich zur Ermittlung der Nitratwerte gestaltete sich die Messung der Nitritwerte (Abb. 20) komplizierter, da dieser Parameter des Sensors ein sensibles Verhalten gegenüber dem unterschiedlichen Zu- und Ablaufwasser aufwies. Zudem stiegen die Messwerte mit zunehmender Messdauer an, erst nachdem eine Reinigung und Neukalibration erfolgte, fielen diese wieder ab, insbesondere im März/April 2017 (Abb. 20). Trotz des äußeren Einflusses, der Wasserqualität in Abhängigkeit zur Messdauer bei der Nitritkonzentration, ist zu erkennen, dass die Messwerte im Ablauf der Anlage insbesondere 2016, 2017 und im Juni 2018 höher ausfielen als im Zulauf. Dies konnte auch mit den Kontrollwerten aus dem Labor bestätigt werden. Insgesamt konnten maximale Nitritwerte von 7 mg/l am Ablauf der Anlage im April 2017 festgestellt werden. Von Anfang Oktober 2017 bis Ende Oktober 2017 war

ein Ersatzgerät für den spectro::lyser im Einsatz, mit welchem keine Nitritmessung möglich war. Diese konnte erst wieder Anfang November durchgeführt werden.

Ende November 2017 ist ein deutlicher Unterschied zwischen der Nitritkonzentration des Zulaufwassers, welche durchweg fast 0 mg/l betrug, und der Nitritkonzentration des Ablaufwassers festzustellen. Die Nitritkonzentration des Ablaufwassers stieg insbesondere bis kurz vor dem Abbau der Messtechnik, Anfang Dezember, deutlich an. Im Jahr 2018 konnte bis Mai kein deutlicher Unterschied in der Nitritkonzentration des Zu- und Ablaufwassers festgestellt werden, erst im Juni 2018 lagen die Nitritwerte des Ablaufs wieder etwas höher, überschritten jedoch insgesamt 0,5 mg/l NO_2^- nicht. Auch im Jahr 2019 gab es zu Beginn, von Januar bis Anfang März, noch deutliche Unterschiede in der Nitritkonzentration zwischen dem Zu- und Ablauf, welche sich dann ab Anfang April in ihrem Verlauf annäherten.

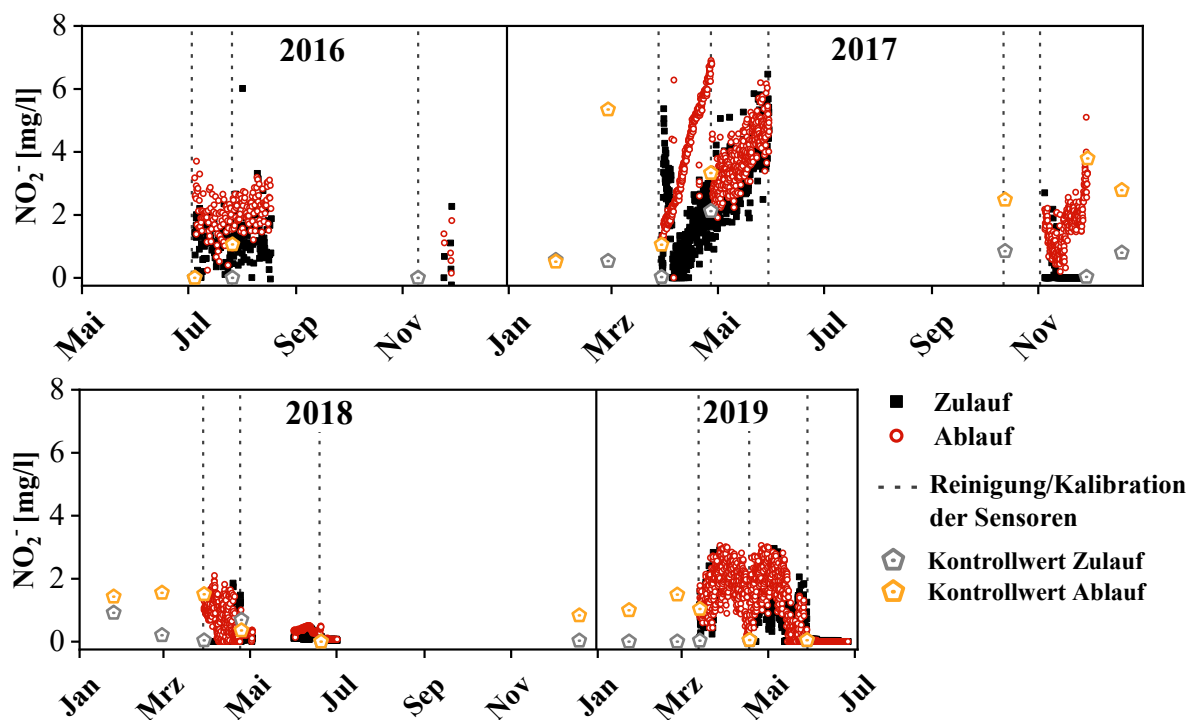


Abbildung 20: Von der Messstation detektierte Nitritkonzentrationen (NO_2^-) des Zu- und Ablaufs der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte von Juli 2016 bis Ende Juni 2019.

Ammonium

Die Ammoniumkonzentration fiel allgemein über den gesamten Monitoring-Zeitraum - bis auf wenige Ausreißer - sehr gering aus, wie Abbildung 21 zeigt. Insgesamt lag sie meist unter 4 mg/l NH_4^+ , wobei sich die ermittelten Kontrollwerte sogar immer unter 1 mg/l NH_4^+ befanden.

Die Ausreißerwerte, die im Nov. 2016, Mai/Juni 2017 und April/Juni 2018 auftraten, zeigen kein erkennbares Muster und wurden durch die Labormessungen nicht bestätigt. Es ist daher fraglich, ob diese Werte zuverlässig sind oder eher mit einer fehlerhaften Messung des Sensors zusammenhängen. Zudem ließ sich für diesen Parameter kein Unterschied zwischen den Zu- und Ablaufwerten erkennen, da sich diese meist sehr ähnlich verhielten. Bei der Errichtung der Messstation Anfang 2019 wurde ein Defekt des Ammoniumlyzers festgestellt, weshalb für diesen Parameter sowie für die Analyse des pH-Wertes bis zum Ende des Beobachtungszeitraumes keine kontinuierlichen Messwerte mehr vorliegen und nur die monatlichen Kontrollwerte dargestellt sind.

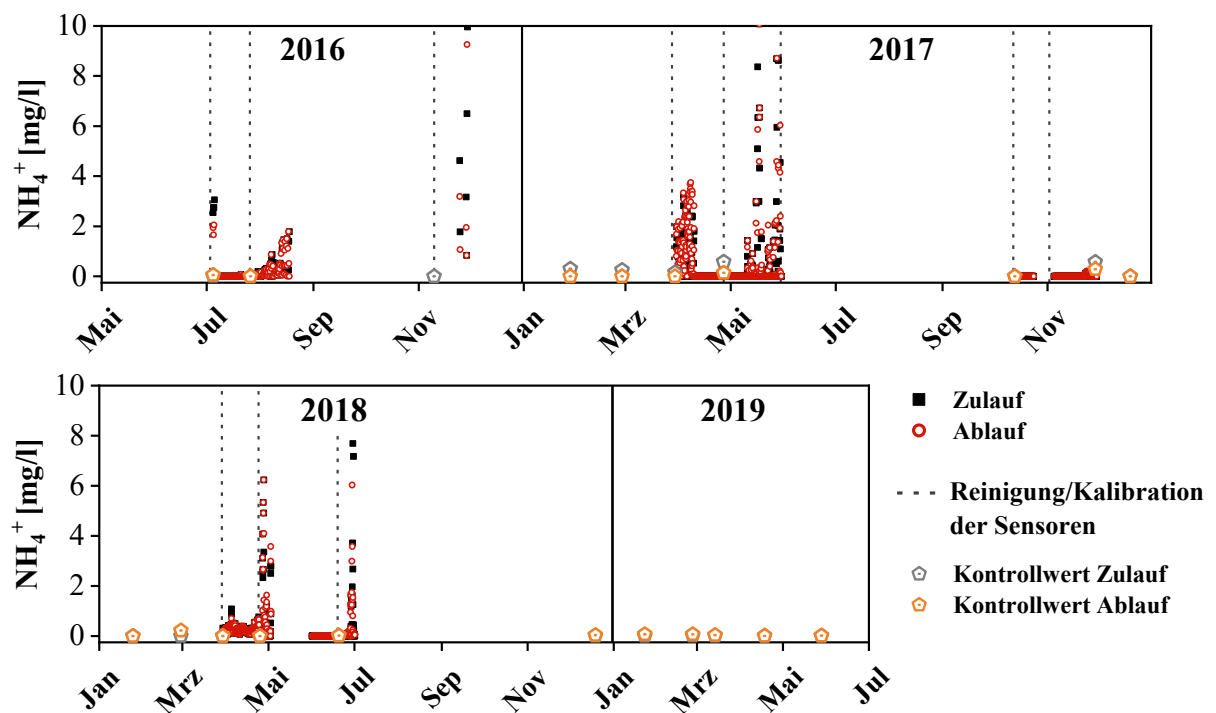


Abbildung 21: Ammoniumkonzentration (NH_4^+) der Messstation des Zu- und Ablaufs an der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte von Juli 2016 bis Ende Juni 2019.

TOC

Der mit der Messstation gemessene TOC lieferte für die Denitrifikationsanlage D7 über alle Jahre hinweg für den Zu- als auch für den Ablauf Werte meist unter 90 mg/l, die jedoch häufig sogar deutlich niedriger ausfielen, wie Abbildung 22 zeigt. Ausnahmen bilden hier die Werte vom Juni 2019, bei welchen die Monitoring-Station die höchsten TOC-Werte mit bis zu 120 mg/l gemessen hat. Allerdings konnten diese durch die Kontrollwerte aus dem Labor nicht bestätigt werden.

Im Jahr 2016 und in der ersten Hälfte des Jahres 2017 lagen die TOC-Werte zwischen 15 und 60 mg/l. Allerdings waren die Kontrollwerte meist deutlich niedriger, bis auf die Ablaufprobe vom April 2017. Im Oktober/November 2017 lagen die TOC-Werte auf niedrigerem Niveau und überschritten – bis auf einige Ausreißer – selten 30 mg/l. Im Jahr 2018 setzte sich dieser Trend fort und der TOC Gehalt sank noch weiter ab. Selten wurden hier 20 mg/l TOC überschritten. Dies bestätigen auch die monatlichen Kontrollwerte, welche meist unter 15 mg/l TOC lagen. Eine Ausnahme bildeten hier nur die Kontrollwerte vom März 2018, bei welchen einmalig TOC-Werte von 580 mg/l für den Zu- und 765 mg/l für den Ablauf gemessen wurden. Aufgrund einer besseren Übersichtlichkeit der Darstellung sind diese beiden Werte in Abbildung 22 jedoch nicht gezeigt.

Insgesamt sanken nach der Reinigung des Sensors die Messwerte deutlich ab und stiegen mit zunehmender Verschmutzung wieder an, was insbesondere im Jahr 2019 zu beobachten war. Dies kann auch erklären, warum eine Übereinstimmung mit den Kontrollwerten zuweilen nicht zustande kam.

Allgemein lässt sich, sowohl für die mit der Messstation ermittelten Werte, als auch für die Kontrollwerte aus dem Labor, feststellen, dass die TOC-Konzentrationen im Ablauf meist höher lagen als im Zulauf. Dies konnte mit allen Kontrollwerten bestätigt werden, mit Ausnahme jener vom November 2017 und April 2019, bei denen beim Zulauf eine höhere TOC-Konzentration gemessen wurde.

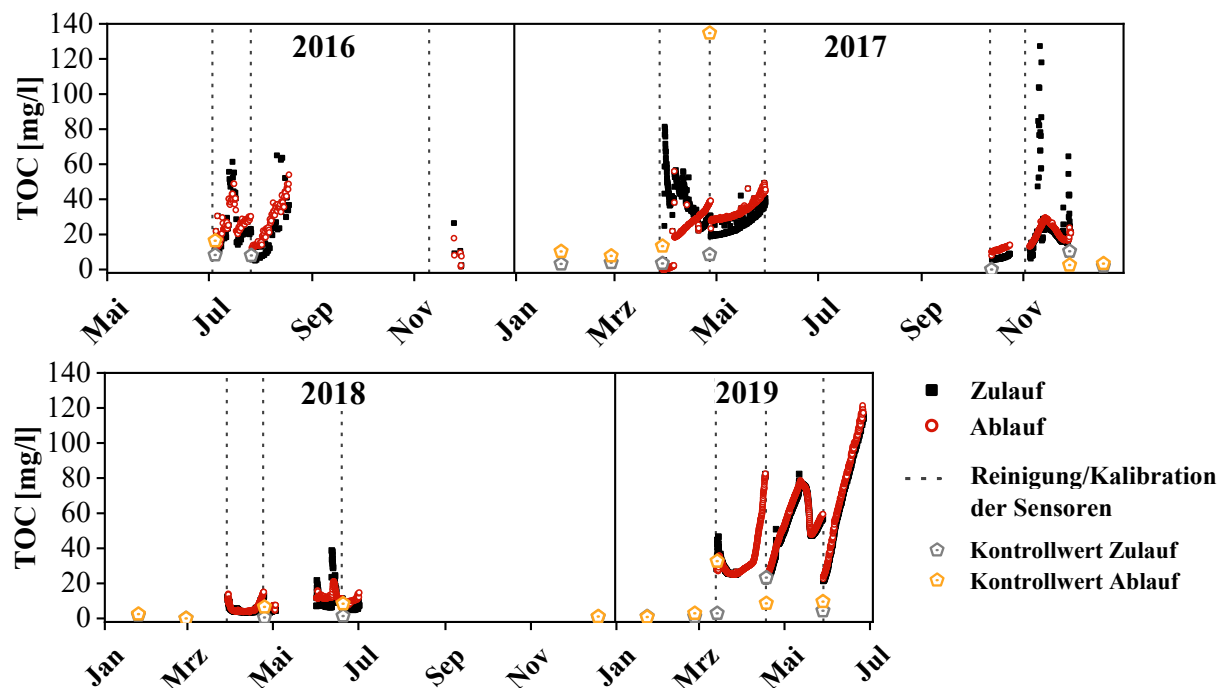


Abbildung 22: Von der Messstation detektierten TOC-Konzentration des Zu- und Ablaufs an der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte von Juli 2016 bis Ende Juni 2019. Die Kontrollwerte für März 2018 sind in der Abbildung nicht dargestellt, da sie für den Zulauf bei 580 mg/l und für den Ablauf bei 765 mg/l TOC lagen.

pH-Wert

Der pH-Wert in der Anlage lag 2016, 2017 und zu Beginn des Jahres 2018 meistens zwischen 6 und 8 und war größtenteils im Ablaufwasser niedriger als im Zulauf (Abb. 23). Dies bestätigen auch die Kontrollwerte, mit Ausnahme der Proben vom Februar und März 2017, Januar 2018 und Mai 2019, in denen der pH-Wert im Ablauf höher lag. Anfang 2018 wurde von der Messstation ein ähnlicher pH-Wert für den Zu- und Ablauf ermittelt, der Ende April deutlich anstieg und sich zwischen 7 und 11 stabilisierte. Die Vergleichsmessungen im Labor bestätigten pH-Werte von über 8. Wie bereits für den Parameter Ammonium beschrieben, konnten, aufgrund des defekten ammo::lyzers, keine weiteren Werte für den pH-Wert im Jahr 2019 aufgezeichnet werden. Daher zeigt Abbildung 23 nur die monatlichen Kontrollwerte. Diese lagen meist zwischen 6 und 8 mit höheren Werten im Zulaufwasser.

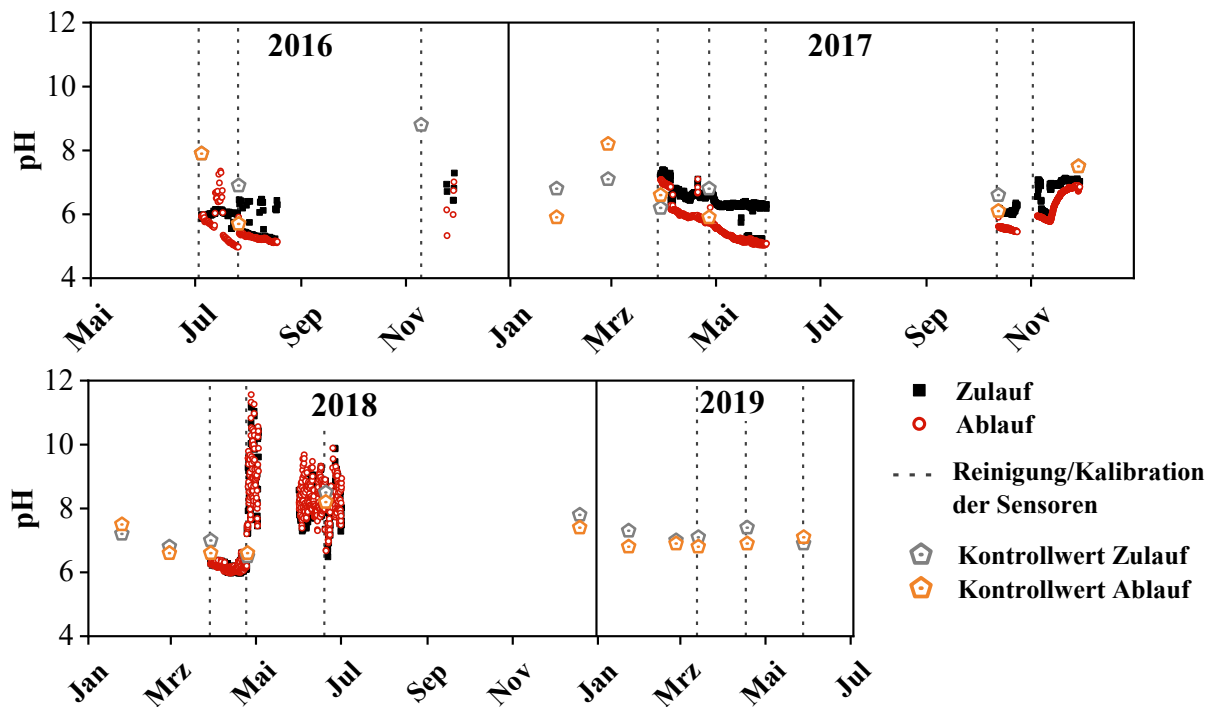


Abbildung 23: Von der Messstation detektierter pH-Wert der Messstation des Zu- und Ablaufs an der Denitrifikationsanlage D7 sowie die monatlichen Kontrollwerte von Juli 2016 bis Ende Juni 2019.

Temperatur

Die Wassertemperatur schwankte je nach Jahreszeit und fiel teilweise sogar unter 5°C (Abb. 24). Höchstwerte konnten in den Sommermonaten mit über 20°C bestimmt werden. Der Defekt des ammo::lyzers, welcher auch für die Aufzeichnung der Temperatur verantwortlich war, führte zu einem Ausfall dieser im Jahr 2019. Allerdings zeichneten parallel noch die Sensoren im Wehr, welche für die Abflussmessung verantwortlich waren, die Wasser-

temperatur auf. Diese Messwerte konnten somit für eine weitere Auswertung des Parameters herangezogen werden. Aufgrund dessen ist im Jahr 2019 ausschließlich die Temperatur des Ablaufwassers in Abbildung 24 dargestellt.

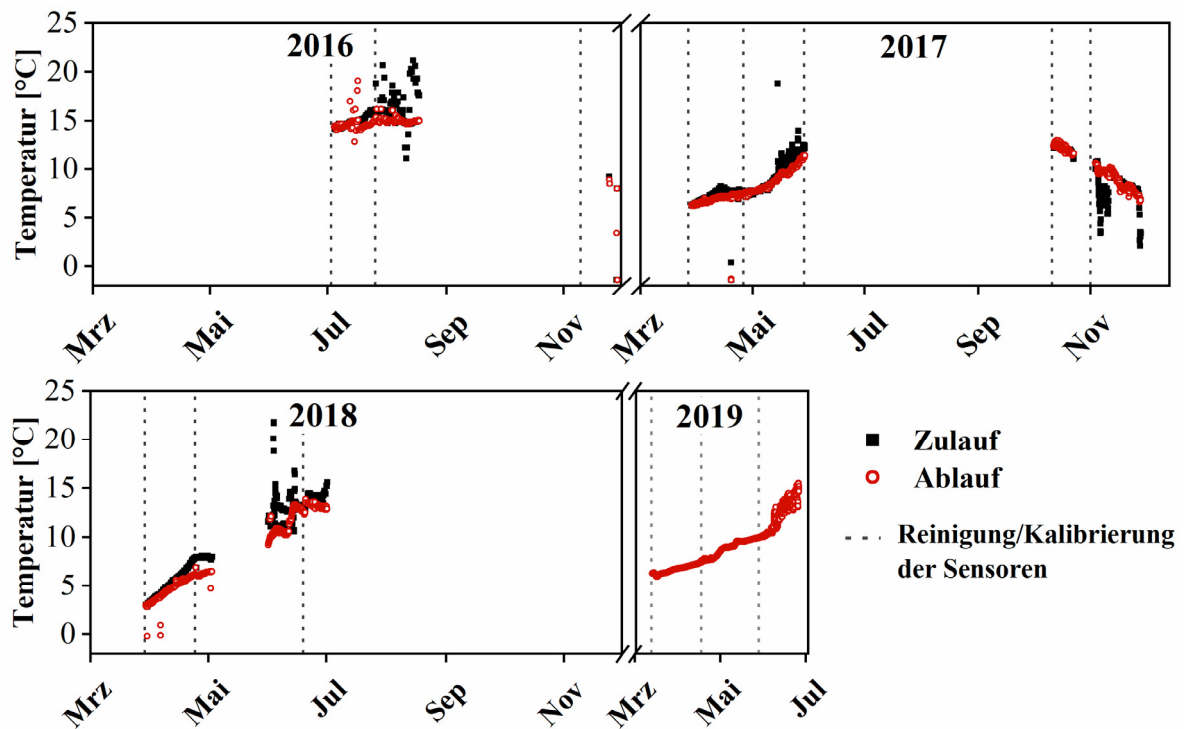


Abbildung 24: Wassertemperatur des Zu- und Ablaufs an der Denitrifikationsanlage D7 von Juli 2016 bis Ende Juni 2019. Im Jahr 2019 erfolgte die Temperaturmessung aufgrund des defekten ammo::lysers mit dem im Thomsonwehr installierten BARO-DIVER DI500.

3.1.2 Abflussmessung und Nitratentfernungsrage

Ab dem Jahr 2018 gab es durch das installierte Thomsonwehr eine regelmäßige Abflussmessung, mit der sowohl eine Nitratentfernungsrage als auch eine theoretische HRT bestimmt werden konnte. Die simulierten Abflusswerte sollten zusätzlich noch die fehlenden Werte für das Jahr 2017 ergänzen sowie mit den gemessenen Werten verglichen werden. Somit sollte eine kontinuierliche Messreihe des Abflusses von 2017 bis Ende Juni 2019 erstellt werden.

Abflussmessung

Die Messwerte des Thomsonwehrs zeigten nicht immer übereinstimmende Werte mit den monatlich durchgeführten Abflussmessungen. In einigen regenreichen Monaten zeigte die Messung des Wehres Werte von mehreren Litern pro Sekunde (bis zu über 210 l/s), was den Messbereich des Wehres signifikant übersteigen würde und somit unrealistisch ist. Aufgrund der hohen Fehlerwahrscheinlichkeit sind diese Werte in Abb. 27 nicht dargestellt. Es wird

vermutet, dass zu diesen Zeitpunkten der Ablaufschacht vollgelaufen war und somit das Wehr unter Wasser stand und diese überhöhten Ablaufwerte verursachte. Ein vollgelaufener Schacht konnte bereits im Januar 2018 beobachtet werden (Abb. 25).



Abbildung 25: Vollgelaufener Ablaufschacht im Januar 2018.

Zudem lagen die mit dem Wehr gemessenen Werte auch teilweise niedriger als die Werte der monatlichen Kontrollmessung. Allerdings muss hier bedacht werden, dass die Monatsmessung am Zulauf stattfand und die dauerhafte Messung über das Wehr im Ablauf installiert war. Somit müssen hier - je nach Flussrate - ein paar Stunden bis Tagen Verzögerung zwischen Zu- und Ablaufwerten mit eingerechnet werden.

Die simulierten Werte für die Jahre 2017, 2018 und 2019 stimmten, bis auf einige Ausnahmen, gut mit den monatlichen Messwerten überein. Es zeigte sich ein sehr diskontinuierliches Abflussverhalten, welches stark schwankte. So gab es in jedem Jahr große Unterschiede, welche sich durch keinen Abfluss oder aber eine sehr hohe Flussrate von 0,5 bis zu 3 l/s bemerkbar machten. Gemäßigte Abflusswerte im Bereich von 0,1 bis 0,3 l/s waren hingegen eher seltener vorzufinden (Abb. 26). Zudem konnte eine schnelle Änderung der Flussrate innerhalb kurzer Zeiträume festgestellt werden, was bedeutet, dass nach hohen Niederschlagsmengen die Abflussmengen schnell anstiegen, jedoch auch zügig wieder abfielen.

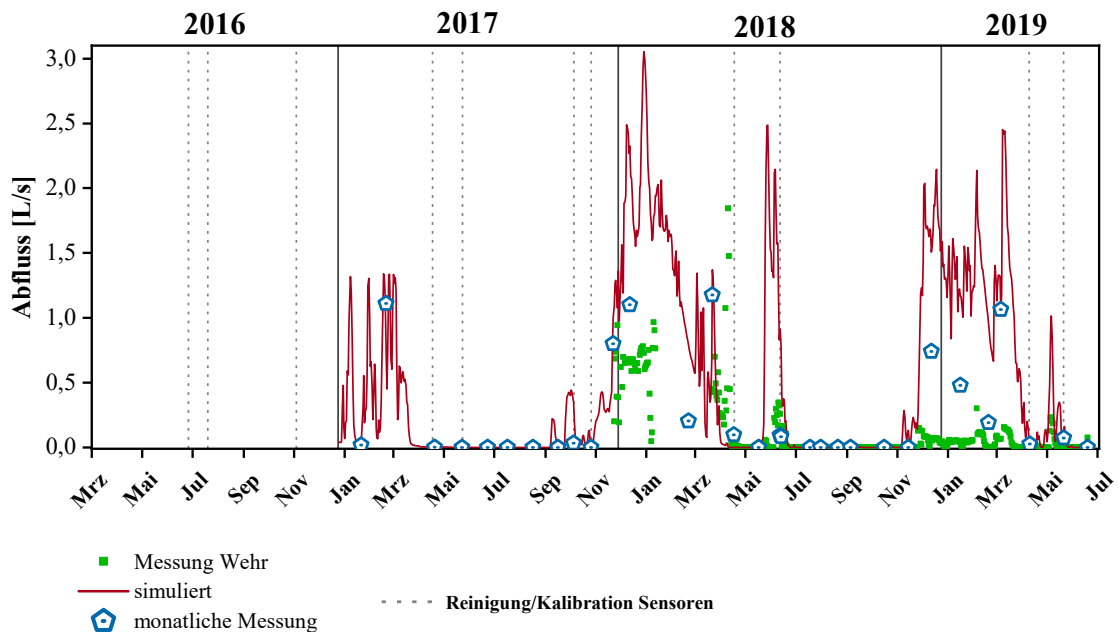


Abbildung 26: Abflusswerte für die Jahre 2017, 2018 und 2019 mit den monatlich erhobenen Abflusswerten, den kontinuierlichen, Messungen des Wehrs im Abfluss und den simulierten Abflusswerten. Für Januar 2018 gibt es keinen Abflusskontrollwert, da zu diesem Zeitpunkt der Schacht komplett vollgelaufen und daher eine Messung nicht möglich war.

Nitratentfernungsrate

Mithilfe der Abflussmessung ist die Bestimmung der Nitratentfernungsrate mit Formel 2 aus Kapitel 2.1.6 möglich. Wird die Nitratentfernungsrate mit den simulierten Abflusswerten berechnet, konnte die höchste Rate am 12.06.2018 ($12,02 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) bei einer theoretischen HRT von 0,82 Tagen und am 26.02.2019 ($12,11 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$) bei einer theoretischen HRT von 1,82 Tagen festgestellt werden (Abb. 27). Allerdings muss für diese beiden Zeitpunkte bedacht werden, dass die simulierte Flussrate deutlich höher ausfiel als die zu diesen Zeitpunkten monatlich gemessenen Abflusswerte und somit auch die Nitratentfernungsrate dadurch falsch positiv beeinflusst sein kann. Die nächsthöheren Nitratentfernungsraten - bei denen die simulierten Abflusswerte auch mit den monatlich gemessenen Werten wesentlich übereinstimmten - traten mit $6,44 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ am 15.11.2017 bei einer theoretischen HRT von 4,09 Tagen und am 28.11.2017 mit $6,41 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ bei einer theoretischen HRT von 2,43 Tagen auf.

Allgemein lag die durchschnittliche Nitratentfernungsrate des Denitrifikationsbeckens für 2017 bis 2019, bei der eine Nitratmessung durchgeführt werden konnte, bei $1,18 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$. Dabei muss jedoch bedacht werden, dass sich die Anlage jedes Jahr mehrere Monate in einem *Batch*-Modus befand und kein Wasser in oder aus der Anlage floss. In diesen Zeiträumen fand folglich keine Nitratentfernung statt, welche auch in der Berechnung

nicht berücksichtigt wurden. Zudem sind die Wintermonate, in denen keine Messungen durchgeführt wurden - bis auf die Monatswerte - in der Berechnung nicht berücksichtigt.

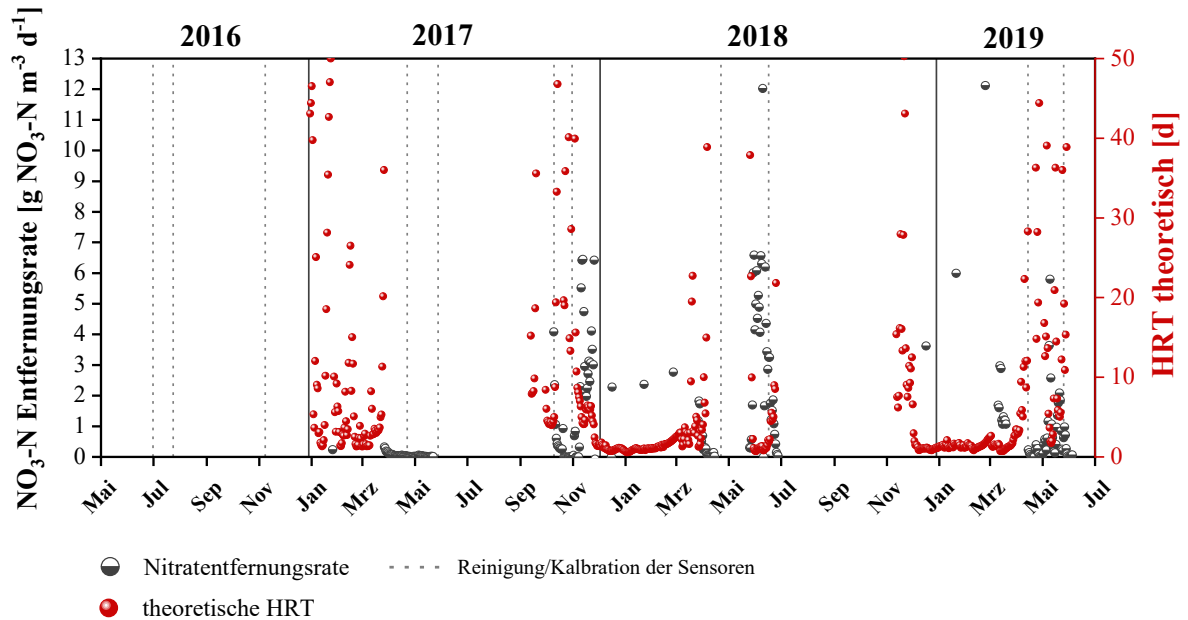


Abbildung 27: Nitratentfernungsraten und theoretische HRT, welche mit den simulierten Abflusswerten berechnet wurden.

In Abbildung 28 ist die Nitratentfernungsraten und theoretische HRT für das Jahr 2018 und 2019 dargestellt, welche mit den gemessenen Werten aus dem Wehr berechnet wurden. Hierbei ergeben sich andere Maximal-Nitratentfernungsraten zu anderen Zeitpunkten als mit den simulierten Abflusswerten, wobei die zuvor beschriebenen Extremwerte der Messungen aus dem Wehr hierbei nicht berücksichtigt wurden. Dies ist auch der Grund, warum für Januar und Februar 2018 keine Nitratentfernungsraten dargestellt ist.

Die Maximalraten von $7,88 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{d}^{-1}$ und $7,1 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{d}^{-1}$ konnten am 17.04.2018 bei einer theoretischen HRT von 1,19 Tagen und am 18.04.2018 bei einer theoretischen HRT von 0,95 Tagen (Abb. 28) ermittelt werden. Die durchschnittliche Nitratentfernungsraten für den hier gemessenen Zeitraum im Jahr 2018 und 2019 lag, ohne die Berücksichtigung der Ausreißerwerte, bei $0,39 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{d}^{-1}$. Somit ist die Nitratentfernungsraten auf Basis der gemessenen Flussraten deutlich geringer als bei den simulierten Werten in Abbildung 27. Dies liegt unter anderem daran, dass die gemessene Flussrate aus dem Wehr, insbesondere von Dezember 2018 bis März 2019, niedriger ausfiel als die simulierte Abflussmessung in diesem Zeitraum und dies gleichzeitig auch eine höhere theoretische HRT bewirkte.

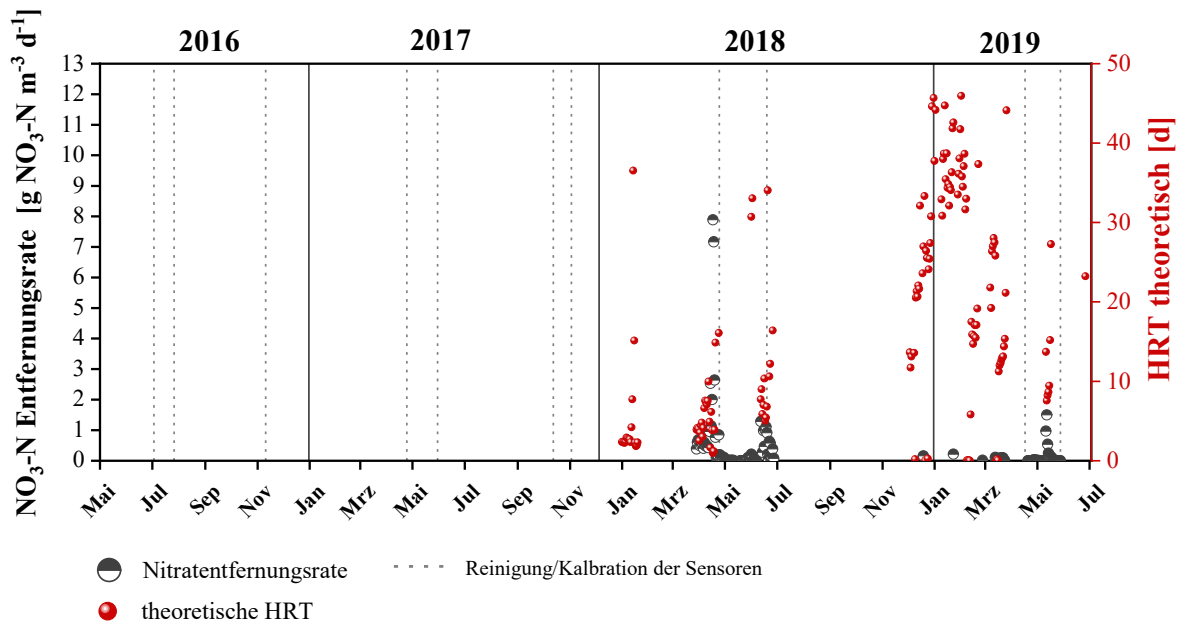


Abbildung 28: Nitratentfernungsraten und theoretische HRT, welche mit den gemessenen Abflusswerten aus dem Wehr für 2018 und 2019 berechnet wurden.

Insgesamt lagen die besten Nitratreduktionsraten bei theoretischen HRTs von 0,8 bis 4 Tagen. Mit Hilfe des durchgeführten Tracertests sollte die Abschätzung der realen HRT im Denitrifikationsbecken erfolgen. Des Weiteren sollte die Porosität des Beckens, die Packungsdichte der Kohlenstoffquelle, mit Hilfe des Tracerversuchs ermittelt werden. Die Ergebnisse dieses Versuchs werden im Folgenden beschrieben.

3.1.3 HRT, Fließverhalten und Nitratabbau in der Denitrifikationsanlage

Aufgrund der niedrigen Temperaturen traten während des Tacerversuchs V1 mehrfach technische Probleme auf. So unterbrach die Stromversorgung der Mess- und Speicherinstrumente, was zu Lücken in der Datenreihe führte. Aufgrund dessen mussten einige Werte gefittet werden, um die Durchbruchkurve des Tracers zu rekonstruieren, über welche die Porosität und HRT bestimmt werden sollte. Für die Porosität wurde ein Wert von 1,6 ermittelt, was weit entfernt von dem Literaturwert (0,7) liegt. Generell ist dieser Wert unrealistisch, da die maximale Porosität bei 1 liegt. Dies wirkt sich auch auf die Bestimmung der realen HRT aus. Lag die theoretisch berechnete HRT (Formel 3) bei Start von V1 ($Q = 0,8 \text{ l/s}$, $\Phi = 0,7$) bei 2,2 Tagen, hatte die mit dem Tracerversuch ermittelte, reale HRT ($Q = 0,8 \text{ l/s}$, $\Phi = 1,6$) eine Dauer von 4,5 Tagen oder besser gesagt 3 bis 7 Tagen.

Der Versuch mit den AKS während V2 in den verschiedenen Probeentnahmestellen sollte weitere Erkenntnisse bezüglich des Fließverhaltens liefern und zeigte ein ungleichmäßiges Fließen des Wassers zwischen dem Zu- und Ablauf in der Anlage. Allgemein gestaltet sich eine genaue quantitative Aussage zur Uraninmenge in den AKS schwierig, da diese von der Dauer der Installation der AKS und dem Durchfluss abhängt. Somit kann diesbezüglich nur eine ungefähre Abschätzung getroffen werden. Allerdings lieferte das Ergebnis deutliche Unterschiede in der Uraninverteilung der AKS in St. 1, 3, 4 und 5. Die höchste Uraninabsorption trat mit einer Intensität von etwa 750 in St. 1 auf, dicht gefolgt von St. 4 mit circa 600. St. 3 lag mit einer Intensität von 115 deutlich darunter. Obwohl der AKS in St. 5 weniger tief in die Anlage eingebracht werden konnte als die anderen, zeigte sich hier mit einer Maximalintensität von circa 128 ein höherer Wert als bei St. 3 (Abbildung 29B). Die Flussrate in die Denitrifikationsanlage lag bei Start des Versuchs am 24.04.2018 bei 0,09 l/s.

Um zusätzliche Erkenntnisse und eine Abschätzung über den Nitratabbau in Abhängigkeit zum Fließweg durch die Anlage zu erhalten, wurde an den Probeentnahmestellen St. 1, 3, 4 (siehe Kapitel 2.1.1) die Nitratkonzentration bestimmt (Abbildung 29A). Die Abbildung zeigt nur Werte aus Monaten in denen ein Durchfluss vorhanden war, da nur dann ausgesagt werden kann, wie schnell das Nitrat abgebaut wurde.

Die Nitratreduktion war für die Monate März 2017, April 2018, April 2019 und Mai 2019 entlang der Anlage erfolgreich, so dass am Ablauf kein oder nur wenig Nitrat gemessen werden konnte. Für all diese Monate (bis auf Mai 2019) war auch bereits der Großteil des Nitrats bei St. 3 reduziert. Im Mai 2019 hingegen konnte bei St. 4, eine höhere Nitratkonzentration als bei St. 3 festgestellt werden. Während den oben genannten Monaten fiel die Flussrate allgemein mit unter 0,2 l/s eher gering aus. Dies war auch im Februar 2019 (mit 0,19 l/s) der Fall, trotzdem war die Nitratreduktion hier weniger effizient als bei den zuvor genannten Zeitpunkten. Allerdings lag die Wassertemperatur hier nur bei 5,2°C. Im Februar 2019 stieg die Nitratkonzentration vom Zulauf bis St. 1 zuerst noch leicht an und sank im Verlauf von St. 3 bis zum Ablauf nur noch geringfügig. Auch in den Monaten Nov. 2017 und Dez. 2018 konnte eine ähnliche Beobachtung gemacht werden, da auch hier die Nitratkonzentration vom Zulauf bis St. 1 bzw. 3 zuerst anstieg und erst danach abfiel. Zu diesen Zeitpunkten war die Flussrate erhöht und lag bei 0,7 l/s. Mittels der Nitratabnahme kann keine grundsätzliche Aussage darüber getroffen werden, ob zu jeder Situation die gesamte Länge des Beckens benötigt wurde. Jedoch muss auch angemerkt werden, dass diese drei Messpunkte nicht das gesamte Becken repräsentieren und mehr Probenentnahmestellen eine höhere Auflösung bezüglich der Nutzung der Anlage liefern könnten.

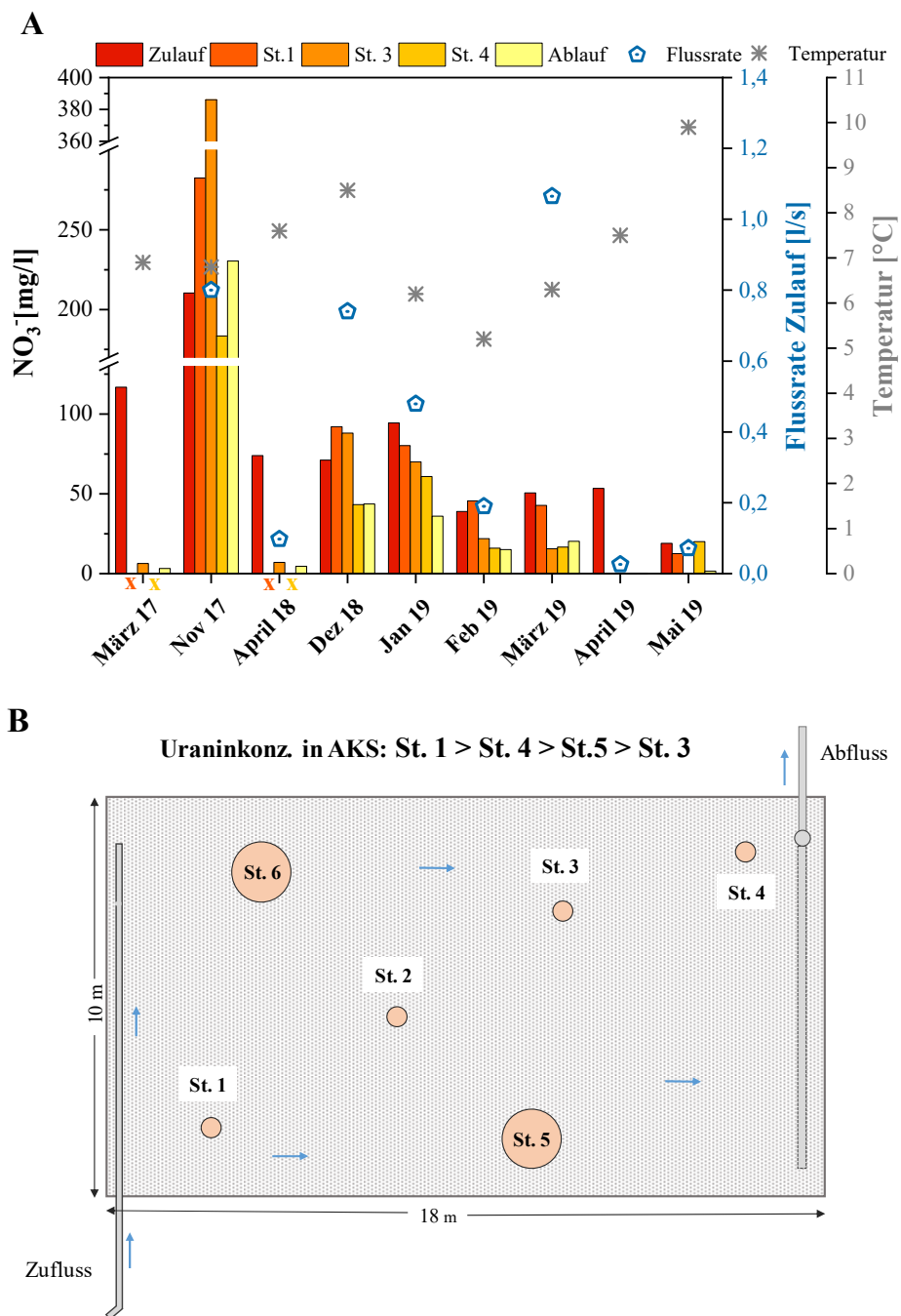


Abbildung 29: Nitratkonzentration der verschiedenen Probeentnahmestellen (St.), sowie des Zu- und Ablaufs im Messzeitraum. Zusätzlich ist noch die Flussrate des Zulaufs sowie die Wassertemperatur des Ablaufs gezeigt. Im März 2017 und April 2018 wurde für St. 1 und St. 3 noch keine Probe für diese Analyse entnommen. Dies ist mit einem X gekennzeichnet (A). Position der Probeentnahmestellen entlang der Anlage mit der Uraninverteilung der AKS in den St. (B).

3.1.4 Limitierende Faktoren auf die Nitratentfernung

Die Nitratentfernungseffizienz der Denitrifikationsanlage an der Drainage D7 funktionierte wie bereits beschrieben für mehrere Monate sehr erfolgreich mit Nitratentfernungen von bis zu 100%. In einigen Monaten jedoch nahm die Denitrifikationsleistung ab und Nitrat wurde unvollständig entfernt (Nov. 2017, März 2018 und März 2019). Im Nachfolgenden sollen mögliche Faktoren vorgestellt werden, die eine wichtige Steuerungsfunktion bezüglich der Nitratentfernungseffizienz übernehmen können.

Flussrate

Das Abflussverhalten der Denitrifikationsanlage D7 zeigte im Messzeitraum stark schwankende Flussraten, die von einem sehr hohen Abfluss mit über 1 l/s hin zu mehrmonatigen Dürreperioden reichten, in welchen kein Wasser die Anlage durchfloss. Im Allgemeinen kann somit festgehalten werden, dass das Strömungsverhalten am Eintritt in die Denitrifikationsanlage weit von einem gleichmäßigen, kontinuierlichen Strömungsmuster entfernt ist. Darüber hinaus konnte im Januar 2018 keine monatliche Messung durchgeführt werden, da der Drainageabfluss so hoch war, dass es zu einer vollständigen Überflutung der Zulaufkammer kam.

Um einen möglichen Einfluss der Flussrate auf die beeinträchtigte Nitratentfernungseffizienz festzustellen, stellt Abbildung 30 diese in Abhängigkeit zur monatlich gemessenen und simulierten Flussrate dar.

In der Abbildung ist zu sehen, dass es Zeitpunkte gab, an denen die Leistung der Nitratentfernung bei hohen Abflussraten negativ beeinflusst sein könnte, wie z.B. im Februar, November und Dezember 2017, Januar, März und Dezember 2018 sowie März 2019 (grünes Kreuz). Auf der anderen Seite jedoch waren die Flussraten im Januar 2017 und Februar 2018 moderat (0,018 bzw. 0,2 l/s) und trotzdem war die Nitratbeseitigung hier unvollständig. Der simulierten Flussrate nach, trat auch im Juni 2018 ein Ereignis mit hohem Abfluss auf, jedoch blieb die Nitratentfernungseffizienz hier stabil bei 100% (rotes Minus). Es ist also denkbar, dass weitere Faktoren zu einer verringerten Nitratentfernungsleistung beigetragen haben könnten.

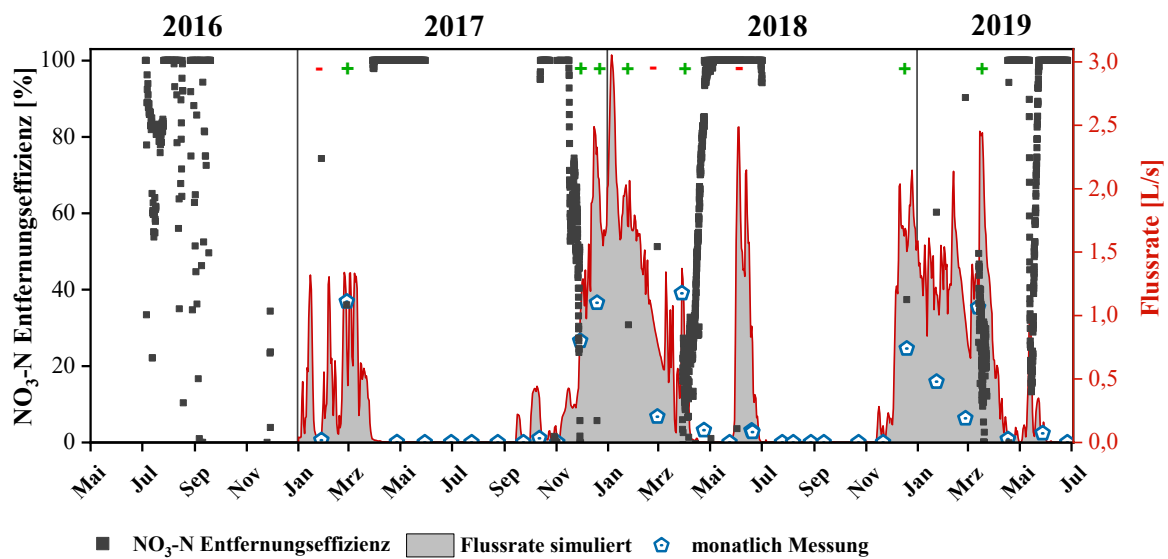


Abbildung 30: Nitratentfernungseffizienz gegen die simulierte und monatlich gemessene Flussrate für die Jahre 2016, 2017, 2018 und 2019. Grünes Kreuz steht für Zeitpunkte, in denen eine Korrelation der Beeinträchtigung der Nitratentfernungseffizienz mit hohen Flussraten beobachtet wurde. Rotes Minus symbolisiert Zeitpunkte, in denen keine Korrelation festgestellt werden konnte.

Temperatur

Jene Monate, in denen hohe Flussraten auftraten, waren vorrangig auch diejenigen, in denen niedrige Wassertemperaturen gemessen wurden (Abb. 31A). Diese könnte somit einen weiteren Prozessparameter darstellen, der die Effizienz der Nitratentfernung negativ beeinflusste. Eine temperaturabhängige Nitratentfernung würde mit den oben genannten Monaten übereinstimmen, in denen der Wirkungsgrad der Nitratentfernung gering war. Hier sank die Wassertemperatur unter 8°C und die Effizienz der Nitratentfernung nahm ab (Abb. 31B). Im November 2017 zeigte die Wassertemperatur Minimalwerte von $7-8^{\circ}\text{C}$. Diese lagen zwar nicht so niedrig wie im März 2018, allerdings nahm die Nitratentfernungseffizienz trotzdem deutlich ab. Zu diesem Zeitpunkt erreichten die einfließenden Nitratkonzentration jedoch Spitzenwerte von über 200 mg/l NO_3^- im Tagesdurchschnitt. Eine zusätzliche nitratabhängige Beeinträchtigung der Nitratentfernungsleistung ist somit denkbar. Allerdings gab es auch Situationen, in denen die Wassertemperatur unter 8°C lag und die Anlagenleistung trotzdem hoch war, wie Ende März 2017. Auch im Februar 2019 war die Wassertemperatur bei $5,2^{\circ}\text{C}$ und trotzdem wurden $90,3\%$ des Nitrats entfernt. Die simulierte Flussrate zeigte für März 2017 gemäßigte Werte. Auch die monatlich gemessene Flussrate im Februar 2019 war mit $0,19\text{ l/s}$ entsprechend niedrig, was die Nitratentfernung bei diesen niedrigen Wassertemperaturen positiv beeinflusst haben könnte.

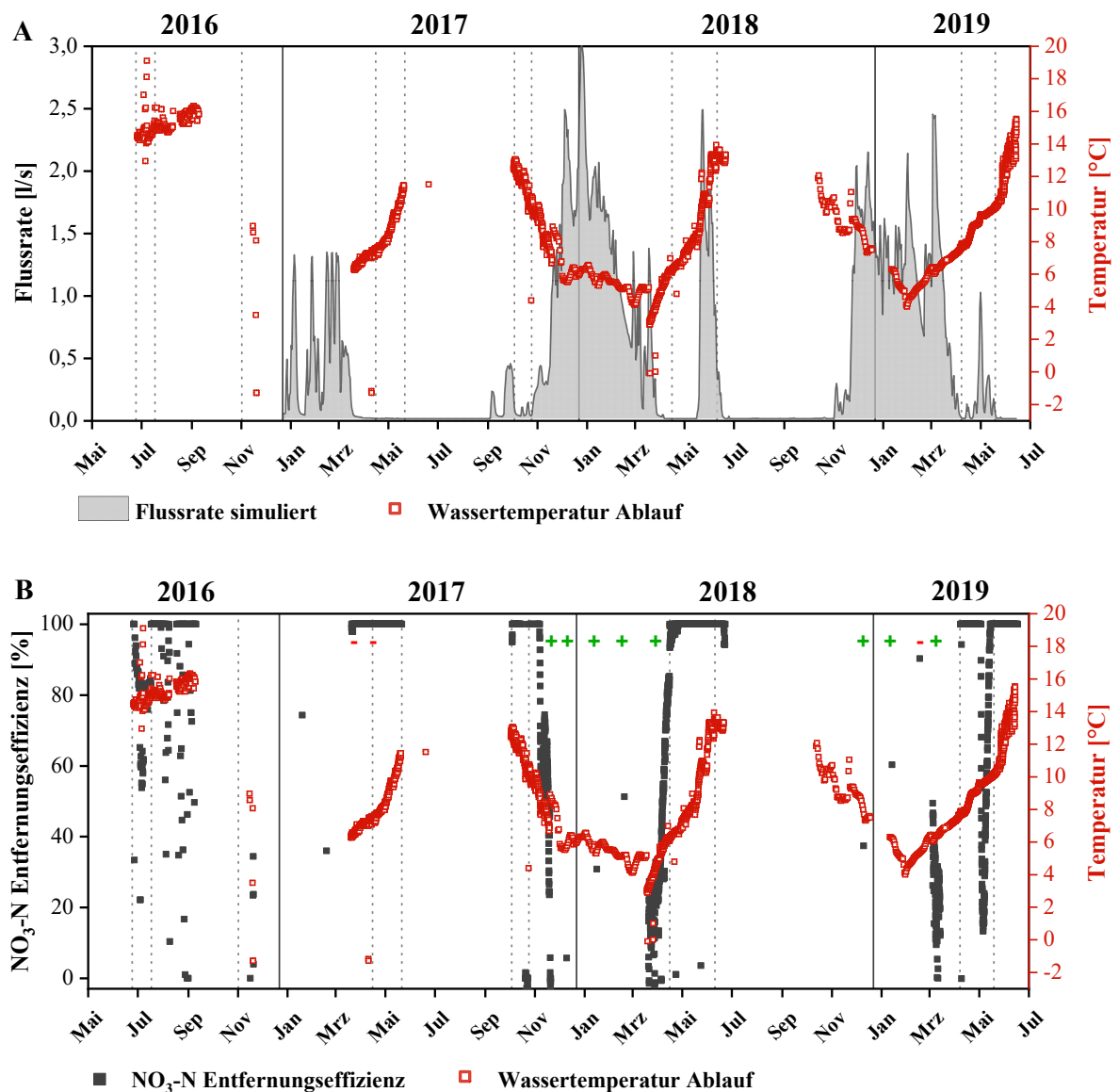


Abbildung 31: Simulierte Flussrate gegen die Wassertemperatur (A) und Nitratentfernungseffizienz gegen den Temperaturverlauf des Ablaufwassers für die Jahre 2016, 2017, 2018, 2019 (B). Grünes Kreuz steht für Zeitpunkte in denen eine Beeinträchtigung der Nitratentfernungseffizienz mit niedrigen Wassertemperaturen korrelierte. Rotes Minus symbolisiert Zeitpunkte in denen keine Korrelation festgestellt werden konnte.

Nitratkonzentration

Auch die Höhe der einfließenden Nitratkonzentration kann die Nitratbeseitigung negativ beeinflussen. Ist die Konzentration des einfließenden Nitrats zu hoch und gegebenenfalls die HRT zu kurz, kann dies zu einer unvollständigen Nitratentfernung in der Anlage führen. In dem Messzeitraum gab es nur ein Ereignis (Ende November 2017), in welchem deutlich erhöhte einfließende Nitratkonzentrationen, im Vergleich zu den restlichen Messungen, auftraten (Abb. 32). Zu diesem Zeitpunkt nahm die Nitratentfernungseffizienz von 100% (15.11.2017) auf 0% (28.11.2017) ab. Die Wassertemperatur war gleichzeitig mit 6 bis 8°C

verhältnismäßig niedrig und auch die Flussrate mit 0,8 l/s relativ hoch. Im Analysezeitraum gab es jedoch weitere Ereignisse, an denen beide Parameter, Temperatur und Flussrate, noch niedriger bzw. höher ausfielen. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass die hohe Nitratkonzentration die Anlagenleistung zusätzlich beeinträchtigt hat. Allerdings kann auch hier die Nitratkonzentration nicht allein der ausschlaggebende Parameter sein, da es Zeiträume gab, in denen die Nitratkonzentration deutlich niedriger lag, die Nitratentfernung jedoch auch wenig effizient ausfiel, wie zum Beispiel im März 2019.

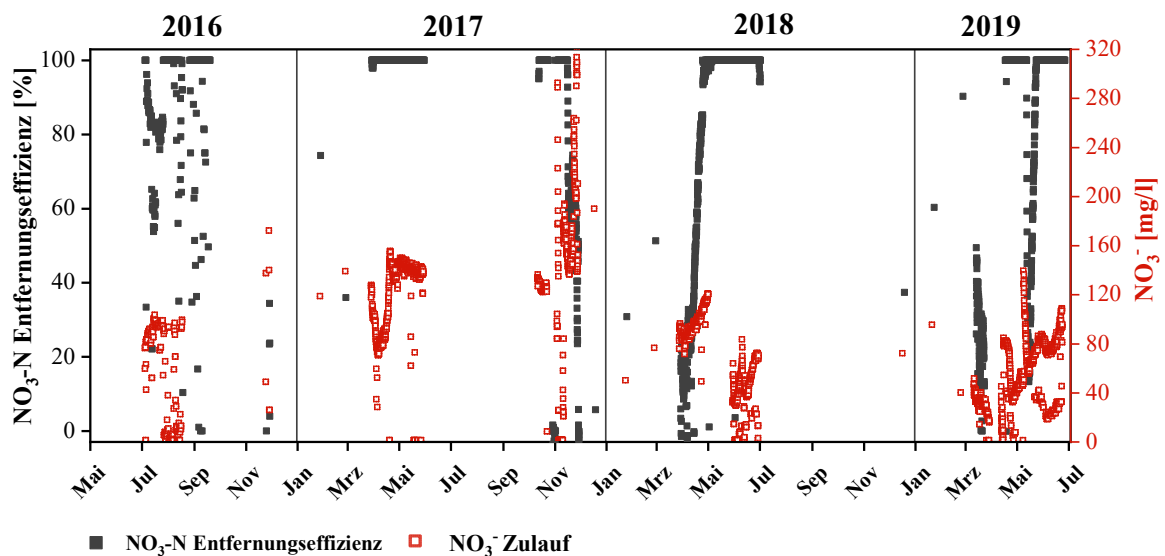


Abbildung 32: Nitratentfernungseffizienz gegen die Nitratkonzentration des Zulaufs für die Jahre 2016, 2017, 2018, 2019.

TOC

Der TOC-Gehalt kann die Nitratentfernung ebenfalls einschränken. Ist der TOC-Gehalt zu niedrig, kann dies zu einer unvollständigen Nitratreduktion führen, da es zu einer Erschöpfung des Elektronendonors kommt. Andererseits ist auch ein zu hoher TOC-Gehalt nachteilig, da bereits Werte von über 40 mg/l eine sehr hohe Belastung für Gewässer bedeuten (LAWA-Arbeitskreis, 1998). Da die mit der Monitoring-Station erfassten Werte nicht immer mit den Kontrollwerten übereinstimmen, ist es hierfür teilweise schwer eine zuverlässige Aussage zu treffen. Allgemein schwankte der TOC-Gehalt zwischen den Monaten häufig. Die Kontrollwerte des Ablaufs lagen immer unter 20 mg/l, außer an drei Ereignissen (April 2017, März 2018, März 2019). An einem davon stieg der TOC-Gehalt sogar überproportional hoch an wie im März 2018 (Abb. 33).

Im vorliegenden Fall kann keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, inwiefern der TOC für die Nitratentfernungseffizienz eine Rolle spielt. Zwar war die TOC-Konzentration

Ende November 2017 bei erschöpfender Nitratentfernungseffizienz verhältnismäßig niedrig, jedoch war das auch im April, Juni 2018 und April 2019 der Fall und dort lag die Nitratentfernungseffizienz bei 100%. Allerdings waren hier auch die einfließenden Nitratkonzentrationen deutlich niedriger als Ende November 2017. So könnte der TOC für die hohen Nitratkonzentrationen dieses Messzeitpunktes nicht ausreichend gewesen sein. Jedoch gibt es auch Fälle, in denen die Elektronendonorkapazität nicht erschöpft war, wie im März 2018 und 2019 und es trotzdem zu einer unvollständigen Nitratentfernung kam.

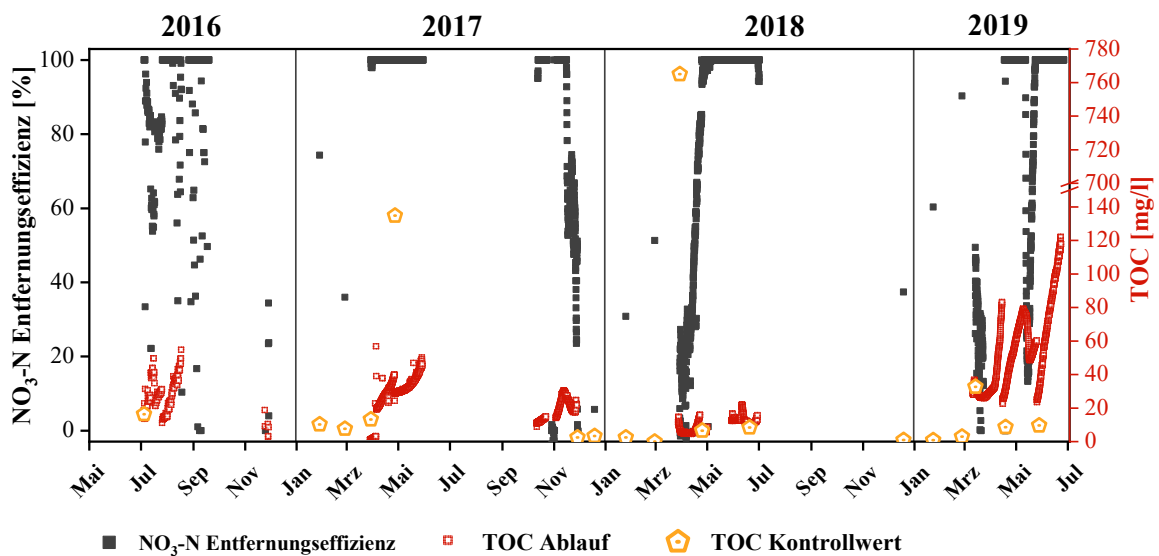


Abbildung 33: Nitratentfernungseffizienz gegen die kontinuierliche und monatlich gemessene TOC-Konzentration des Ablaufs für die Jahre 2016, 2017, 2018, 2019.

Insgesamt zeigt sich, dass die Reduzierung auf einen Parameter als limitierenden Faktor schwer möglich ist. Es stellt sich mehr als ein komplexes Zusammenspiel mehrerer Parameter heraus, die die Nitratentfernungseffizienz bei unterschiedlichen Umweltbedingungen gegenseitig beeinträchtigen. Daher ist allgemein eine gemeinsame Betrachtung der Parameter von Vorteil, um Aussagen über die Nitratentfernungsleistung und deren Limitation treffen zu können.

3.1.5 Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte

Die Möglichkeit der Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte bei dem Einsatz von Umweltdenitrifikationsanlagen ist - wie bereits in der Einleitung beschrieben - durchaus gegeben. Auch in der hier vorliegenden Arbeit sind unter verschiedenen Umweltbedingungen Nebenprodukte aufgetreten, die die Leistungsfähigkeit und Nachhaltigkeit der Anlage mindern können.

Nitritakkumulation

Wie bereits in Kapitel 3.1.1 beschrieben, konnte am Ablauf der Denitrifikationsanlage häufig eine erhöhte Nitritkonzentration beobachtet werden, was negative ökologische Folgen nach sich ziehen würde. Zum einen wirkt Nitrit stärker ökotoxisch auf die Umwelt als Nitrat und zum anderen kann es unter oxidischen Bedingungen wieder zu Nitrat oxidieren. So stellt sich die Frage, ob und wo die Akkumulation von Nitrit innerhalb der Anlage eintritt und welche Faktoren dabei eine maßgebliche Rolle spielen.

Abbildung 34 zeigt die Nitritkonzentration des Zu- und Ablaufs, sowie jene von St. 1, 3 und 4. Zusätzlich ist die monatlich gemessene Flussrate und die Temperatur dargestellt, um einen möglichen Einfluss dieser auf die Nitritakkumulation aufzuzeigen.

Die Analyse der Nitritkonzentration innerhalb der Anlage zeigte, dass in jedem der untersuchten Monate eine Nitritbildung - welche mal stärker und mal geringer ausfiel - festgestellt werden konnte. Die Nitritkonzentration des Zulaufwassers war in allen untersuchten Monaten sehr gering, so dass die Nitritbildung eindeutig erst in der Anlage stattfand. Maximalwerte des Nitrits konnten in der Anlage an St. 4 mit fast 5 mg/l im November 2017 gemessen werden. Dies ist nachvollziehbar, da hier auch die höchste gemessene Nitratkonzentration im Analysezeitraum in das Becken einfluss. Eine Ausnahme bezüglich der Nitritakkumulation bildete die Probe vom April 2019, da hier kein Nitrit in der Anlage gemessen werden konnte. Auch im Mai 2019 erholten sich die erhöhten Nitritwerte von St. 1 bis zum Ablauf wieder, so dass nur geringe Mengen Nitrit (unter 0,1 mg/l) aus der Anlage entlassen wurden. In diesen beiden Monaten war die Flussrate gering. Allerdings zeigte sich, dass eine hohe Flussrate nicht alleine ausschlaggebend auf eine Nitritakkumulation ist. Denn beispielsweise fiel die Nitritakkumulation in der Anlage im Februar 2019 bei einer vergleichbar hohen Nitratkonzentration am Zulauf durchschnittlich höher aus als jene im März 2019, obwohl bei letzterem die Flussrate deutlich höher war. Die erhöhte Nitritakkumulation im Februar 2019 kann somit nicht auf die Flussrate und einfließende Nitratkonzentration zurückgeführt werden. Auch die Wassertemperatur war in diesen beiden Monaten vergleichsweise niedrig mit 5-6°C. Ein Unterschied war jedoch die Außentemperatur, die im Februar 16°C und im März nur 5°C betrug.

Allgemein kann festgehalten werden, dass in der Anlage nur in seltenen Fällen kein Nitrit entstanden ist. Der ausschlaggebende Faktor hierfür ist jedoch nicht für jede Gegebenheit eindeutig feststellbar.

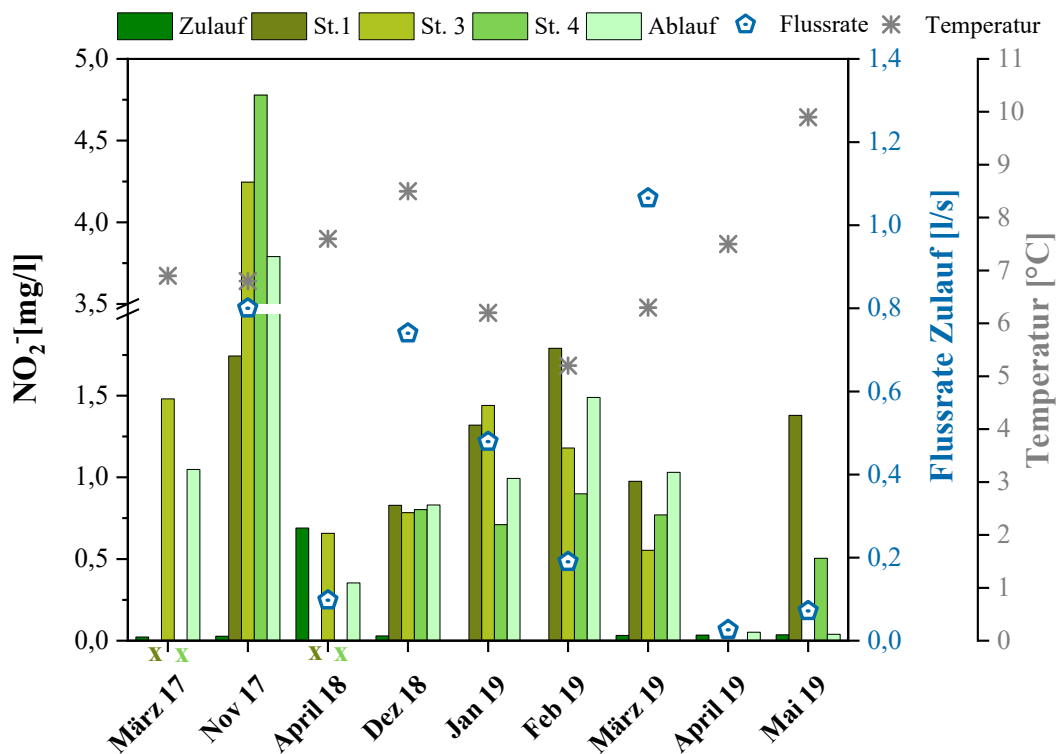


Abbildung 34: Nitritkonzentration an den verschiedenen Probeentnahmestellen (St. 1 bis 4) sowie vom Zu- und Ablauf im Messzeitraum. Zusätzlich sind die Flussrate des Zulaufs sowie die Wassertemperatur am Ablauf dargestellt. Im März 17 und April 18 wurde für St. 1 und St. 3 keine Probe für die Analyse entnommen, was mit einem X gekennzeichnet ist.

Emission von Treibhausgasen

Einmal monatlich wurden von jeder Probenentnahmestelle (St.) Proben für die Gasanalyse genommen (siehe Kapitel 2.1.3.2.). Insbesondere die Analyse von klimaschädlichen Treibhausgasen wie CH_4 , CO_2 und N_2O war von Interesse, um die Umweltverträglichkeit der Anlage abschätzen zu können.

Bezüglich der Methanproduktion verhielt sich jede Probenentnahmestelle unterschiedlich, wie Abbildung 35 zeigt. St. 1 wies in jedem Monat die höchste Methanproduktion auf, mit einem Maximalwert von über 20 Vol.-% im September 2018. Insgesamt hatten die Messungen der meisten Probenentnahmestellen in den Monaten September und Oktober 2018 ihre Maximalwerte. Ausnahmen bildeten St. 4 und 6, an denen die Anlage im Analysezeitraum meist nur sehr geringe Mengen oder kein Methan emittierte. Allerdings startete die Analyse von St. 4 erst Ende November 2017 und jene für St. 6 erst im August 2018, da zuvor nicht mit einem heterogenen Verhalten der verschiedenen Probenentnahmestellen bezüglich der Gasproduktion gerechnet wurde. Eine interessante Beobachtung war zudem, dass die Methanproduktion immer dann am höchsten ausfiel, wenn

der Zufluss in die Anlage gering oder null war, wie beispielsweise in den trockenen Sommermonaten. Sobald der Zufluss in das Becken anstieg, sank die Methanproduktion wieder, wie in den regenreichen Herbst- und Wintermonaten. Ausnahmen bildeten die Messungen im April, Mai und Juni 2019. Hier waren trotz einer geringen Flussrate bis hin zu keinem Zufluss, keine erhöhten Methanemissionen messbar.

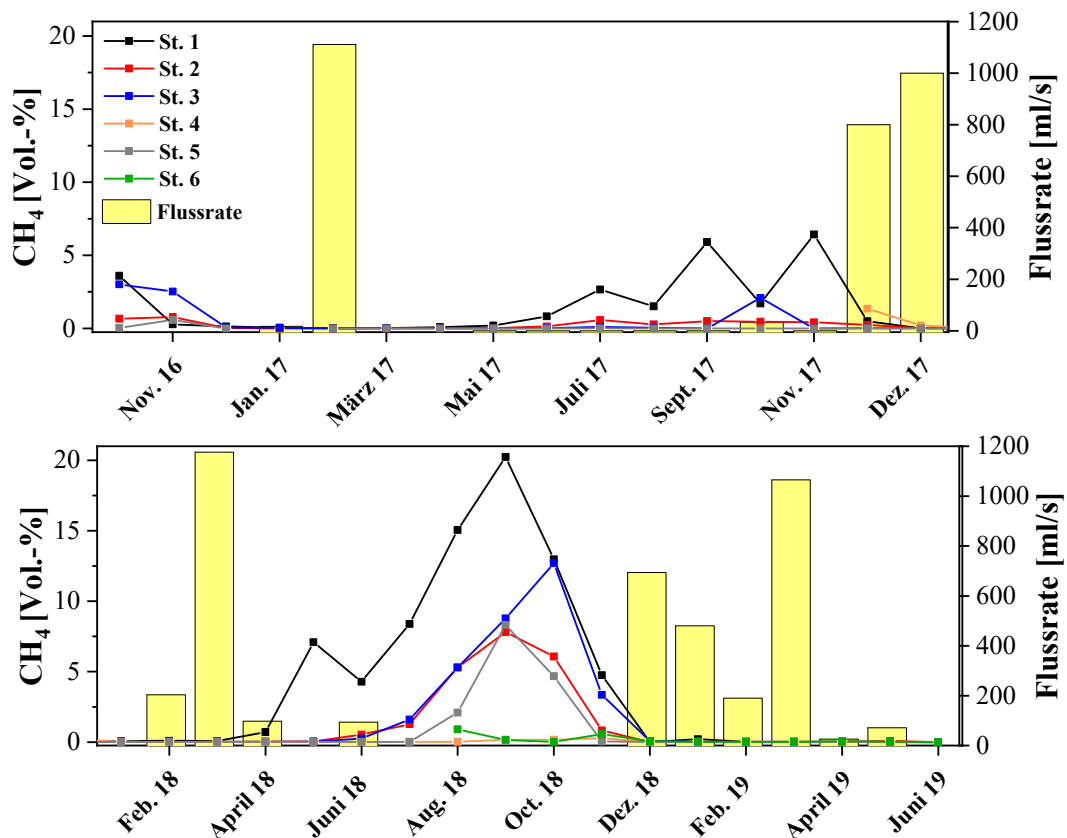


Abbildung 35: Monatliche Analyse der Methanproduktion an den Probeentnahmestellen (St.) sowie die monatliche Flussrate des Zulaufs in die Umweltdenitrifikationsanlage.

Die monatlichen Messungen vermitteln zwar einen guten Überblick über die Treibhausgasemission, jedoch ist eine höhere Auflösung über mehrere Tage hinweg wünschenswert, um die Dynamik der Gasproduktion insgesamt und zwischen den Probeentnahmestellen zu bewerten. Hierfür wurde der Micro GC im Juni, Juli, August und September 2018 für mehrere Tage direkt vor Ort installiert, so dass jede Probeentnahmestelle in einem Intervall von 4 bis 6 Stunden gemessen wurde (siehe Kapitel 2.1.3.2). Über den Zeitraum dieser Messungen hinweg war kein Fluss in oder aus der Anlage vorhanden, weswegen dieser in Abbildung 36A nicht dargestellt ist. Das erste Messintervall startete am 19. Juni 2018 und sollte eine Woche lang in einem 6-Stunden Rhythmus messen. Aufgrund eines Softwarefehlers wurde die automatische Messung nur für 24h durchgeführt und versagte anschließend. Aus diesem Grund wurde die Micro GC erneut am 25.07.2018

installiert und bis zum 07.08.2018 mit einem 4h-Messintervall betrieben. Wie bereits bei den Monatsmessungen zeigte auch die Daueranalyse die höchste Methankonzentration bei St. 1, gefolgt von St. 6 (Abb. 36A). Diese Probenentnahmestelle wies zudem einen 8 bis 12-Stunden-Rhythmus auf, der seinen Methan-Tiefpunkt meist in den frühen Morgenstunden um circa 6:00 Uhr erreichte und die höchsten Methankonzentrationen in den späten Nachmittags- und Abendstunden zwischen 18:00 und 22:00 Uhr aufwies. Wird diese Methanschwankung den an St. 6 gemessenen Sauerstoffwerten gegenübergestellt, ist deutlich zu erkennen, dass die Methanschwankung mit der Sauerstoffkonzentration korreliert, da diese beiden Parameter entgegengesetzt zueinander verliefen (Abbildung 36B).

Die Methankonzentration der anderen Probeentnahmestellen verhielt sich bei der Dauermessung ähnlich zu den Monatsmessungen. So zeigte St. 4 keine oder nur eine sehr geringe Methankonzentration von wenigen Vol.-%, gefolgt von St. 5. Insgesamt erreichten die Methanwerte für alle St. (außer St. 4) in den Sommermonaten 2018 ihre höchsten Konzentrationen des gesamten Analysezeitraumes.

Im September 2018 sollte eine erneute Dauermessung gestartet werden, um die zuvor beobachteten Schwankungen zu verifizieren. Aufgrund der geringeren Sonneneinstrahlung und kürzeren Tageslänge und einer daraus resultierenden schwachen Stromversorgung konnte die Messung nur einen Tag durchgeführt werden. In diesem kurzen Messfenster wurde keine erneute Methanschwankung bei St. 6 festgestellt, jedoch bei St. 5. Die Sauerstoffkonzentrationen fielen diesmal höher aus als bei St. 6. Um diese Beobachtung jedoch zuverlässig bestätigen zu können, ist eine längere Messperiode erforderlich.

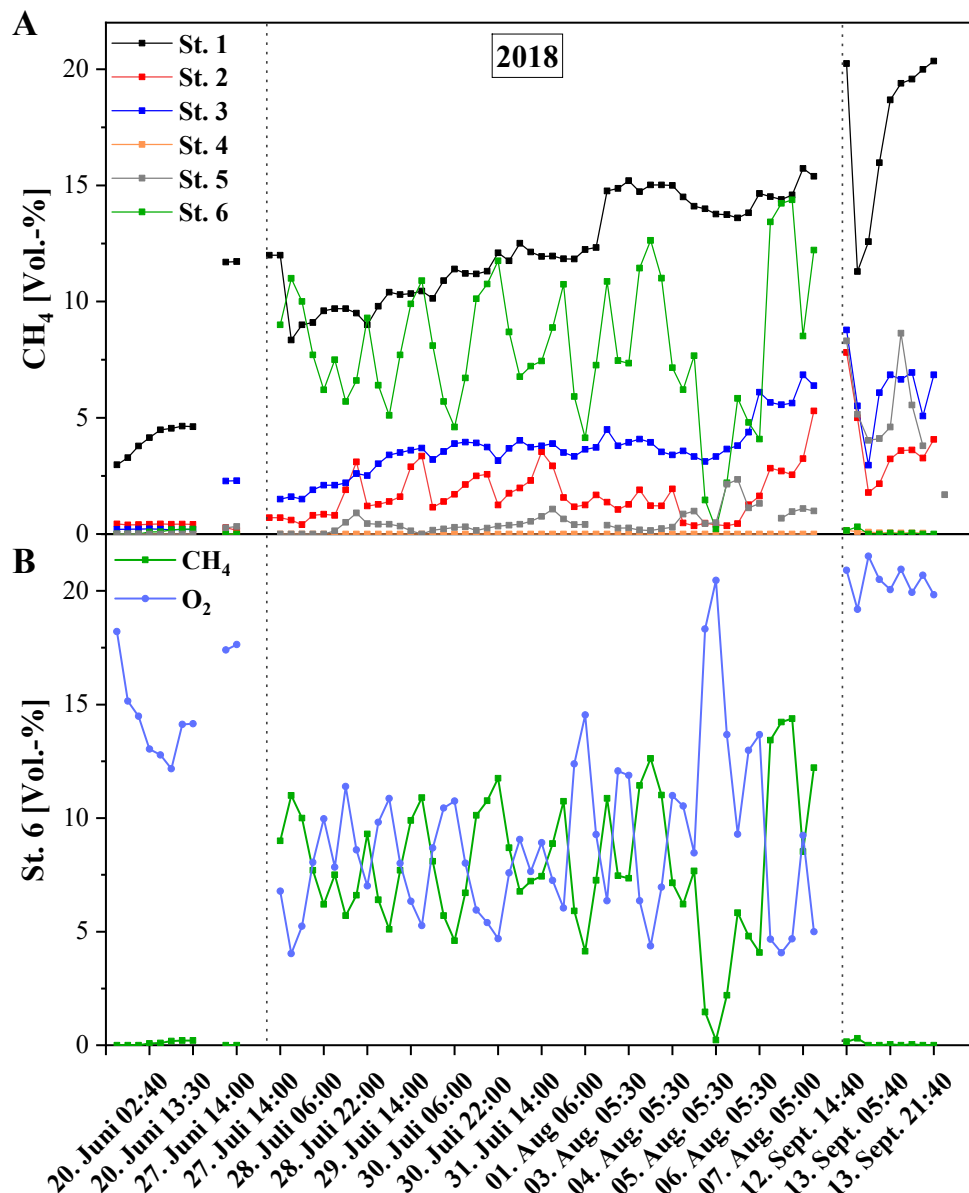


Abbildung 36: CH₄-Konzentration der Dauermessung für die einzelnen Probeentnahmestellen (A). CH₄-Konzentration gegen die O₂-Konzentration für den Zeitraum der Dauermessung (B). Gestrichelte Linie zeigt die Zeitpunkte, an welchen eine neue Dauermessung startete.

Kohlenstoffdioxid (CO₂)

Bezüglich des CO₂-Ausstoßes waren im ersten Jahr des Messzeitraums keine deutlichen Unterschiede zwischen den Probeentnahmestellen zu erkennen (Abb. 37). Die CO₂-Konzentration lag für St. 1, 2, 3 und 5 bei 5 bis 15 Vol.-%. Erst während der heißen Sommermonate im Jahr 2018 zeigten sich Unterschiede bei der CO₂-Konzentration an den einzelnen Probeentnahmestellen. Wie bei den Methanmessungen trat die höchste Konzentration von bis zu 27,6 Vol.-%, bei St. 1 auf, gefolgt von St. 3 mit 19,8 Vol.-%. St. 4 hingegen wies ab dem Jahr 2018 keine erhöhten CO₂-Werte mehr auf und so lagen diese

immer unter 0,5 Vol.-%. Allgemein glich die gasförmige Zusammensetzung dieser Probenentnahmestelle meistens jener der Umgebungsluft.

Weiterhin schien die Flussrate, insbesondere im Jahr 2017, keinen deutlichen Einfluss auf die CO₂-Emission zu haben. Erst ab Dez. 2018, nach der Trockenperiode, nahm die CO₂-Konzentration mit steigender Flussrate wieder ab.

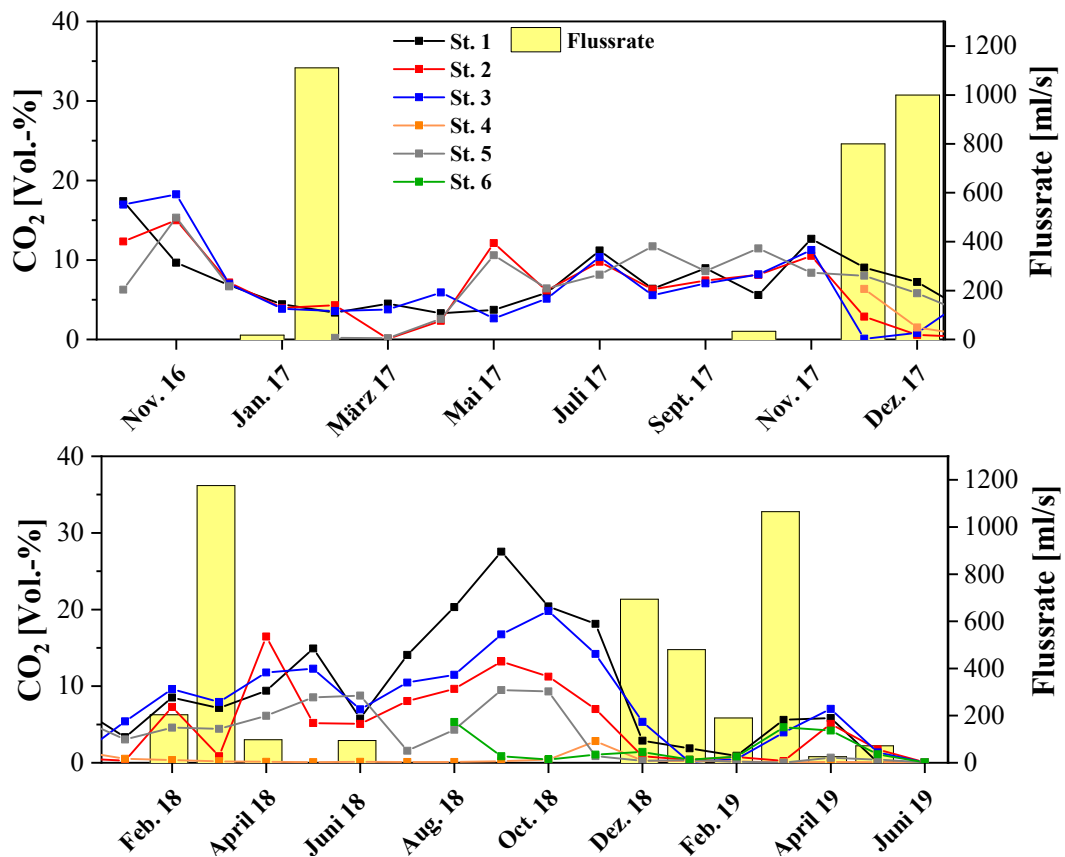


Abbildung 37: Monatliche Analyse der CO₂-Emission an den Probeentnahmestellen (St.) sowie die monatliche Flussrate des Zulaufs in die Umweltdenitrifikationsanlage.

Die Dauermessung Ende Juli bis Anfang August 2018 zeigte auch für diesen Parameter und insbesondere an St. 6 ein alternierendes Verhalten der CO₂-Konzentration von 12 Stunden und zu denselben Uhrzeiten, wie sie auch für die CH₄-Emission festgestellt werden konnte. In Abbildung 38B sind diesmal die CH₄-Schwankungen gegen die CO₂-Werte aufgetragen und es ist deutlich zu erkennen, dass diese beiden Parameter analog zueinander steigen und sinken.

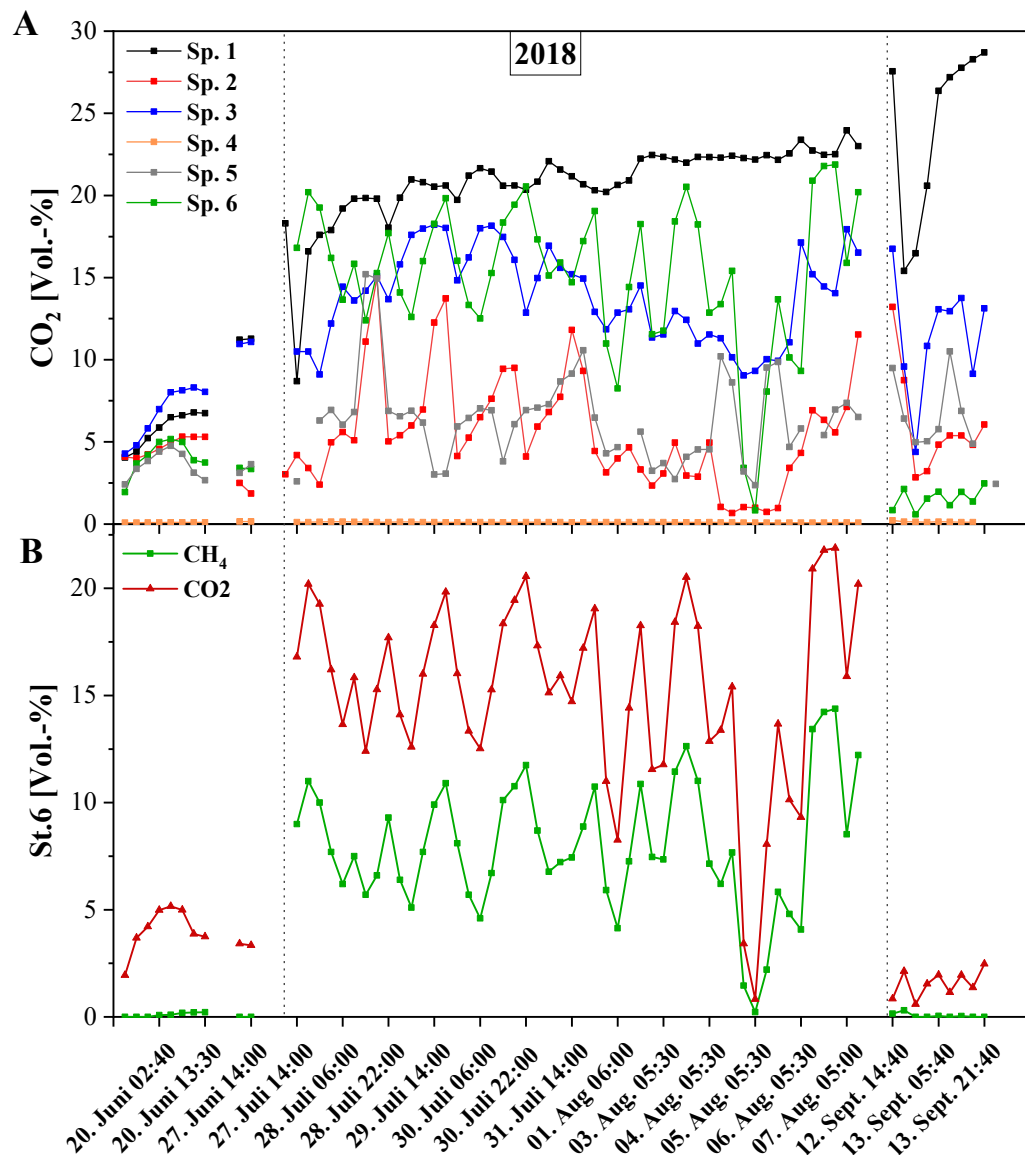


Abbildung 38: CO₂-Konzentration der Dauermessung für die einzelnen Probeentnahmestellen (A). CO₂-Konzentration gegen die CH₄-Konzentration für den Zeitraum der Dauermessung (B). Gestrichelte Linie zeigt die Zeitpunkte, an welchen eine neue Dauermessung startete.

Distickstoffmonoxid (N₂O)

Die Produktion des Treibhausgases N₂O fiel im gesamten Analysezeitraum gering aus und lag meistens im Bereich von unter 40 ppm an allen Probeentnahmestellen. Einzig Ende November 2017 wiesen St. 4, 5 und 1 leicht erhöhte Werte von bis zu 144 ppm auf. Die Konzentrationen sanken in den anschließenden Monaten allerdings wieder auf unter 40 ppm ab (Abb. 39). Da die N₂O-Konzentration generell gering ausfiel, konnte auch kein direkter Zusammenhang mit der Flussrate festgestellt werden.

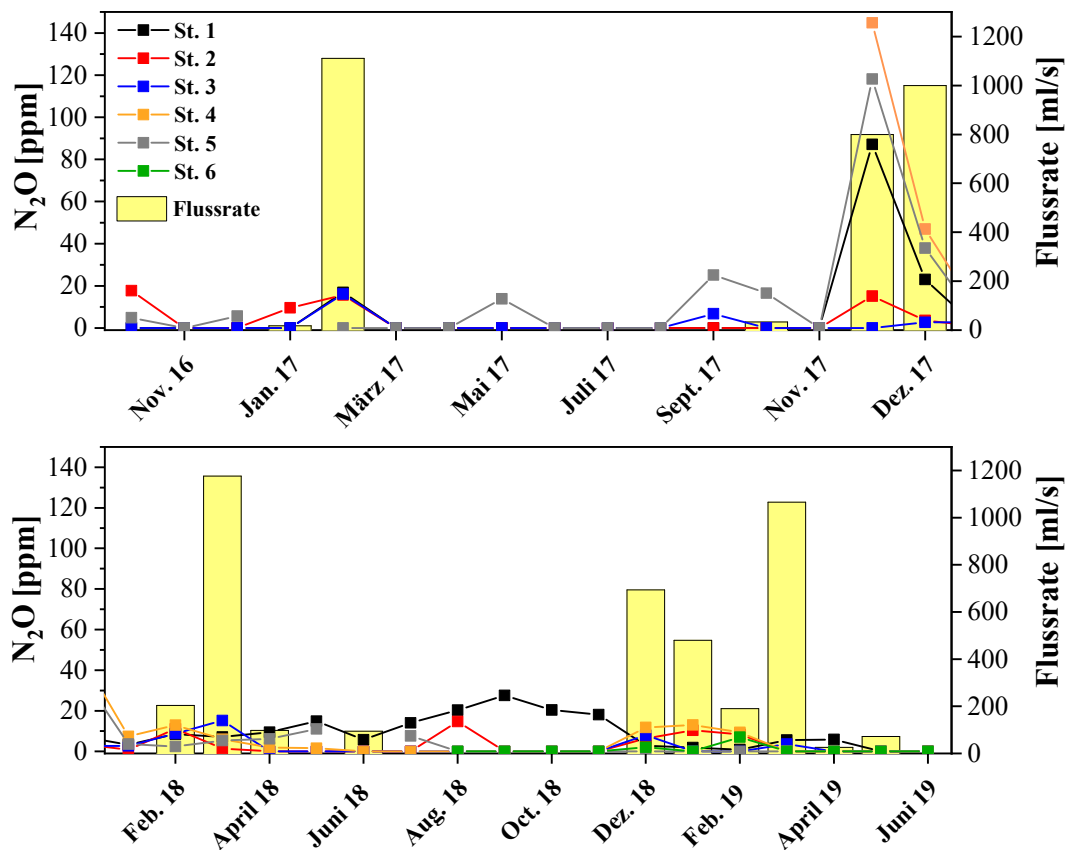


Abbildung 39: Monatliche Analyse der N_2O -Produktion an den Probeentnahmestellen (St.) sowie die monatliche Flussrate des Zulaufs in die Umweltdenitrifikationsanlage.

Die Dauermessung im Sommer 2018 zeigte die höchste N_2O -Konzentration erneut an St. 1, welche im September einen Wert über 250 ppm erreichte. Im Zeitraum von Juli und August waren die Werte für St. 3 und 6 ähnlich hoch. An St. 4 und 5 konnte für den gemessenen Zeitraum keine N_2O -Produktion ermittelt werden (Abb. 40A). Wie bereits bei Methan und CO_2 alternierte auch die N_2O -Emissionen insbesondere an St. 6. Diese Schwankungen verlaufen analog zu den CH_4 - und CO_2 -Werten. Die Schwankungen der Sauerstoffkonzentration verlaufen gegensätzlich hierzu (Abb. 40B).

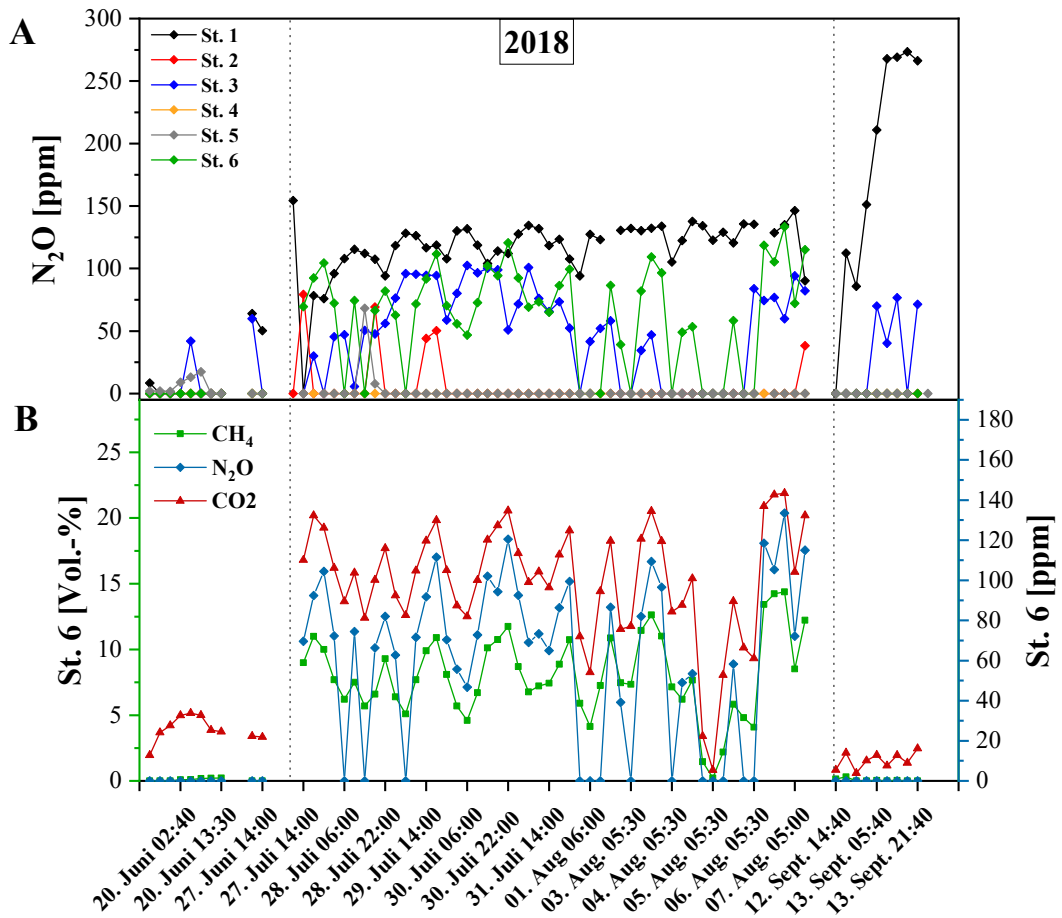


Abbildung 40: N₂O-Konzentration der Dauermessung für die einzelnen Probeentnahmestellen (A). N₂O-Konzentration gegen die CH₄-und CO₂-Konzentration für den Zeitraum der Dauermessung (B). Gestrichelte Linie zeigt den Zeitpunkt, an welchem eine neue Dauermessung startete.

3.1.6 Das Mikrobiom der Umweltdenitrifikationsanlage

Wie bereits beschrieben spielt die mikrobielle Zusammensetzung in Denitrifikationsanlagen für deren Funktionalität und Leistung eine entscheidende Rolle. Daher soll im Folgenden zum einen die mikrobielle Diversität über die Jahreszeiten hinweg und zum anderen auch spezifische Organismengruppen vorgestellt werden, die an der Denitrifikation sowie an der Hydrolyse des Holzmaterials beteiligt sind. Diese werden als die sogenannten mikrobiellen Schlüsselorganismen der Anlage bezeichnet.

3.1.6.1 Mikrobielle Diversität

Von August 2016 bis April 2018 wurden zu verschiedenen Jahreszeiten im Jahr Proben für die Diversitätsanalyse via 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung genommen. Hierbei wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Beprobung zu verschiedenen Temperatur- und Witterungsverhältnissen stattfand, wie z.B. zu nassen und kalten Zeitpunkten mit hoher Abflussrate (November), heißen und trockenen Perioden (August/September) oder in feuchten und klimatisch gemäßigten Monaten (März/April). Abbildung 41 zeigt die bakterielle Diversität auf Phylum-Ebene für die planktonische und feste Phase. Die Analyse zeigt, dass die Hauptzusammensetzung der Bakterien über die Monate hinweg stabil blieb und die einzelnen Phyla meist nur in ihrer relativen Häufigkeit leicht schwankten. Ein eindeutiges Muster für kalte und warme Jahreszeiten war somit nicht zu erkennen. Unterschiede in der bakteriellen Diversität gab es hingegen zwischen der flüssigen und Biofilmphase der Anlage.

Auch wenn das häufigste Phylum in beiden Phasen die Proteobakterien darstellt, ließ die 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung für jede Phase charakteristische Phyla erkennen. So traten Chloroflexi, Verrucomicrobia und Acidobacteria nur in der Biofilmphase auf, während Firmicutes, Parcubacteria und Microgenomates fast ausschließlich in der planktonischen Phase nachgewiesen werden konnten.

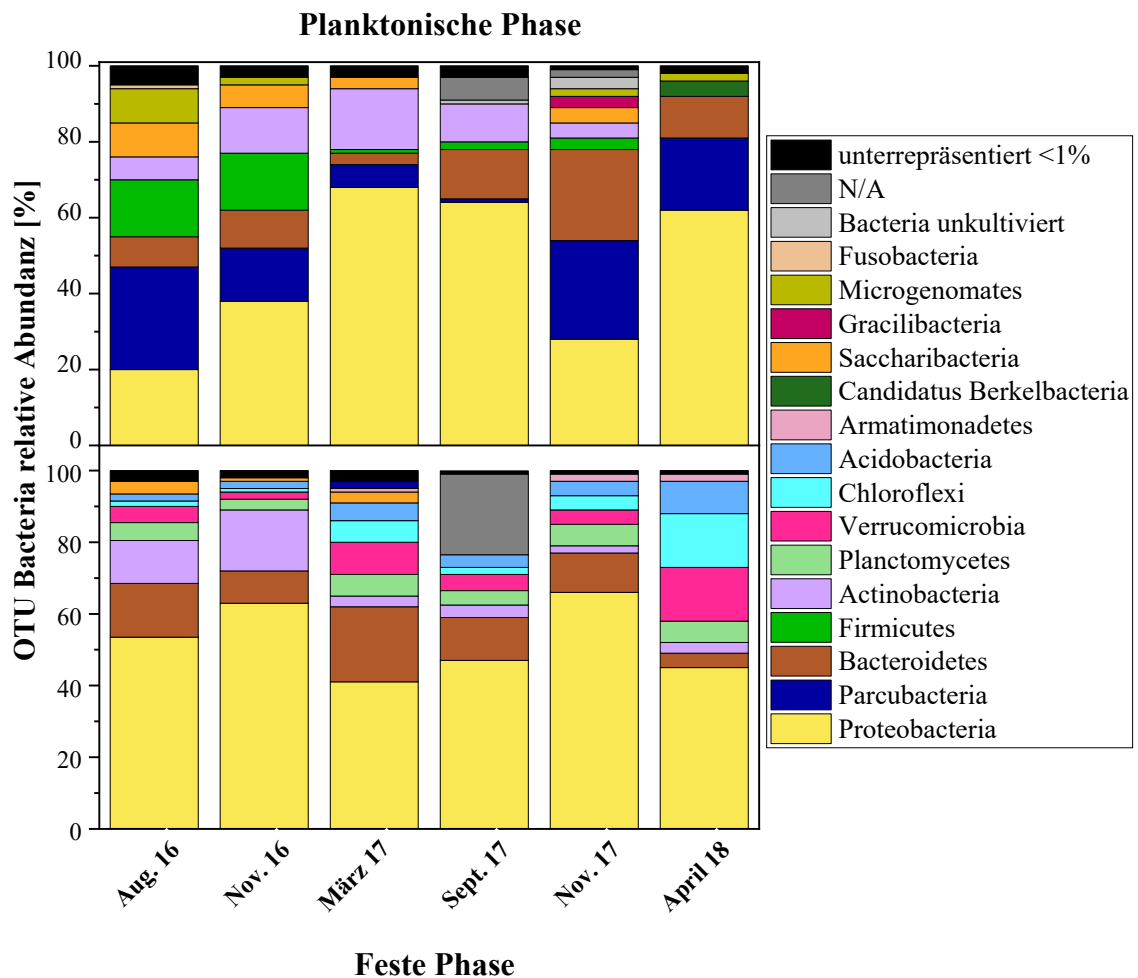


Abbildung 41: Mikrobielle Diversität (OTU Bacteria) der Umweltdenitrifikationsanlage auf Phylum-Ebene für die planktonische (oben) und die feste Phase (unten).

Um eine genauere Aufschlüsselung über die mikrobielle Diversität in der Anlage zu erhalten, wurden die Proben zusätzlich noch auf der taxonomischen Ebene der Ordnung näher betrachtet (Abb. 42). Bei den Proteobakterien dominierte in beiden Phasen meist die Ordnung der Rhizobiales (bis zu 49% in der festen, bis zu 45% in der planktonischen Phase). Eine Ausnahme bildete die Probe vom April 2018. Zu diesem Zeitpunkt waren Mitglieder der Rhizobiales mit unter 1% relativer Abundanz in der planktonischen Phase vertreten. An zweiter Stelle trat innerhalb der Proteobakterien die Ordnung Burkholderiales, die in der festen Phase mit bis zu 17% und in der planktonischen Phase mit bis zu 23% relativer Abundanz vertreten war. Die Biofilmphase besaß als durchschnittlich dritthäufigste Ordnung der Proteobakterien die Sphingomonadales und Xanthomonadales (mit bis zu 7%). Diese beiden Ordnungen konnten in der flüssigen Phase hingegen nur selten gefunden werden oder fehlten gänzlich. Im Gegensatz dazu waren in der planktonischen Phase in manchen Proben vermehrt Vertreter der Rhodocyclales (17%), Rhodospirillales (9%) und Pseudomonadales (9%) zu finden, die in der festen Phase deutlich unterrepräsentierter waren. Weitere häufig

vorkommende Ordnungen anderer Phyla waren in der planktonischen Phase die Sphingobacteriales, Flavobacteriales und Bacteroidales aus den Bacteroidetes sowie die Selenomonadales und Clostridiales aus den Firmicutes und Micrococcales und Frankiales aus den Actinobacteria. In der festen Phase konnten bezüglich dieser Phyla, Bacteroidetes und Actinobacteria, ähnliche Ordnungen gefunden werden, bis auf jene der Bacteroidales. An deren Stelle traten die Cytophagales sowie die Frankiales. Zudem waren in dieser Phase noch weitere Ordnungen jener Phyla (Acidobacteria, Verrumicrobia, Chloroflexi und Planctomycetes) zu finden, die, wie bereits erwähnt, in der planktonischen Phase nicht auftraten.

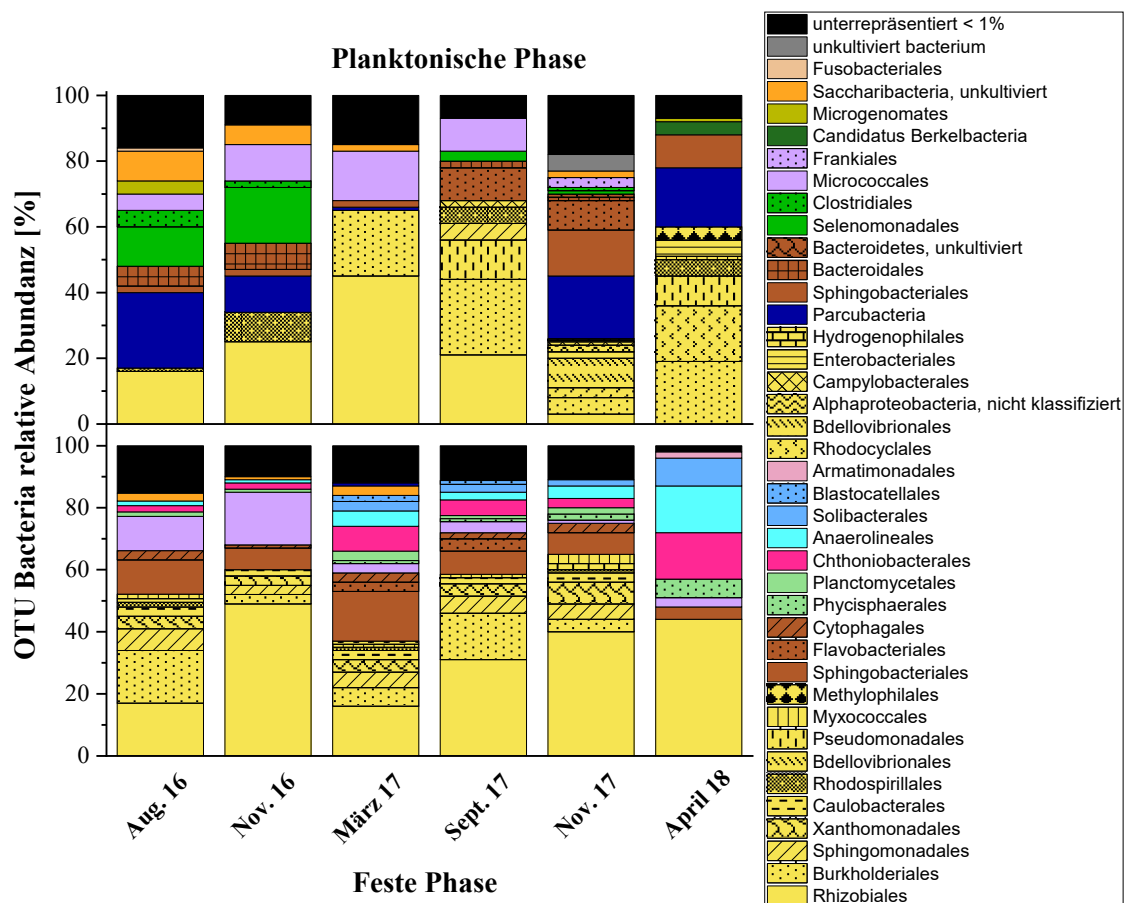


Abbildung 42: OTU Bacteria in der Umweltdenitrifikationsanlage auf Ordnungsebene für die planktonische (oben) und die feste Phase (unten).

Die Diversitätsanalyse mittels 16S-rDNA-Amplikon-Sequenzierung kann aufgrund der Primerabhängigkeit zu einem Bias führen, der die Detektion einiger Organismen bevorzugt oder vernachlässigt. Zudem wurde nur das 16S-rRNA-Gen und nicht das 18S-rRNA-Gen analysiert, welches auf die Detektion eukaryotischer Organismen abzielt. Somit war diese Analyse blind für das potentielle Vorhandensein eukaryotischer Organismen. Daher wurde

eine weitere phylogenetische Klassifikation mit Metagenomdaten vom April 2018 durchgeführt, die im Folgenden näher beschrieben wird. Es sollte damit festgestellt werden, ob die mikrobielle Zusammensetzung des Metagenoms weitestgehend mit der Amplikon-Sequenzanalyse des 16S-rRNA-Gens übereinstimmt und zudem zeigen, welche eukaryotischen Organismen in den Proben vorliegen. Insgesamt konnte in der festen Phase eine geringere *Read*-Anzahl gefunden werden als in der planktonischen Phase. Tabelle 19 liefert eine Übersicht der Analyseergebnisse.

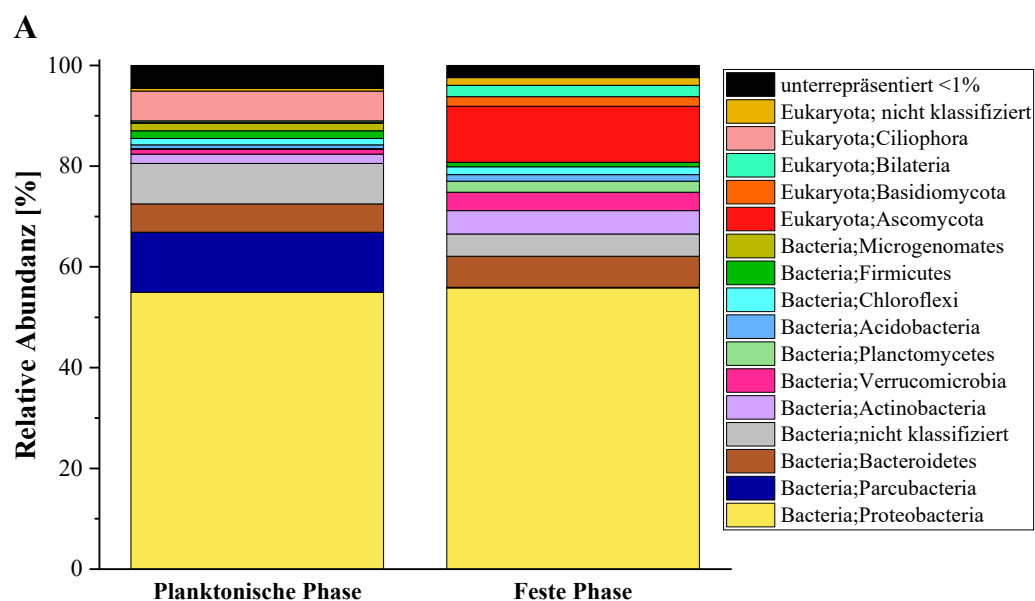
Tabelle 19: Sequenzanzahl der Metagenom-Analyse mit Metaxa2 für die planktonische und feste Probe mit der SILVA128 Datenbank als Referenz.

	Sequenzen planktonisch	Sequenzen Biofilm
Anzahl in der Eingabedatei	224809326	215053604
Erkannt als SSU	170025	95844
Anzahl erfolgreich klassifizierter SSU	167760	94745
Anzahl unklarer Klassifizierungen	2265	1099
Anzahl der SSU zugeordnet zu Archaea	146	6
Anzahl der SSU zugeordnet zu Bacteria	153730	73875
Anzahl der SSU zugeordnet zu Eukaryota	13388	16231
Anzahl der SSU zugeordnet zu Chloroplast	269	38
Anzahl der SSU zugeordnet zu Mitochondria	227	4595
Anzahl der SSU mit ungewisser Zuordnung	2265	1099

Die taxonomische Klassifikation auf Grundlage der Metagenom-Analyse entspricht weitestgehend der 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung, da der Großteil der *reads* wieder dem Phylum Proteobakterien zugeordnet werden konnte und einige derselben Phyla - wie bei der 16S-rDNA-Analyse - vorrangig nur in einer der beiden Phasen auftraten (Abb. 43A). Auch die Verteilung auf Ordnungsebene innerhalb der Proteobakterien verhielt sich ähnlich zur Amplikon-Sequenzierung (Abb. 43B). In der festen Phase waren die Rhizobiales mit 36,7% relativer Häufigkeit erneut die dominierende Ordnung, gefolgt von den Burkholderiales (3,8%), Xanthomonadales (3%) und Sphingomonadales (2,6%). Die planktonische Phase hingegen wurde hauptsächlich durch die Ordnung Burkholderiales

(18%) repräsentiert, gefolgt von den Rhodocyclales (13,5%), nicht klassifizierten Betaproteobakterien (9,2%) und Rhodospirillales (3%). Neue Erkenntnisse konnten mit Hilfe der Metagenom-Analyse auf der Ebene der Eukaryoten erlangt werden. Fungi (Ascomycota und Basidiomycota) traten in größerem Umfang mit 13% nur in der festen Phase auf, während in der planktonischen Phase eukaryotische Organismen mit 5,9% hauptsächlich durch die Ciliophora repräsentiert wurden. Fungi waren in dieser Phase hingegen deutlich unterrepräsentiert. Die nachgewiesenen Fungi in der festen Phase gehörten hauptsächlich zu den Pezizomycotina (8%). Die Ciliophora in der planktonischen Phase stammten überwiegend aus der Klasse Spirotrichea (4,7%). Die Bilateria, die einen geringeren Prozentsatz in der Biofilmphase ausmachten, wurden vorwiegend von der Klasse der Chromadorea repräsentiert.

Allerdings wies die Metagenom-Analyse auch Unterschiede zur 16S-rDNA-Amplikon-Analyse auf. So ergab sie beispielsweise einen höheren Anteil an nicht klassifizierten Bakterien, die keinem Phylum zugeordnet werden konnten. Vertreter der Pseudomonadales konnten in der planktonischen Phase nicht mehr gefunden werden, dafür ein größerer Anteil an nicht klassifizierten Betaproteobakterien. Außerdem wurde in der festen Phase der Metagenom-Sequenzierung eine größere Diversität an Vertretern der Proteobakterien detektiert, verglichen mit der 16S-rDNA-Sequenzierung, bei welcher die Rhizobiales dominierten. Auch beim Phylum der Planctomycetes gab es einen Unterschied. Überwog in der 16S-rDNA-Analyse der festen Phase noch die Ordnung Phycisphaerales, waren es bei der Metagenom-Analyse Vertreter der Planctomycetales.



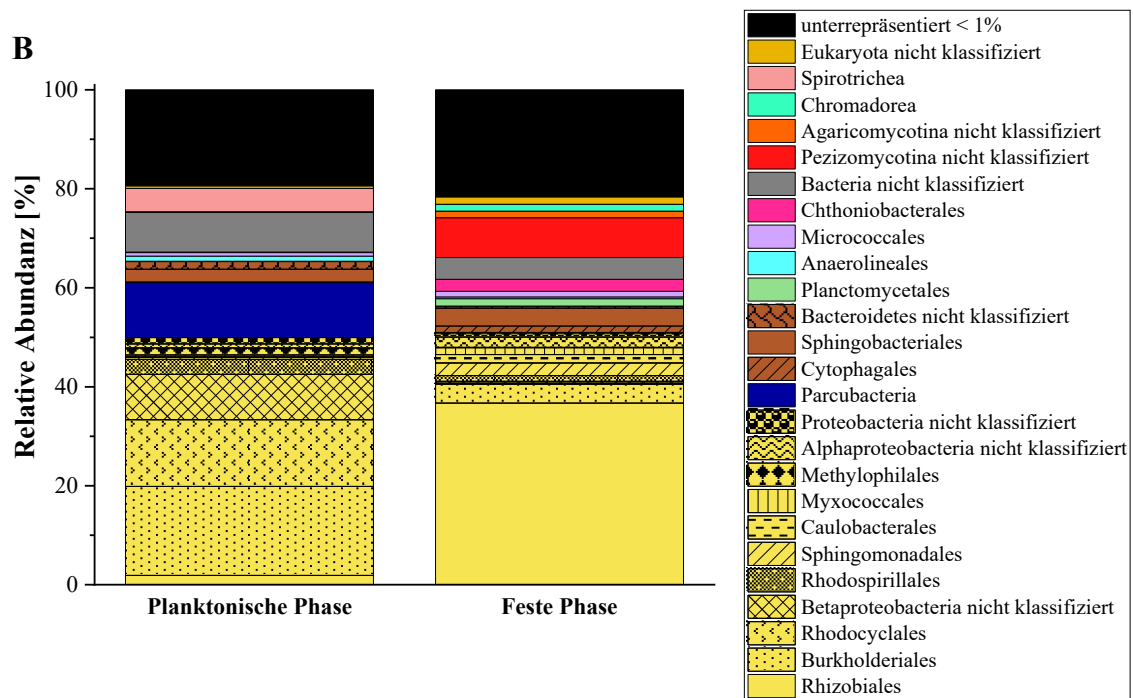


Abbildung 43: Taxonomische Klassifikation der Metagenom-Sequenzierung vom 24.04.2018 auf Phylum- (A) und Ordnungs-Ebene (B) für die planktonische und feste Phase in der Umweltdenitrifikationsanlage.

Basierend auf der metagenomischen Analyse konnten Mitglieder der Archaea nur mit 0,09% relativer Häufigkeit in der planktonischen Phase nachgewiesen werden und waren in der festen Phase mit 0,007% sogar noch weniger vorhanden. Darüber hinaus bestätigte die 16S-rRNA-Gen-Amplikonanalyse diese Beobachtung. Denn auch hier konnten den Archaea insgesamt weniger *reads* zugeordnet werden, im Vergleich zur Analyse bakterieller 16S-rRNA-Gene. So konnten im März 2017 keine *reads* gefunden werden, die den Archaea zuzuordnen sind (Abb. 44). Dennoch, auch wenn die Gesamtanzahl der *reads* für Archaea gering war, bestanden auch für diese Domäne Unterschiede zwischen der planktonischen und festen Phase. So bestand erstere Phase vorrangig aus methanogenen Organismen mit Vertretern der Ordnung Methanomicrobiales und Methanobacterales, was auch durch die taxonomische Analyse des Metagenoms bestätigt wurde. Ein weiterer Hauptvertreter der planktonischen Phase in der 16S-rRNA-Amplikon-Analyse (die im Metagenom nicht nachgewiesen werden konnte) waren die Woesearchaeota, bei denen angenommen wird, dass sie eine syntrophe Beziehung zu Methanogenen haben (Liu *et al.*, 2018). Die Festphase bestand hauptsächlich aus verschiedenen Gruppen von Thaumarchaeota. Jedoch konnte auch diese Beobachtung durch die Metagenom-Analyse nicht bestätigt werden.

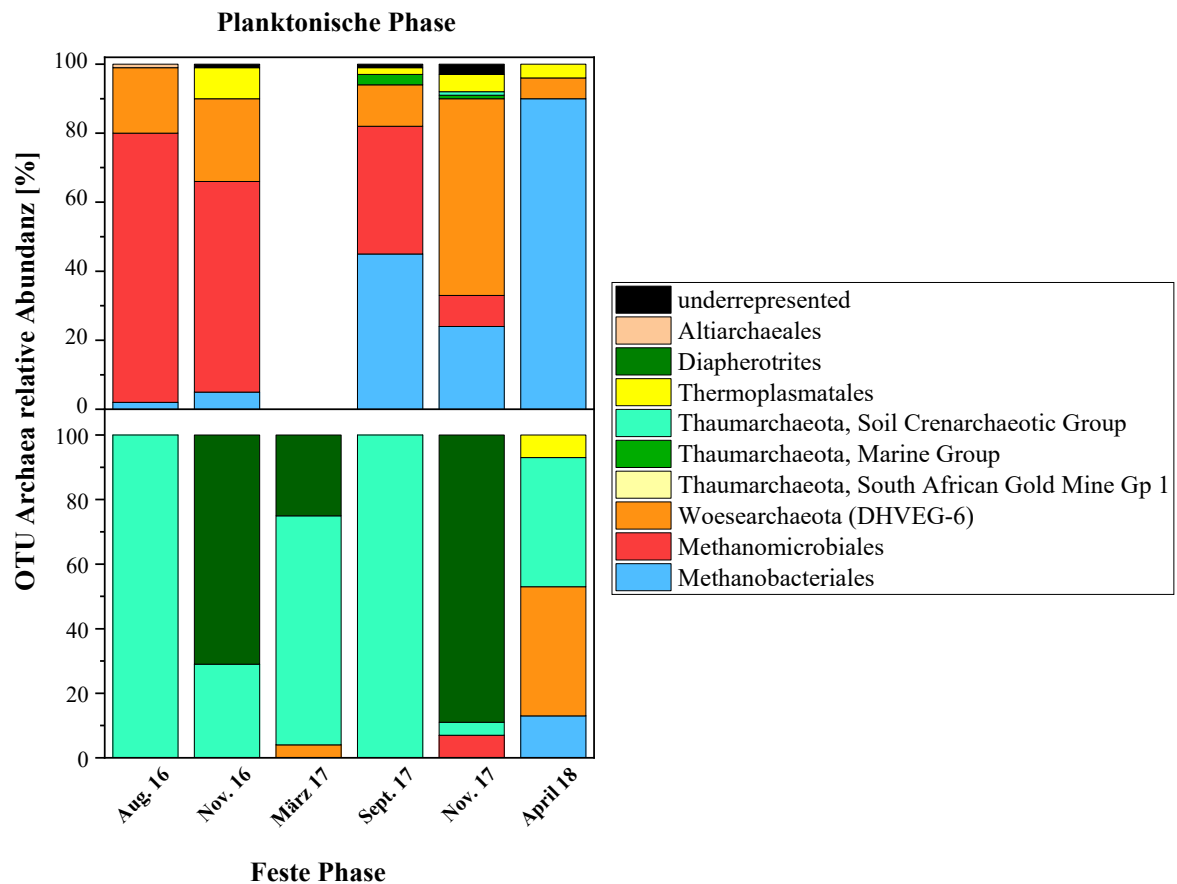


Abbildung 44: OTU Archaea auf Ordnungs-Ebene für die feste und planktonische Phase der Umweltdenitrifikationsanlage.

Allgemein lässt sich zusammenfassen, dass die Sequenzanalysen des 16S-RNA-Gens und des Metagenoms bezüglich der Diversität ähnliche Ergebnisse hervorbrachten. Dabei wurden die Proteobakterien als häufigstes Phylum der Bakterien ermittelt. Des Weiteren bestanden Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung der beiden Phasen. Archaea spielten insgesamt nur eine untergeordnete Rolle, da ihnen verhältnismäßig nur wenige *reads* zugeordnet werden konnten.

3.1.6.2 Mikrobielle Schlüsselorganismen

Die taxonomische Analyse zeigte, dass Proteobakterien und hier vorrangig die Rhizobien als häufigste Organismengruppe auftreten. Abundante Organismen müssen jedoch nicht zwangsläufig auch für die Schlüsselfunktionen eines Ökosystems verantwortlich sein. So sollte die funktionale Annotation der Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung der festen und flüssigen Phase der Denitrifikationsanlage aufzeigen, welche Organismengruppen maßgeblich am Denitrifikationsprozess und am Abbau der Holzhackschnitzel (genauer

gesagt von Cellulose und Hemicellulose) beteiligt sind und als sogenannte Schlüsselorganismen für die Anlagenfunktionalität fungieren.

Nitratabbau

Insgesamt fiel die Expression der Gene, die an der Nitratrefernung beteiligt waren in der planktonischen Phase (TPM 769) deutlich höher aus als im Biofilm der Holzhackschnitzel (TPM 14,8) (Abb. 45). Davon entfielen insgesamt 750 TPM auf Denitrifikationsgene. Das mit 238 TPM am höchsten exprimierte Gen war *nosZ*, welches für jenes Enzym kodiert, das den letzten Schritt der Denitrifikation von N_2O zu N_2 katalysiert. Zudem zeigte das Markergen *nirS* mit 176 TPM insgesamt eine deutlich höhere Expression als das funktional und physiologisch äquivalente *nirK* Gen (TPM 35,2). Enzyme, die an der DNRA beteiligt sind, wie *NapAB*, *NrfAH* oder *NirBD*, waren mit insgesamt 44,9 TPM deutlich geringer exprimiert als Enzyme, welche im Denitrifikationsprozess involviert sind.

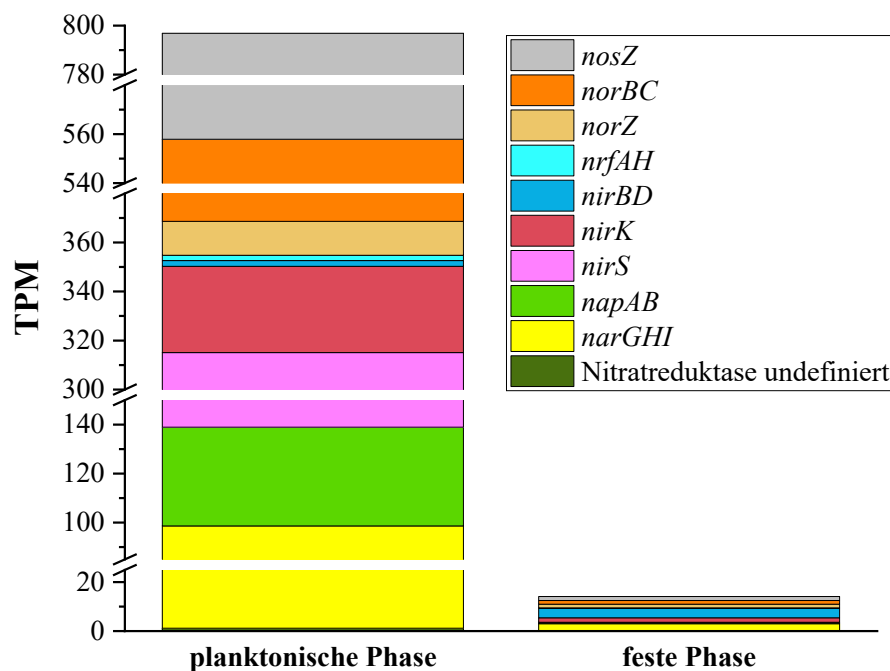


Abbildung 45: Gesamtanzahl der TPM für Gene, welche am Nitratrefernungsprozess (Denitrifikation und DNRA) beteiligt sind für die planktonische sowie für die feste Phase der Denitrifikationsanlage.

Neben der Frage in welcher Phase der Denitrifikationsprozess vorrangig stattfindet, war ein weiteres Ziel dieser Arbeit, herauszufinden, welche Organismen wesentlich den Nitratabbau vorantreiben und daher als Schlüsselorganismen für solche Anlage angesehen werden können. Wie bereits erwähnt machte den Großteil der mikrobiellen Zusammensetzung das Phylum der Proteobakterien aus. Weiterhin zeigte die funktionelle Annotation, dass

Organismen dieses Phylums auch wesentlich zur Nitratentfernung beitragen. Denn wird die Expression aller Gene, die für wichtige Denitrifikationsenzyme kodieren, zusammengezählt, dann erreichen die Proteobakterien insgesamt einen TPM in der planktonischen Phase von 648,4, wodurch sie zu den Hauptakteuren des Denitrifikationsprozesses gehören (Abb. 46). Eine tiefere phylogenetische Betrachtung innerhalb dieses Phylums auf Ordnungsebene ergab zudem, dass die Schlüsselorganismen der Denitrifikation zum überwiegenden Teil mit einem gesamten TPM von 235,9 aus der Ordnung Burkholderiales stammten und hier insbesondere aus der Gattung *Acidovorax*, *Undibacterium* und *Noviherbaspirillum* für das *nirS* Gen und *Acidovorax* und *Janthinobacterium* für das *nosZ* Gen. An zweite Stelle trat die Ordnung Rhodospirillales (TPM 133) mit Vertretern, die fast ausschließlich innerhalb der Gattung *Magnetospirillum* das *nirS* und *nosZ* Gen exprimierten. An nächster Stelle folgte *Candidatus Accumulibacter* mit TPM 106,1. Die Ordnung Rhodocyclales, mit nicht näher bestimmten Vertretern aus der Klasse Rhodocyclaceae, zeigte für das *nirS*-Gen und *nosZ*-Gen eine etwas geringere Genexpression als die Ordnungen zuvor. Dasselbe galt auch für die Ordnung Nitrosomonadales, mit der Gattung *Sideroxydans*, für das *nirS*-Gen und für die Gattung *Sulfuritalea* für das *nosZ*-Gen. Zwar fiel die Genexpression geringer aus als bei den zuvor genannten Ordnungen, kann mit insgesamt 74,8 beziehungsweise 69,7 TPM trotzdem durchaus noch als gute Expressionsstärke aller Denitrifikationsgene bezeichnet werden (Abb. 46). Insgesamt war das *nirK*-Gen geringer exprimiert und zeigte auch bezüglich der Phylogenie Unterschiede zum *nirS*-Gen. Die höchste Expression wurde hier bei den nicht näher klassifizierten Bdellovibrionales (TPM: 13,9), gefolgt von der Gattung *Flavobacterium* (TPM: 4,4) gefunden.

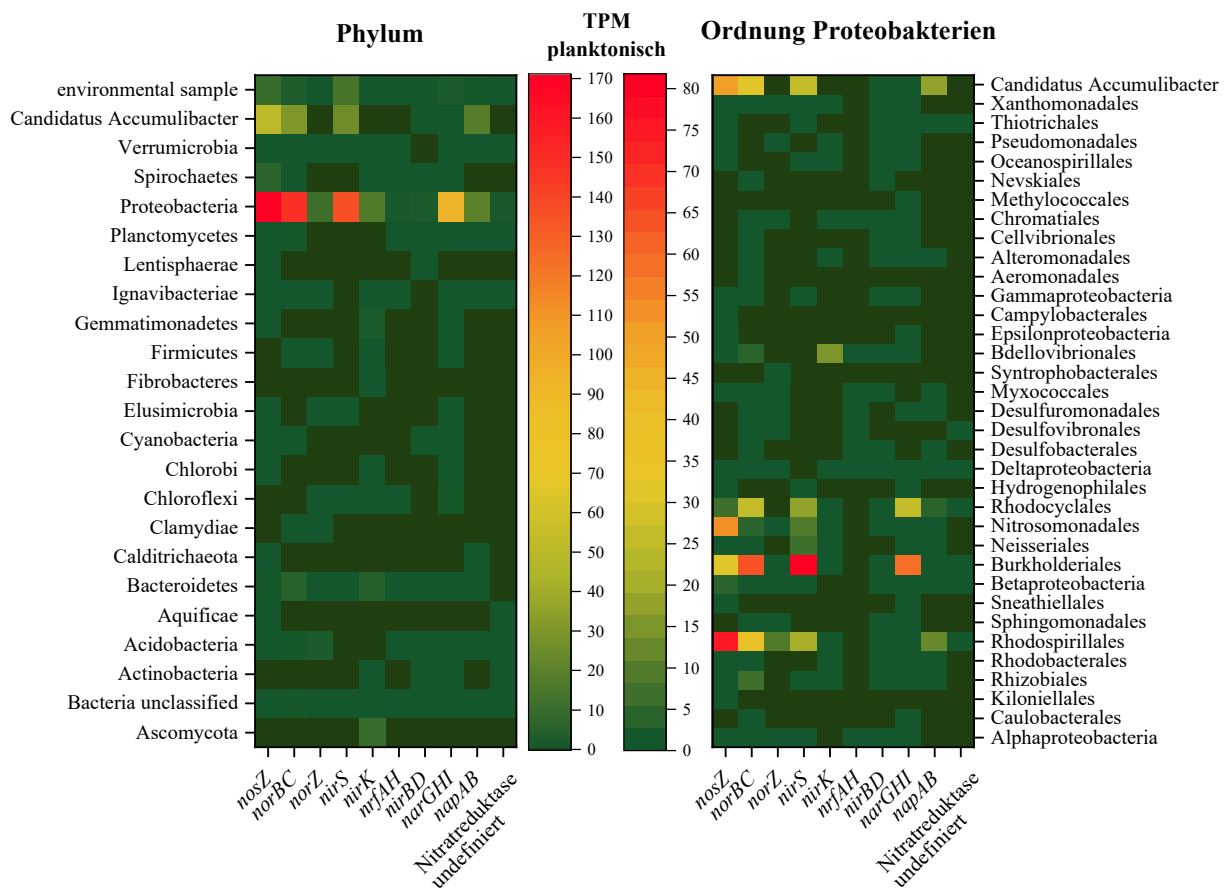


Abbildung 46: Gesamtanzahl der TPM der planktonischen Phase für Gene, die am Nitratentfernungsprozess (Denitrifikation und DNRA) beteiligt sind, auf Phylum- und Ordnungsebene innerhalb der Proteobakterien.

Wie bereits erwähnt, war die Gesamtexpression aller an der Denitrifikation beteiligten Gene in der festen Phase deutlich geringer als in der planktonischen Phase. Werden jedoch auch hier die Denitrifikationsgene phylogenetisch eingehender betrachtet, dann zeigte sich, dass auch in der festen Phase der Hauptanteil durch Vertreter der Proteobakterien exprimiert wurde (TPM: 5,8), allerdings mit einer anderen Verteilung der Ordnungen (Abb. 47). So wiesen Vertreter der Ordnung Rhizobiales die höchsten TPM-Werte mit 1,8 auf. Überwiegte in der planktonischen Phase noch die Expression des *nirS* Gens, ist das *nirK* Gen in der festen Phase verhältnismäßig stärker exprimiert. Zudem erlangte das Gen *nirBD*, das dafür bekannt ist, die Nitritreduktase im DNRA-Prozess zu kodieren (Reyes *et al.*, 2017), die insgesamt höchste Expressionsstärke (TPM 3,3) innerhalb der Proteobakterien. Es lag damit sogar insgesamt etwas höher als das *nirBD* Gen der planktonischen Phase (TPM 2,4).

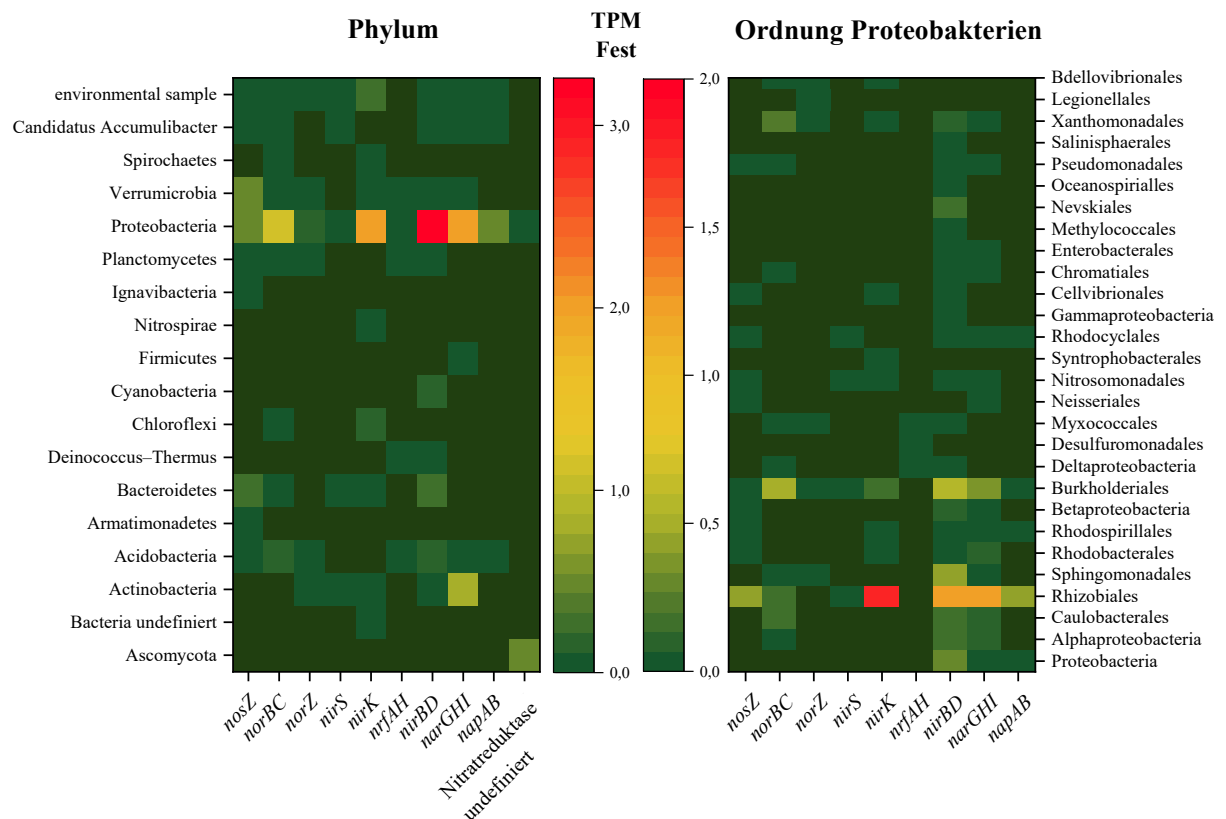


Abbildung 47: Gesamtanzahl der TPM der festen Phase für Gene, die am Nitratentfernungsprozess (Denitrifikation und DNRA) beteiligt sind, auf Phylum- und Ordnungsebene innerhalb der Proteobakterien.

Celluloseabbau

Ein weiterer interessanter Aspekt ist, ob jene Organismen, die eine Schlüsselfunktion im Denitrifikationsprozess innehaben, auch eine wichtige Aufgabe beim Abbau der Holzhackschnitzel übernehmen, sprich bei der Zersetzung von Hemicellulose und Cellulose. In diesem Zusammenhang wurde die funktionale Annotation von Enzymen, welche am (Hemi-)Celluloseabbau eine Rolle spielen, genauer betrachtet. Am Abbau von cellulosehaltigen Materialien, wie Holzprodukten, ist eine Vielzahl von Enzymen mit verschiedenen Wirkungsmechanismen beteiligt. Zur besseren Veranschaulichung der Ergebnisse, wurden in dieser Arbeit alle am Holzabbau beteiligten Enzyme in solche mit cellulolytischer und hemicellulolytischer Aktivität unterteilt. Enzyme mit cellulolytischer Aktivität lassen sich vorrangig in den folgenden GH-Familien finden: GH1, GH3, GH4, GH5, GH6, GH8, GH9, GH12, GH38, GH44, GH45, GH48, GH51, GH74. Enzyme mit hemicellulolytischer Aktivität sind hauptsächlich in den GH-Familien GH2, GH10, GH11, GH16, GH26, GH28, GH30, GH31, GH39, GH42, GH43, GH53, GH76, GH115 vertreten (Álvarez *et al.*, 2016; Berlemont & Martiny, 2013; López-Mondéjar *et al.*, 2016). Eine genaue Aufschlüsselung der Enzyme und deren TPM Werte ist im Anhang aufgelistet.

Insgesamt fiel die Genexpression für Enzyme mit cellulolytischer und hemicellulolytischer Aktivität deutlich geringer aus als für jene, die am Nitratabbau beteiligt sind. Allerdings wurde diesmal eine höhere Expressionsstärke in der festen Phase festgestellt, verglichen mit der planktonischen Probe (TPM: 65,3 fest, 16,5 planktonisch) (Abb. 48). Darüber hinaus war das Verhältnis von cellulolytischen zu hemicellulolytischen Enzymen, insbesondere in der festen Phase, verhältnismäßig ausgeglichen.

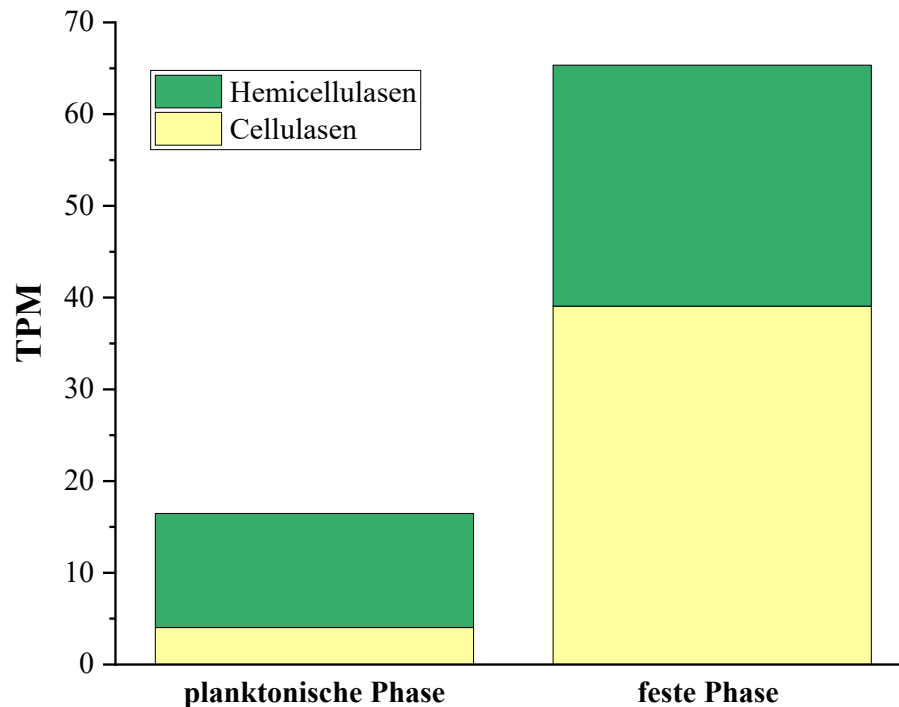


Abbildung 48: Gesamtanzahl der TPM für Gene, welche am Hemicellulose- und Celluloseabbau beteiligt sind, für die planktonische und für die feste Phase.

Pilze spielten bei der Expression von Denitrifikationsgenen - im Vergleich zu Bakterien - in der planktonischen Phase keine ausschlaggebende Rolle (ausschließlich das *nirK* Gen mit TPM 10,4 wurde von Pilzen exprimiert). Dies verhielt sich hingegen beim Abbau des Holzmaterials anders, da - insbesondere im Biofilm auf den Holzhackschnitzeln - Bakterien und Pilze zu annähernd gleichen Anteilen am Holzabbau beteiligt waren (Tab. 20).

Tabelle 20: Expressionsstärke von Genen (in TPM) von Bakterien und Pilzen, in der festen und planktonischen Phase, die für cellulolytische and hemicellulolytischer Enzyme kodieren.

Enzymaktivität	TPM Bacteria	TPM Fungi
Cellulolytisch	18,4	20
Hemicellulolytisch	13,5	11,6

Um eine genauere Aussage treffen zu können, welche Organismen explizit am Abbau der Holzhackschnitzel beteiligt sind, wurde auch hier die funktionale Annotation der (hemi-)celluloseabbauenden Enzyme phylogenetisch zugeordnet. Die Betrachtung auf Phylum-Ebene in der festen Phase ergab, dass bei den Pilzen vorrangig die Phyla Ascomycota und Basidiomycota und bei den Bakterien wieder Vertreter der Proteobakterien beteiligt waren (Abb. 49). Allerdings konnte für diese Gene auch eine erhöhte Expression innerhalb anderer bakterieller Phyla ermittelt werden, wie zum Beispiel bei den Verrumicrobia, Bacteroidetes und Actinobacteria. Dies zeigt, dass am (Hemi-)Celluloseabbau in der festen Phase eine größere Vielfalt verschiedener Organismen unterschiedlicher Phyla beteiligt waren, verglichen mit der Expression der Denitrifikationsgene. Abbildung 49 zeigt die Expressionsstärke auf Phylum-Ebene sowie alle Ordnungen innerhalb der Domäne Bacteria, die einen höheren TPM als 0,1 aufwiesen. Auf der Ordnungs-Ebene zeigten diesmal folgende Gruppen die höchste Genexpression für Enzyme mit cellulolytischer Aktivität: Rhizobiales, Caulobacterales, Myxococcales und Sphingomonadales innerhalb der Proteobakterien, Chthoniobacteriales innerhalb der Verrumicrobia und Sphingobacteriales und Chitinophagales innerhalb der Bacteroidetes. Die höchste Expression von Genen, welche für Enzyme mit einer hemicellulolytischen Aktivität kodieren, zeigten innerhalb der Bakterien die Chthoniobacteriales, Planctomycetes und Chitinophagales.

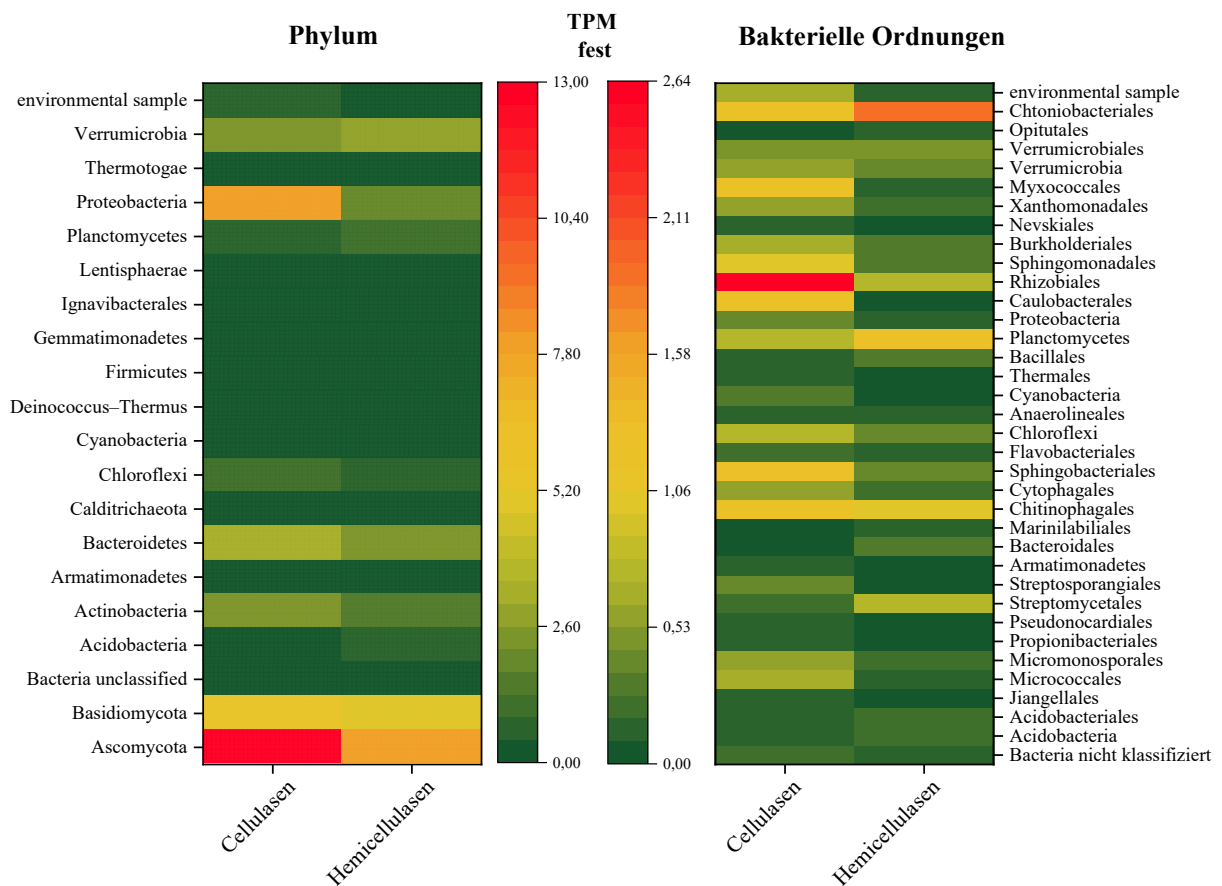


Abbildung 49: Expressionsstärke der Gene (in TPM), die für Enzyme mit cellulolytischer oder hemicellulolytischer Aktivität kodieren, in der festen Phase auf Phylum-Ebene (links) und aufgeschlüsselt innerhalb der Bacteria (rechts). Aufgrund der besseren Übersichtlichkeit sind hier nur Ordnungen aufgelistet, die einen höheren TPM als 0,1 aufzeigten.

Bei den Pilzen wiesen die höchste Genexpression cellulolytischer Enzyme innerhalb der Ascomycota die Klasse Sordariomycetes und Leotiomyces auf und innerhalb der Basidiomycota Vertreter der Agaricomycetes, welche auch die einzig auftretende Klasse innerhalb dieser Abteilung ausmachte. Für Enzyme mit hemicellulolytischer Funktion verhielt es sich ähnlich, da auch hier die höchsten TPM bei Vertretern innerhalb der oben genannten Klassen gefunden werden konnte.

Wie bereits erwähnt, war die Genexpression von (hemi-)celluloseabbauenden Enzymen in der planktonischen Phase deutlich geringer. Lediglich ein hemicellulolytisches Enzym, die Arabinofuranosidase (TPM: 9,6), erreichte eine erhöhte Genexpression durch Vertreter eines Phylums, der Cyanobakterien und hier ausschließlich in der Ordnung Synechococcales. Aufgrund der geringen Genexpression (hemi-)cellulolytischer Enzyme in der planktonischen Phase durch andere Ordnungen, wird in Abbildung 50 nur die Verteilung auf Phylum-Ebene gezeigt und auf eine Auflistung der Ordnungen verzichtet.

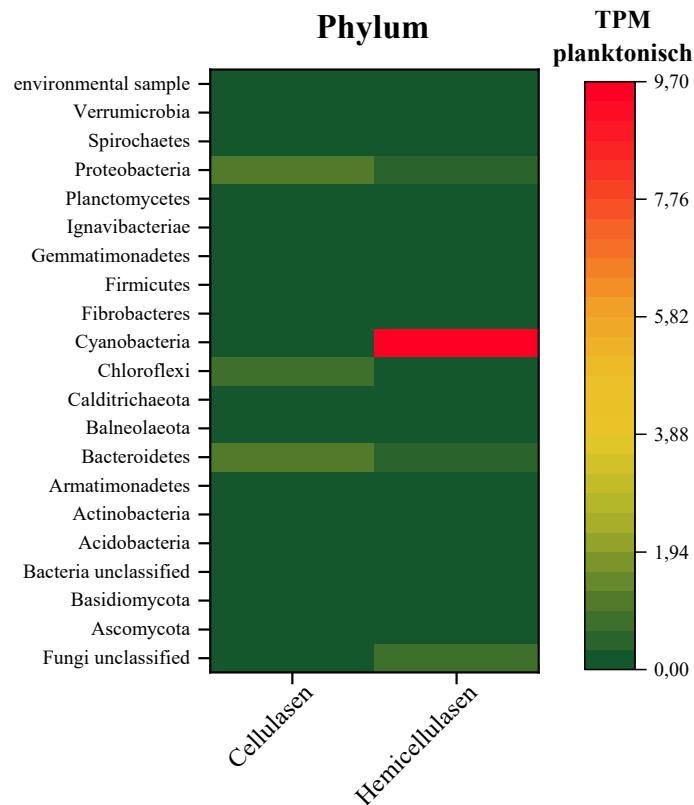


Abbildung 50: Expressionsstärke der Gene (in TPM), die für Enzyme mit cellulolytischer oder hemicellulolytischer Aktivität kodieren, auf Phylum-Ebene in der planktonischen Phase. Aufgrund der geringen Expression von (hemi-)cellulolytischen Genen wird auf die Darstellung auf Ordnungsebene verzichtet.

Mit Hilfe der funktionalen Annotation konnten die Schlüsselorganismen im Denitrifikationsprozess sowie jene, die am Holzabbau beteiligt sind, auffindig gemacht werden. Da die Mehrheit der Organismen, die eine entscheidende Rolle im Denitrifikationsprozess spielt, nicht mit jenen übereinstimmt, die am Celluloseabbau beteiligt sind, stellte sich die Frage, welche C-Quelle die Organismen für die Denitrifikation verwenden. Denitrifizierende Mikroorganismen können eine Reihe verschiedener organischer Substrate wie organische Säuren, Zucker oder auch Alkohole nutzen. Darüber hinaus können auch anorganische Elektronendonatoren, wie reduzierte Schwefelverbindungen oder Wasserstoff zum Einsatz kommen (lithotrophe Denitrifikation). Eine Frage wäre daher, ob die Denitrifizierer direkt nach dem Abbau der Cellulose einsteigen. In diesem Fall nutzen sie entweder direkt Glucose als Elektronendonator oder verstoffwechseln die Endprodukte anderer (fermentierender) Organismen wie zum Beispiel Acetat, Lactat oder Propionat. Um dies herauszufinden, wurde die Genexpression mehrerer wichtiger Enzyme verschiedener Stoffwechselwege wie der Glykolyse, des Acetat-, Lactat-, Propionat-, Butyrat- und Alkoholabbaus für die vier wichtigsten Ordnungen des Denitrifikationsprozesses der planktonischen Phase (Burkholderiales, Rhodospirillales, *Ca.*

Accumulibacter, Rhodocyclales, Nitrosomonadales) untersucht. Außerdem wurde im Rahmen der lithotropen Denitrifikation nach Hydrogenasen gesucht, welche H₂ aufnehmen können sowie nach Enzymen, die die Oxidation reduzierter Schwefelverbindungen katalysieren. Tabelle 21 stellt eine Übersicht der wichtigsten Enzyme dieser Stoffwechselwege und deren Genexpression (in TPM) der jeweiligen Ordnungen dar.

Tabelle 21: Übersicht wichtiger Enzyme mit EC-Nummer aus verschiedenen Stoffwechselwegen und die dazugehörigen, summierten TPM-Werte aus den Ordnungen Burkholderiales, Rhodospirillales, Candidatus Accumulibacter, Rhodocyclales und Nitrosomonadales. GCK = Glucokinase, GPI = Glucose-6-phosphat-Isomerase, PFK = Phosphofruktokinase, Pk = Pyruvatkinase; LDH = Lactatdehydrogenase; ACS = Acetyl-CoA-Synthetase, PTA = Phosphatacetyltransferase; ADH = Alkoholdehydrogenase; Buk = Butyratkinase; PDH = Pyruvatdehydrogenase; CS = Citrat-Synthase, SDH = Succinat-Dehydrogenase; n.v. = nicht vorhanden.

Stoffwechselweg	Enzym	EC-Nummer	TPM Burkholderiales	TPM Rhodospirillales	TPM Ca. Accumulibacter	TPM Rhodocyclales	TPM Nitrosomonadales
Glykolyse	GCK	2.7.1.2/ 2.7.1.1	0,036	0,545	n.v.	0,013	0,026
	GPI	5.3.1.9	0,659	0,441	0,444	0,217	0,118
	PFK	2.7.1.11/ 2.7.1.146	1,195	1,231	0	0,019	0,159
	Enolase	4.2.1.11	4,525	3,707	2,756	3,022	0,207
	Pk	2.7.1.40	1,726	0,656	0,659	0,574	0,018
Lactatabbau	LDH	1.1.1.27/ 1.1.1.28/ 1.1.2.4	0,248	0,744	0,055	0,002	0,048
Acetatabbau	ACS	6.2.1.1	30,999	11,174	15,818	2,681	0,673
	Acetat-Kinase	2.7.2.1	2,289	0,746	0,299	1,009	0,015
	PTA	2.3.1.8	2,043	0,3157	0,043	0,441	0,041
Alkoholabbau	ADH	1.1.1.1/ 1.1.1.2/ 1.1.5.5/ 1.1.2.7/ 1.1.2.8	1,673	1,035	0,190	0,916	0,205
Methanolabbau	Methanol Dehydrogenase	1.1.1.244 /1.1.3.13/ 1.1.2.7	0,007	0,02	0	n.v.	1,867
Propionatabbau	Propionat-Kinase	2.7.2.15	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
	Propionyl-CoA Synthetase	6.2.1.17	0,167	2,331	n.v.	0,442	0,025

Butyrat-abbau	Buk	2.7.2.7	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.	n.v.
Pyruvat zu Acetyl-CoA	PDH	1.2.4.1/ 2.3.1.12	7,137	4,792	3,751	1,857	0,064
Citrat-Zyklus	CS	2.3.3.1/ 2.3.3.8/ 2.3.3.3/	17,605	8,475	8,310	6,665	0,664
	SDH	1.3.5.1/ 1.3.5.4	49,022	22,713	28,882	15,870	0,423
Wasserstoff-oxidation	<i>Uptake</i> hydro- genase	1.12.99.6	0,098	0,717	n.v.	1,1	0,007
Schwefel-oxidation	Thiosulfat-sulfur-transferase	2.8.1.1	0,098	n.v.	0	0	1,017
	Sox		0,961	1,457	2,321	1,923	0,494

Wie Tabelle 21 zeigt, exprimieren Vertreter der Burkholderiales, Rhodspirillales und *Candidatus* Accumilibacter vorrangig das Gen, welches für die Acetyl-CoA Synthetase (ACS) kodiert. Dies bedeutet, dass Vertreter dieser Ordnungen Acetat abbauen (oder auch bilden) können und dieses möglicherweise als Elektronendonator für die Denitrifikation verwenden. Bei Vertretern der Ordnung Rhodocyclales und insbesondere Nitrosomonadales, war die Genexpression aller hier betrachteten Enzyme eher gering und daher konnte keine zuverlässige Aussage getroffen werden, welche Substanz verwendet wird. Die Ordnung Rhodocyclales weist im Gegensatz zu den Nitrosomonadales allerdings eine höhere Genexpression von Enzymen auf, die im Citrat-Zyklus involviert sind. Dies bedeutet, dass Organismen dieser Ordnung organische Substrate verwenden, was bei Vertretern der Nitrosomonadales jedoch nicht den Anschein macht, da hier nur eine sehr geringe Genexpression dieser Enzyme gefunden werden konnte.

Zudem wurde für jede Probe (planktonisch und fest) noch die Genexpression von Laccasen untersucht, welches eine Oxidoreduktase darstellt, die Sauerstoff zu Wasser reduziert und häufig in holzzeretzenden Mikroorganismen auftritt (Ottow, 2011). Über die Expression dieses Enzyms kann ausgesagt werden, ob Sauerstoff in der Anlage vorhanden ist oder ob es sich um ein weitestgehend anoxisches System handelt. Die Genexpression der Laccasen fiel mit 0,38 TPM in der planktonischen Phase und 2,26 TPM in der festen Phase gering aus, was eine geringe Sauerstoffverfügbarkeit in dem System belegt.

3.2 Ergebnisse der Laboruntersuchungen

In vorangegangenen Untersuchungen im Labormaßstab konnten in Bezug auf die unterschiedlichen Kohlenstoffquellen unerwartete Beobachtungen gemacht werden. Zwei davon sollten im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden. Zum einen sollte analysiert werden, ob das Ereignis einer ansteigenden Ammoniumkonzentration in den Holzhackschnitzel-Reaktoren nach Zugabe hoher Nitratkonzentrationen reproduzierbar ist und ob es sich hierbei um eine DNRA handelt. Zum anderen sollte eine Erklärung für die Inhibierung der Archaea, insbesondere der methanogenen Organismen in den Holzpellet-Reaktoren gefunden werden. Die Ergebnisse dieser beiden Themenfelder werden im Folgenden erläutert.

3.2.1 DNRA in den Holzhackschnitzel-Reaktoren

Um der Aufklärung der Beobachtung einer ansteigenden Ammoniumkonzentration bei niedrigem C_{org}/NO_3^- Verhältnis näher zu kommen, wurde das Experiment in Holzhackschnitzel-Reaktoren - welches in Kapitel 1.7 beschrieben ist - wiederholt, um die Reproduzierbarkeit dieser Unregelmäßigkeit zu bestätigen.

Ammoniumproduktion

Abbildung 51 zeigt die Nitrat- und Ammoniumproduktion in den Labor-Holzhackschnitzel-Reaktoren sowie die Tage, an denen die Reaktoren geöffnet wurden, um Substratproben für die Sequenzierungen zu entnehmen. Insgesamt wurde zweimal die 20-fache Nitratkonzentration zugegeben. Das erste Mal um zu testen, ob die Ammoniumproduktion nach Zugabe hoher Nitratkonzentrationen einsetzt und das zweite Mal, um bei Substratentnahme für die Diversitäts- und Metatranskriptom-Analyse die Nitratkonzentration weiterhin hoch zu halten. Es wurde gezeigt, dass der Versuch reproduziert werden konnte, da eine Ammoniumproduktion nach hohen Nitratzugaben eintrat und dies somit kein einmaliges Phänomen darstellte (Abb. 51). Bei diesem Versuch stieg die Ammoniumkonzentration zudem schon nach der fünffachen Nitratzugabe, während dieser Effekt beim vorangegangenen Versuch (Kapitel 1.7, Abb. 5c) erst nach Zugabe der zehnfachen Nitratmenge einsetzte. Zudem lag die maximale Ammoniumkonzentration diesmal bei 3,6 mmol/l, was mehr als doppelt so hoch war als zuvor, wo sie nur Maximalwerte von 1,5 mmol/l erreichte. Die Nitratreduktion verhielt sich ähnlich, verglichen

zum ersten Versuch, da sie auch diesmal nach Zugabe höherer Nitratkonzentrationen konstant blieb.

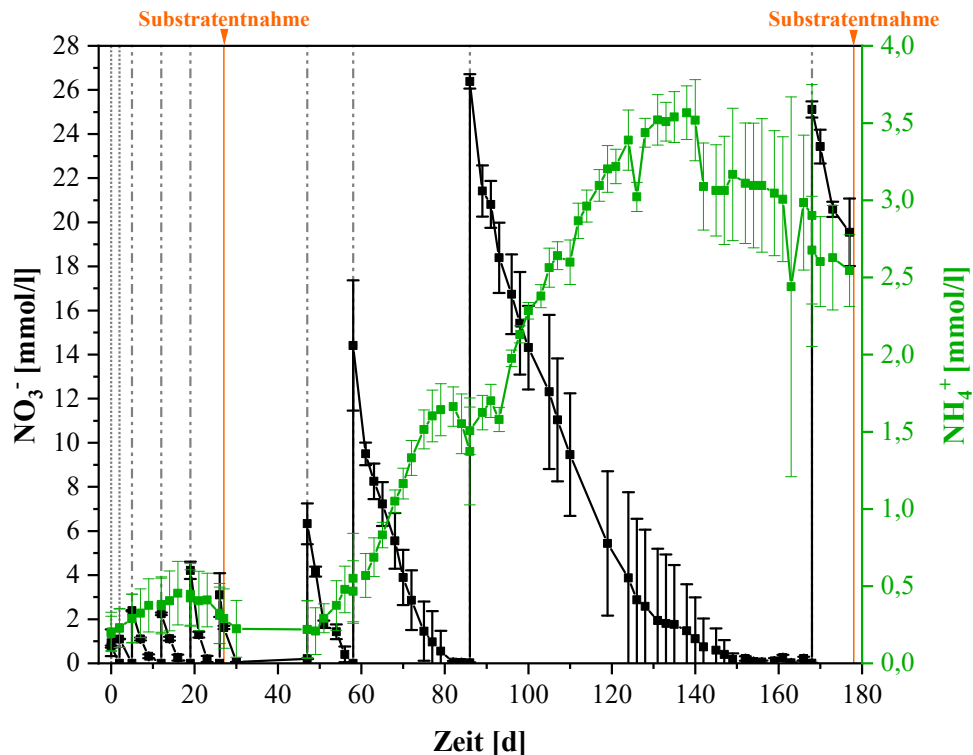


Abbildung 51: Nitrat- und Ammoniumkonzentration in den Labor-Holzhackschnitzel-Reaktoren. Gestrichelte Linien symbolisieren die verschiedenen Nitratzugabemengen: Einfache Nitratzugabe an Tag 0 und 2. Zweifache Nitratzugabe an Tag 5, 12, 19 und 26. Fünffache Nitratkonzentration an Tag 47, zehnfache an Tag 58 und 20-fache Nitratzugabe an Tag 86 und 168. Orangene Linien zeigen die Tage, an denen die Töpfe geöffnet wurden, um Substratproben für die Diversitäts- und Metatranskriptom-Analyse zu entnehmen.

Mikrobielle Diversität

Die 16S-rRNA-Gen-Amplikon Sequenzierung, vor und nach Zugabe hoher Nitratmengen, sollte aufklären, ob die mikrobielle Zusammensetzung durch die unterschiedliche Nitratbelastung beeinflusst wurde und ob signifikante Unterschiede in der Diversität zu finden waren. Abbildung 52 zeigt die mikrobielle Diversität auf Phylum sowie auf Ordnungsebene zu Zeitpunkt A und B der Nitratbelastung sowie vom Inokulum, welches Drainagenwasser aus dem Versuchsgebiet „Mürmes“ darstellte. Ähnlich wie bei der Freilandanalyse stellten auch bei der Laboruntersuchung die Proteobakterien bei allen Proben den Großteil der Vertreter. Allerdings variierte die bakterielle Zusammensetzung in den Labor-Holzhackschnitzel-Reaktoren zwischen niedrigen (Zeitpunkt A) und hohen (Zeitpunkt B) Nitratwerten sowie zwischen der festen und planktonischen Phase. Zudem unterschied sich das Inokulum bezüglich einiger Vertreter im Vergleich zu den Reaktoren, jedoch blieben

auch einige bakterielle Ordnungen aus dem Inokulum in den Laborreaktoren erhalten. So wurden in jeder Probe Vertreter der Ordnung Rhodocyclales gefunden. Auch die Ordnungen Planctomycetales und Rhizobiales wurden bis auf Zeitpunkt A in der planktonischen Phase überall detektiert. Vertreter der Burkholderiales konnten hingegen nur im Inokulum und zum Zeitpunkt B in der planktonischen Phase beobachtet werden. Deutliche Unterschiede zwischen Zeitpunkt A und B gab es, insbesondere bei dem Phylum Verrucomicrobia, dessen Vertreter nur im Inokulum und bei niedrigen Nitratwerten anzutreffen waren. Ähnlich verhielt es sich bei den Clostridiales, die Vertreter der Firmicutes darstellen. Zum Zeitpunkt B waren diese Organismen nicht mehr zu finden, dafür jedoch andere fermentierende Bakterien, aus der Ordnung der Anaerolineales. Weiterhin konnten auch Mitglieder der Ordnung Ignavibacteriales zum ersten Mal nach Zugabe hoher NO_3^- -Konzentrationen festgestellt werden. Diese fehlten zuvor bei niedrigen Nitratkonzentrationen komplett. Organismen, die zu den Ordnungen Spirochaetales, Bacteroidales, Sphingobacteriales und Anaerolineales sowie Fibrobacteriales gehören, wurden nur in den Laborreaktoren und nicht im Inokulum nachgewiesen, unabhängig davon, ob die Nitratkonzentration hoch oder niedrig ausfiel. Dahingegen wurden Ordnungen, wie die Propionibacteriales, Nitrospirales, Flavobacteriales, nur im Inokulum detektiert und somit in den Laborreaktoren ausselektiert (Grießmeier *et al.*, 2017).

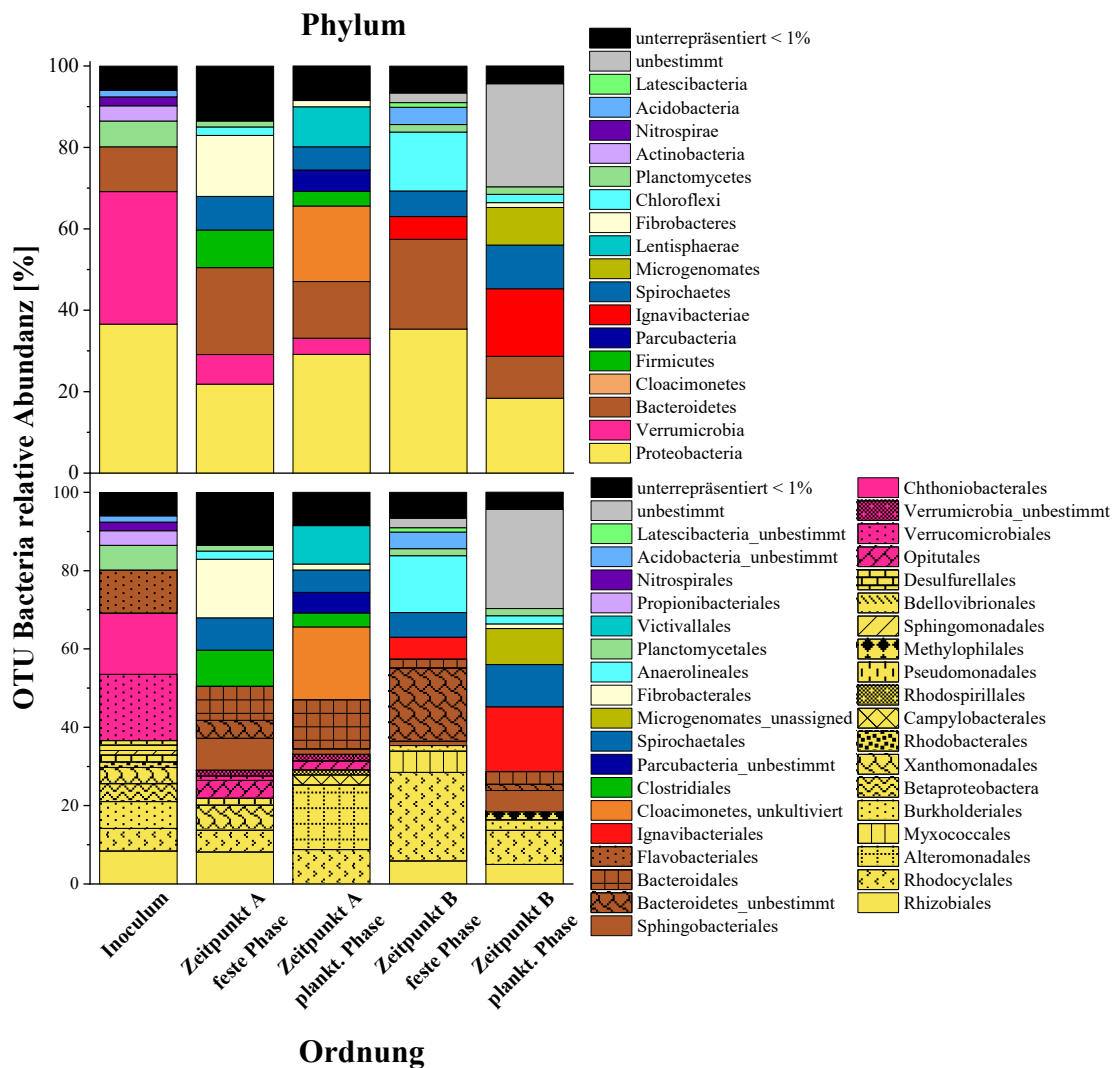


Abbildung 52: Mikrobielle Diversität (OTU Bakterien) auf Phylum-Ebene (oben) und Ordnungs-Ebene (unten) für die feste und planktonische Phase zu Zeitpunkt A und B der Laborreaktoren mit Holzhackschnitzeln sowie des Inokulums (nach Griebmeier *et al.*, 2017).

Ähnlich wie bei der Freilanduntersuchung konnten auch bei der Laboranalyse wieder deutlich weniger *reads* den Archaea zugeordnet werden als den Bakterien. Dies ist auch der Grund warum in Abb. 53 keine Archaea für das Inokulum dargestellt sind, da aus dieser Probe nur eine sehr geringe Anzahl an *reads* der Domäne der Archaea zugeordnet wurde. Allerdings ist auch hier, wie bei der bakteriellen Diversität, ein Unterschied zwischen Zeitpunkt A und B in der Zusammensetzung der Archaea zu beobachten. Die Vertreter der Bathyarchaeota sowie Methanobacteriales und Methanomicrobiales (außer Zeitpunkt B; planktonisch) traten in jeder Probe auf. Anders verhielt sich jedoch mit den Methanosarcinales und Thermoplasmatales, die nur bei niedrigen Nitratkonzentrationen auftraten sowie die Woesearchaeota und Diapherotrites, die erst nach Zugabe hoher Nitratkonzentrationen detektiert werden konnten (Griebmeier *et al.*, 2017).

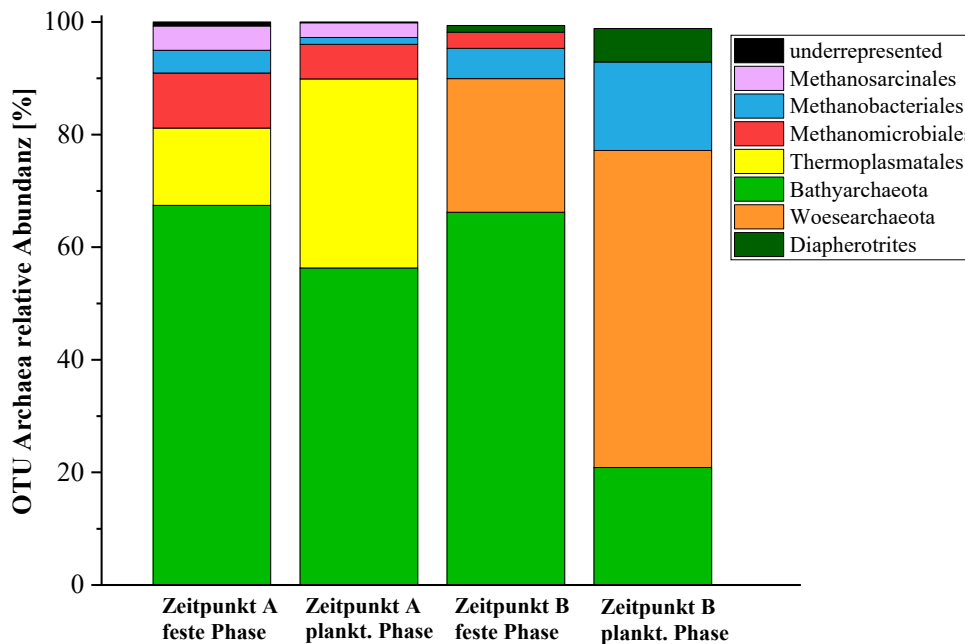


Abbildung 53: Archaea auf Ordnungs-Ebene für die feste und planktonische Phase der Laborreaktoren mit Holzhackschnitzeln zu Zeitpunkt A und B.

Metatranskriptom-Analyse

Das Metatranskriptom der Holzhackschnitzel-Reaktoren wurde analysiert, um potentielle Produzenten von Schlüsselproteinen aufzudecken, die an der Nitrateliminierung, der unerwarteten Ammoniumproduktion unter hohen Nitratbedingungen (Zeitpunkt B) sowie an der Cellulosehydrolyse beteiligt sind. Daher wurden die taxonomischen Informationen, die aus dem assemblierten Metatranskriptom gewonnen wurden, mit den Ergebnissen der 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung verglichen, um die Schlüsselorganismen für die oben genannten Prozesse zu identifizieren. Dabei wurden insgesamt 669.975.316 bp zu 2.806.808 Contigs zusammengesetzt und vom Kooperationspartner Dr. Andreas Bremges vom Helmholtz-Zentrum für Infektionsforschung weiter ausgewertet.

Abbildung 54 zeigt die Expression (in TPM) für verschiedenen Gene, die am Denitrifikations- und DNRA-Prozess beteiligt sind. Insgesamt stiegen alle Gene, die an der Nitratentfernung involviert sind, von Zeitpunkt A zu B an. Das deutet darauf hin, dass die Expression dieser Gene durch höhere Nitratkonzentrationen induziert wurde.

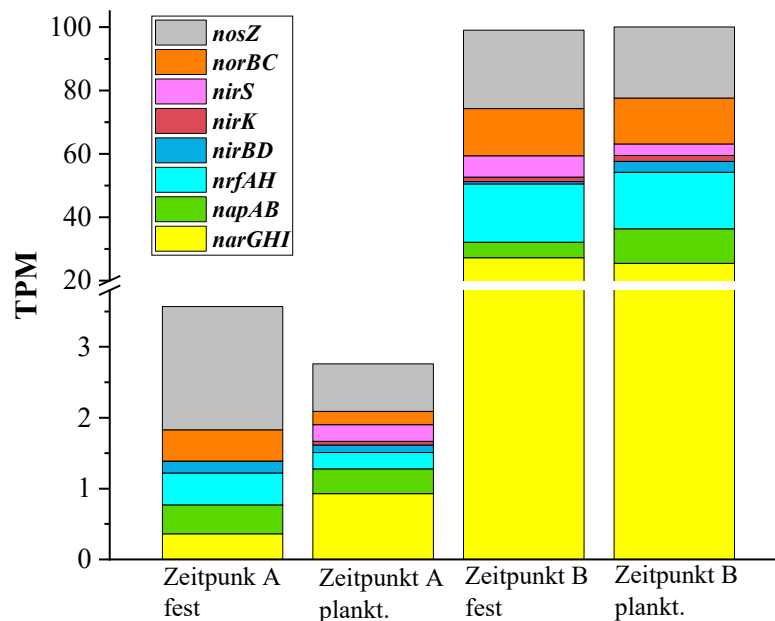


Abbildung 54: Gesamtzahl der TPM für Gene, die an der Nitratentfernung (Denitrifikation und DNRA) beteiligt sind für die planktonischen und festen Proben sowie zu Zeitpunkt A und Zeitpunkt B (nach Griebmeier *et al.*, 2017).

Um den Grad der Induktion zu quantifizieren, wurde das Verhältnis zwischen den TPM-Werten von Zeitpunkt A und B verglichen (Tabelle 22). Neben typischen Genen für Enzyme, die an der Denitrifikation beteiligt sind, ist auch die Expression des Gens *nrf* von Zeitpunkt A zu B angestiegen.

Tabelle 22: Verhältnis der TPM-Werte für Schlüsselgene der Nitratreduktion zwischen Zeitpunkt A (niedrige Nitratkonzentration) und B (hohe Nitratkonzentration). Die TPM-Werte der planktonischen sowie der Biofilmphase wurden miteinander verglichen. Zum Zeitpunkt A in der Biofilmprobe waren keine Transkripte der *nirK*-Gene nachweisbar. Daher war es nicht möglich, ein Verhältnis für die Induktion dieses Gens innerhalb des Biofilms zu berechnen (nach Griebmeier *et al.*, 2017).

	<i>narGHI</i>	<i>napAB</i>	<i>nrfAH</i>	<i>nirS</i>	<i>nirK</i>	<i>nirBD</i>	<i>norBC</i>	<i>nosZ</i>
Biofilm	75,5	12,1	40,7	1269,5	-	4,8	33,9	14,23
Planktonisch	27,4	31,2	77,5	15,7	35,2	33,2	76,3	33,4

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Organismen genau für die Denitrifikation und insbesondere die DNRA bei hohen Nitratkonzentrationen ausschlaggebend sind, erfolgte eine taxonomische Zuordnung der assemblierten Gene. Bemerkenswerterweise zeigte die Metatranskriptom-Analyse, dass Gene, die an der Denitrifikation beteiligt sind (*nar*, *nir*, *nor*, *nos*), nicht von denselben Organismen unter niedrigen (Zeitpunkt A) und hohen (Zeitpunkt B) Nitratkonzentrationen exprimiert wurden.

Bei niedrigen Nitratkonzentration konnten die meisten *reads* taxonomisch der Ordnung Pseudomonadales zugeordnet werden. Diese Ordnung wies jedoch bei hohen Nitratkonzentrationen keine mRNAs von Denitrifikationsgenen auf. Hier wurden die mRNAs, bei denen eine taxonomische Zuordnung möglich war, hauptsächlich der Ordnung Rhodocyclales und Rhizobiales zugewiesen. Allerdings konnte ein Großteil der *reads* taxonomisch nicht zugeordnet werden und daher blieb eine Aussage über deren Herkunft unbeantwortet. Die meisten Organismen, die taxonomisch verknüpft werden konnten und an der Nitratbeseitigung beteiligt waren, gehörten jedoch zum Phylum der Proteobakterien (außer Clostridiales, Ignavibacteriales und Spirochaetales). Dies deutet darauf hin, dass Mitglieder dieser Ordnung eine Schlüsselfunktion bei der Denitrifikation einnehmen.

Auch in Bezug auf den DNRA Prozess konnten interessante Beobachtungen gemacht werden, da dieser Prozess vermutlich von unterschiedlichen Organismen verschiedener Ordnungen unter niedrigen und hohen Nitratbedingungen durchgeführt wird. Waren es zum Zeitpunkt A noch vorrangig Vertreter der Campylobacterales, die das *nap* und *nrf* Gen exprimierten, konnte nach hohen Nitratkonzentrationen die Mehrheit der *reads* für das *nrf* Gen der Ordnung Ignavibacteriales zugeordnet werden (Abb. 55 C, D). Diese Beobachtung wurde auch durch die 16S-rRNA-Gen-Amplikon-Sequenzierung bestätigt, da hier diese Ordnung nur bei hohen Nitratkonzentrationen auftrat und zuvor nicht beobachtet werden konnte. Ähnliches galt für die Campylobacterales, die unter hohen Nitratkonzentrationen in der 16S-rRNA-Sequenzierung nicht mehr gefunden wurden.

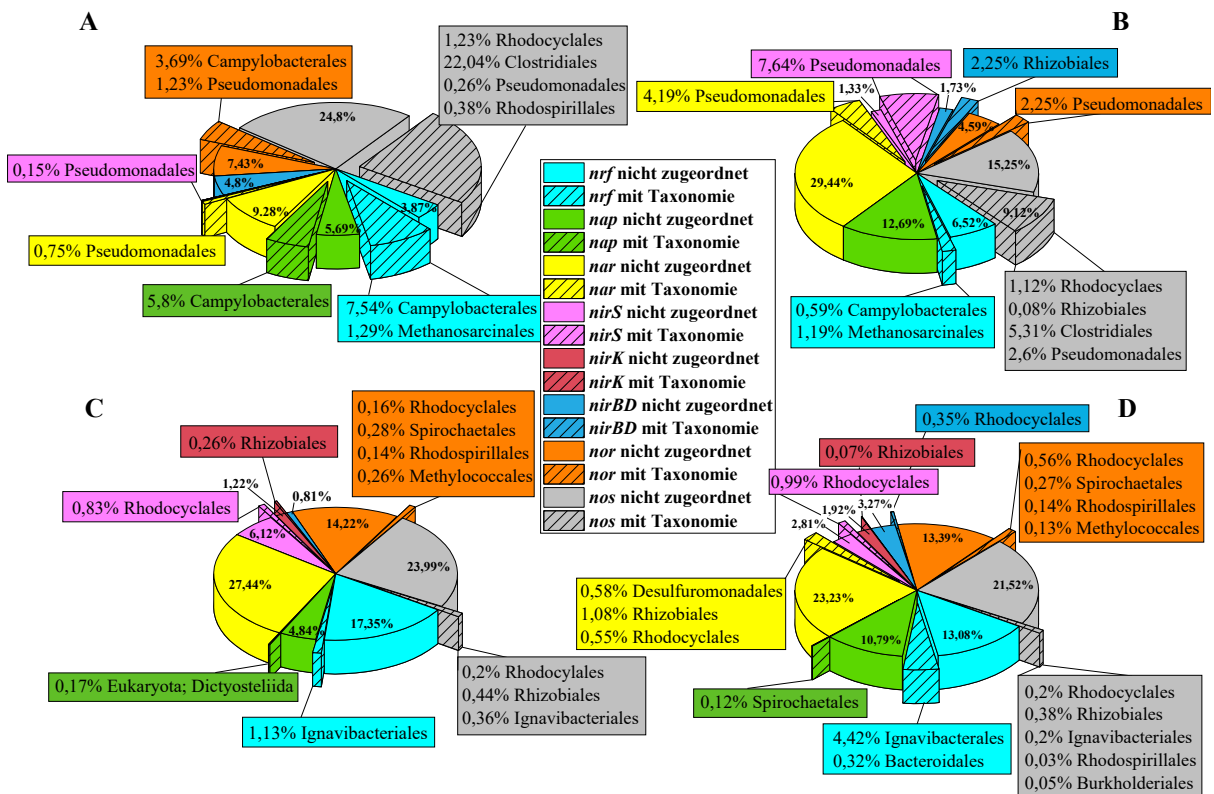


Abbildung 55: Relative Abundanz der Genexpression von typischen Genen, die an der Denitrifikation und DNRA beteiligt sind sowie ihre taxonomische Zuordnung. Eine taxonomische Identifikation der transkribierten Gene war nur für eine Teilmenge der gesamten *reads* durchführbar. Festprobe (A) und planktonische Phase (B) des Holzhackschnitzel-Reaktors bei niedrigen Nitratkonzentrationen (Zeitpunkt A) sowie Festprobe (C) und planktonische Phase (D) des Reaktors bei hohen Nitratkonzentrationen (Zeitpunkt B) (nach Griebmeier *et al.*, 2017).

Während die taxonomische Zuordnung zeigte, dass am Nitratentfernungsprozess vorrangig Organismen aus dem Phylum Proteobakterien beteiligt waren, fiel die Zuordnung der Bakterien, die im Celluloseabbauprozess involviert waren, dazu abweichend aus. Hier gehörten die Vertreter, die taxonomisch verlinkt werden konnten, zu mehreren unterschiedlichen Phyla, darunter zu den Firmicutes, Actinobakterien, Proteobakterien, Bacteroidetes und Spirochaetes. Für den Abbau von Cellulose bedarf es, wie bereits erwähnt mehrerer verschiedener Enzymarten. In dieser Analyse stiegen die TPM-Werte für Transkripte der Gene, die für Endoglukanasen kodieren, von niedrigen zu hohen Nitratkonzentrationen an und zwar von 6,8 auf 73,8 für die feste Phase und von 10,03 auf 52,66 für die planktonische Phase. *Reads*, die taxonomisch zugeordnet werden konnten, wurden hier vorrangig den Phyla Firmicutes (Ordnung Clostridiales), Proteobakterien und Actinobakterien (Ordnung Actinomycetales) zugewiesen. Eine Expression von Genen, die für Endoglukanasen kodieren, konnte für die Actinomycetales allerdings nur bei hohen Nitratkonzentrationen nachgewiesen werden (Zeitpunkt B) und hier insbesondere in der Festphase (TPM 2,36 feste Phase versus 0,44 planktonische Phase). Im Gegensatz dazu

konnten Transkripte, die mit der Ordnung Clostridiales verknüpft wurden, bei niedrigen (TPM 0,06 feste Phase, 0,5 planktonische Phase) und hohen Nitratkonzentrationen (TPM 0,43 feste Phase, 0,44 planktonische Phase) detektiert werden, auch wenn die Clostridiales in der 16S-rRNA-Gen-Analyse zum Zeitpunkt B unterrepräsentiert waren. Im Vergleich zu Endoglukanasen waren Exoglucanasen insgesamt signifikant geringer exprimiert, sowohl unter niedrigen (TPM 0,13 für feste und 0,09 für planktonische Phase) als auch unter hohen Nitratwerten (TPM 1,17 für die feste und 0,89 für die planktonische Phase). Transkripte von Genen, die für β -Glukosidasen kodieren und somit Cellobiose zu Glukose abbauen, zeigten zum Zeitpunkt B hingegen wieder eine erhöhte Expression. Die Summe der TPM-Werte war hier in der festen Phase höher und stieg deutlich von niedrigen (TPM 49,26 für die feste und 32,9 für die planktonische Phase) zu hohen Nitratkonzentrationen (TPM 1263,82 für die feste und 101,76 für die planktonische Phase) an. Diese Transkripte, bei denen eine taxonomische Identifikation möglich war, stammten hier von anderen Organismen als jene der Endoglukanasen, da sie hauptsächlich von Organismen innerhalb der Bacteroidetes gefunden wurden (TPM 0,57 für die feste und 0,3 für die planktonische Phase für Zeitpunkt A und 0,95 für die feste und 2,16 für die planktonische Phase für Zeitpunkt B).

Allgemein kann festgehalten werden, dass der Prozess des Celluloseabbaus durch eine höhere Nitratbelastung positiv beeinflusst worden zu sein scheint. Höhere TPM Werte für Gene, die für Cellulose abbauende Enzyme kodieren, bestätigen dies zu Zeitpunkt B. Zudem zeigt die Metatranskriptom-Analyse, dass der Celluloseabbau-Prozess sowie die Nitratentfernung nur teilweise von Organismen gleicher Ordnungen katalysiert wurde (Grießmeier *et al.*, 2017).

3.2.2 Inhibierung methanogener Organismen durch Holzpellets

Im Folgenden werden die Ergebnisse des Versuchs mit der Ko-Kultur der methanogenen Modellorganismen *Methanobacterium formicicum* und *Methanosarcina barkerii* vorgestellt und beschrieben, ob ihre Stoffwechselleistung durch Zugabe verschiedener C-Quellen (Holzpellets und Holzhackschnitzel) beeinflusst wurde. Abbildung 56 zeigt den H_2/CO_2 -Verbrauch sowie die CH_4 -Produktion der Triplikate mit den verschiedenen C-Substraten. Vor der Substratzugabe am 21.08.2018 verhielten sich alle Triplikate ähnlich: H_2 und CO_2 wurde verbraucht und gleichzeitig konnte eine Methankonzentration von knapp 20 Vol.-% festgestellt werden. Nach Zugabe der Substrate Holzhackschnitzel oder Holzpellets, veränderte sich dann allerdings das Gasverhalten der verschiedenen Proben. Bei der

Kontrolle sowie bei den Holzhackschnitzel-Kulturen nahm die H_2 und CO_2 -Konzentration weiterhin ab und CH_4 entstand (Fig. 57A/B). Das geschah sehr zügig innerhalb von 1-3 Tagen, so dass diese beiden Kulturen mehrfach (5x bei der Kontrolle, 4x bei den Holzhackschnitzeln) neu mit H_2/CO_2 begast werden mussten. Bei der Kontrollkultur schien die Stoffwechsellistung der methanogenen Organismen ab dem 31.08.2018 abzunehmen, da der Verbrauch an H_2 und CO_2 deutlich langsamer erfolgte. Bei dem Triplikat mit Holzhackschnitzel als Substrat lief der Verbrauch hingegen weiterhin konstant, so dass vermutet werden kann, dass sogar eine Förderung der Stoffwechsellistung der Methanogenen durch die Holzhackschnitzel eintrat. Konträr hierzu verhielt sich das Triplikat mit den Methanogenen, denen Holpellets als Substrat zugegeben wurde (Abb. 57C). Nach Substratzugabe war die H_2 -Abnahme deutlich verlangsamt und CO_2 wurde kaum verbraucht. Auch die CH_4 -Produktion fiel deutlich langsamer und geringer aus als bei der Kontroll- und Holzhackschnitzel-Kultur. Die Begasung mit H_2 und CO_2 erfolgte zudem in diesem Fall vorrangig nur, da durch die Micro GC Messungen die Gasphase nahezu aufgebraucht war und sich dadurch ein Unterdruck bildete.

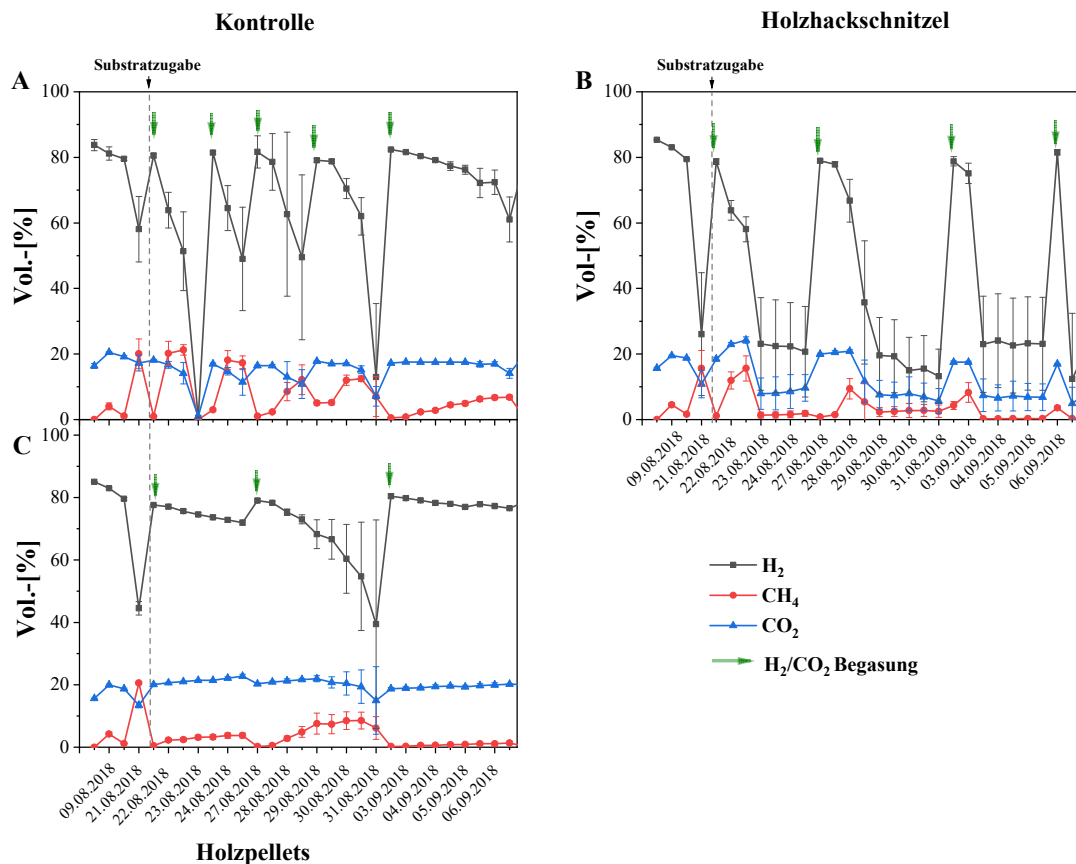


Abbildung 56: Gaszusammensetzung der Ko-Kultur mit den methanogenen Modellorganismen mit verschiedenen C-Substraten. H_2 , CO_2 und CH_4 Konzentration in der Kontrollkultur (A), bei der keine Substratzugabe erfolgte. (B) zeigt die Gaszusammensetzung der Kulturen, welchen Holzhackschnitzel zugegeben wurde und (C) die Kulturen mit Holzpellets.

Die FISH-Analyse der verschiedenen Kulturen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten zeigte zudem, dass die Kontroll-Kultur zu allen Zeitpunkten (t1, t2, t3 und t4) kontaminationsfrei blieb und eine Anwesenheit und auch eine Aktivität der methanogenen Organismen bis zum letzten Analysezeitpunkt festgestellt werden konnte. Allgemein wurde die charakteristische Zellform von *Methanosarcina barkeri*, welche große Zellpakete bildet, häufiger beobachtet als die fadenförmigen Stäbchen von *Methanobacterium formicium* (Abb. 57).

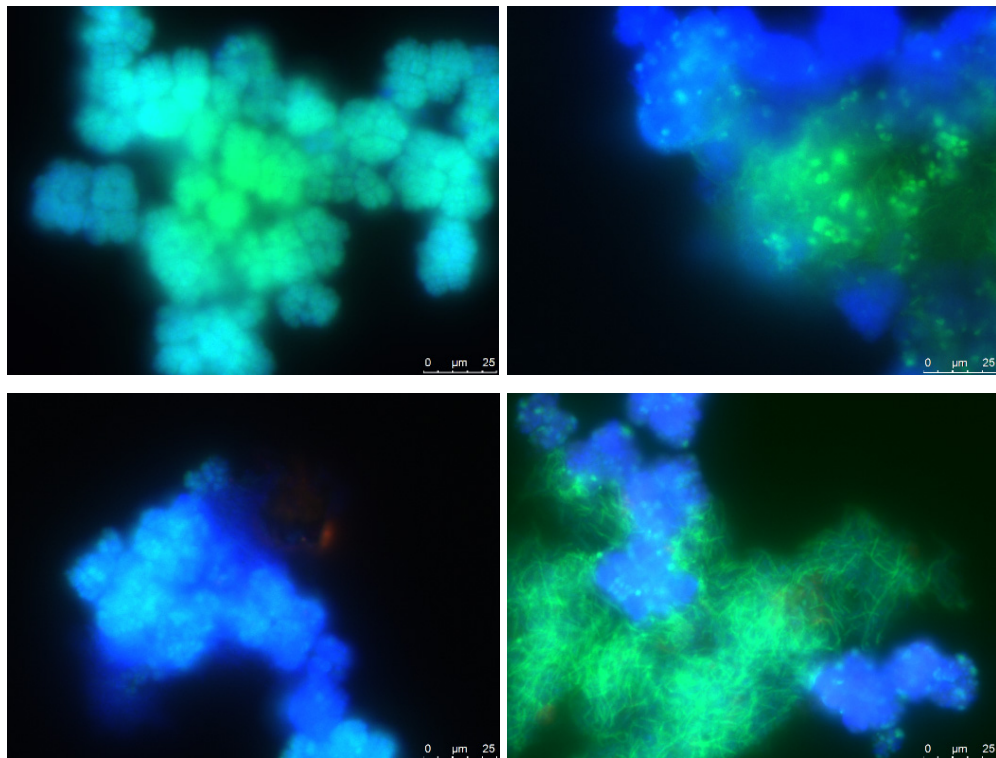


Abbildung 57: FISH-Mikroskopiebilder der methanogenen Kontroll-Kultur zu den verschiedenen Zeitpunkten t1 (links oben), t2 (rechts oben), t3 (links unten) und t4 (rechts unten). In grün (ARCH915, FITC) sind Archaea und in rot Bakterien (EUB338-1, Cy3) zu sehen. Blau ist die DAPI-Gegenfärbung.

Nach Substratzugabe (t3 und t4) wiesen beide Kulturen (Holzhackschnitzel und Holzpellets) eine bakterielle Kontamination auf, woraus geschlossen werden kann, dass die UV-Bestrahlung die Substrate nicht ausreichend sterilisierte (Abb. 58). Weiterhin besitzt Holz eine hohe Autofluoreszenz, was die Mikroskopie und eine Detektion der Organismen erschwerte. Insbesondere in den Kulturen, denen Holzpellets zugegeben wurden, fiel die Detektion der methanogenen Organismen schwer, da sie häufig zwischen dem Holzmaterial eingebettet lagen. Zudem konnte im Vergleich zu den Holzhackschnitzel-Kulturen eine schwächere Aktivität dieser Organismen festgestellt werden, da ihre grüne Färbung deutlich geringer ausfiel als vor der Substratzugabe (t1, t2). Dies war nicht der Fall in den Holzhackschnitzel-Kulturen, da hier vor allem *Methanosarcina barkeri* sehr schnell und deutlich entdeckt werden konnte und aufgrund der deutlichen Färbung auch auf eine Aktivität

der Organismen geschlossen werden kann. Im Anhang sind alle FISH-Aufnahmen nochmals für jeden Filter dargestellt, um die schwächere Grünfärbung der Archaeen in den Holzpellet-Kulturen zu verdeutlichen.

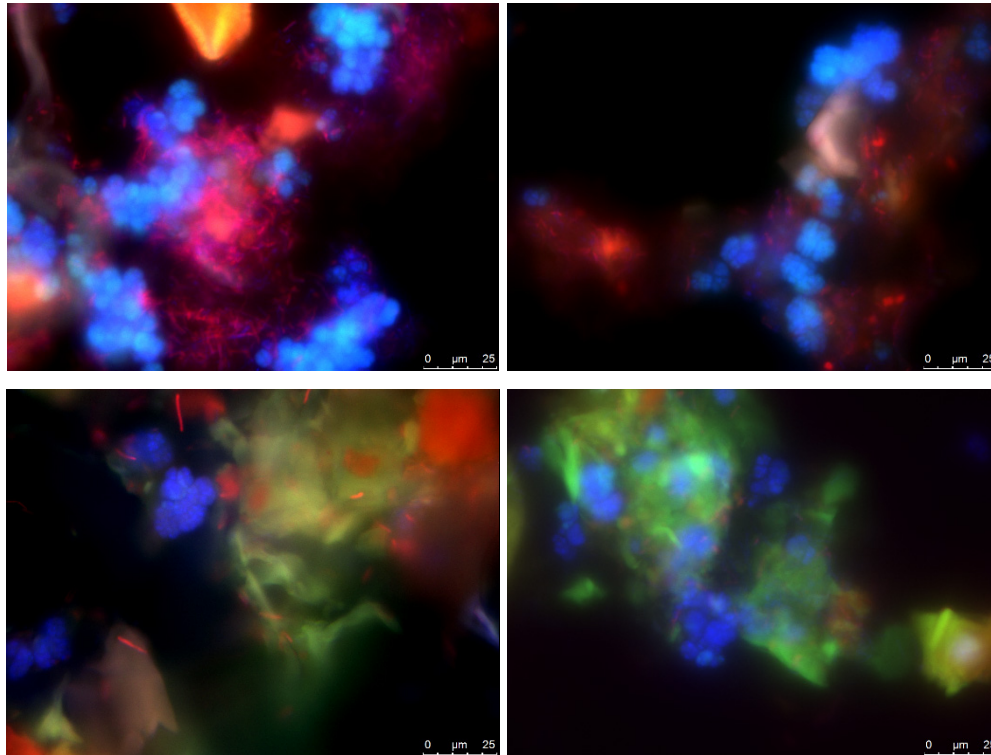


Abbildung 58: FISH Mikroskopiebilder der Kultur mit der methanogenen Ko-Kultur nach Substratzugabe (t3 und t4). Oben Kultur mit Holz hackschnitzeln bei t3 (links) und t4 (rechts). Unten Kultur mit Holzpellets bei t3 (links) und t4 (rechts). In grün sind Archaea (ARCH915, FITC) und in rot Bakterien (EUB338-1, Cy3) dargestellt, in blau die DAPI Gegenfärbung.

Um eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Kulturen zu finden, wurde nach 20 Tagen eine Probe für eine pH-Wert Messung entnommen. Es stellte sich heraus, dass der pH-Wert mit 6,8 bis 7 bei der Kontroll-Kultur sowie bei der Holz hackschnitzel-Kultur stabil und im optimalen Bereich für methanogene Organismen lag. Bei der Holzpellet-Kultur hingegen konnte ein pH-Wertabfall von 7 auf 5,7 bis 6 festgestellt werden, was außerhalb des Optimums für methanogene Organismen liegt. Da laut Herstellerangaben der Holzpellets kein Bindemittel oder Ähnliches verwendet wurde, wäre eine Möglichkeit, dass die pH-Wertsenkung durch die Holz zusammensetzung der Holzpellets zustande kam. Ein Vergleich des pH-Wertes der verwendeten Holzpellets mit Weichholzanteil und Holzpellets aus reinem Hartholz nach 33 Tagen (t) ist in Tabelle 23 aufgezeigt. Die Analyse des pH-Wertes der Holzpellets zeigt, dass beide einen geringen pH-Wertabfall nach insgesamt 33 Tagen bewirkten und zwar von 6,9 auf durchschnittlich 6,5 für die Holzpellets mit Weichholzanteil und von 7 auf durchschnittlich 6,77 für jene aus reinem Hartholz. Somit wiesen die

Weichholzpellets einen geringfügig stärkeren pH-Wertabfall auf als die Hartholzpellets. Allerdings war der Unterschied nicht signifikant und der Wert fiel auch nach 33 Tagen nicht unter 6, wie im vorangegangenen Experiment beobachtet wurde. Dies bedeutet in diesem Fall, dass die Holzart unter abiotischen Bedingungen nicht alleine den pH-Wertabfall hervorgerufen hat.

Tabelle 23: Mittelwert (MW) der pH-Wert Messung für Weichholzpellets und Hartholzpellets im Methanobacterium-Medium nach 1, 3, 7, 22 und 33 Tagen.

Holzpellet	pH t₀ MW	pH t₁ MW	pH t₃ MW	pH t₇ MW	pH t₂₂ MW	pH t₃₃ MW
Weichholz	6,87	6,83	6,78	6,77	6,5	6,5
Hartholz	6,97	6,93	6,87	6,93	6,7	6,77

Ob wirklich der pH-Wert der Grund für die Inhibierung der Methanogenen war, sollte ein weiteres Experiment zeigen, bei welchem der pH-Wert der Weichholzpellets nur bei einem von zwei Triplikaten eingestellt wurde (Abb. 59). Überraschenderweise fiel diesmal der pH-Wert bei keiner der beiden Kulturen vom pH-Startwert des Mediums (7) signifikant ab wie es beim ersten Experiment der Fall war. Vielmehr lag der pH-Wert auch 20 Tage nach der Holzpellet-Zugabe bei allen Kulturen zwischen 6,8 bis 7,1. Auch einen Monat nach der Substratzugabe fiel der pH-Wert nur geringfügig auf 6,6 bis 6,8 ab und ist somit nicht vergleichbar gesunken, wie im Experiment zuvor. Dies spiegelte auch der Verbrauch von H₂ und CO₂ sowie die Methanproduktion wieder. Deren Anstieg konnte bis 14 Tage nach der Holzpelletzugabe regelmäßig nach der Begasung mit H₂/CO₂ beobachtet werden. Nach diesem Zeitpunkt (05.02.2019) zeigte sich jedoch ein anderes Verhalten, da in beiden Kulturen plötzlich keine erhöhte Methanproduktion mehr erfasst werden konnte. Der pH-Wert lag zu diesem Zeitpunkt weiterhin im neutralen Bereich und kann somit nicht alleine für diese Inhibierung der Methanproduktion verantwortlich gewesen sein (Abb.59).

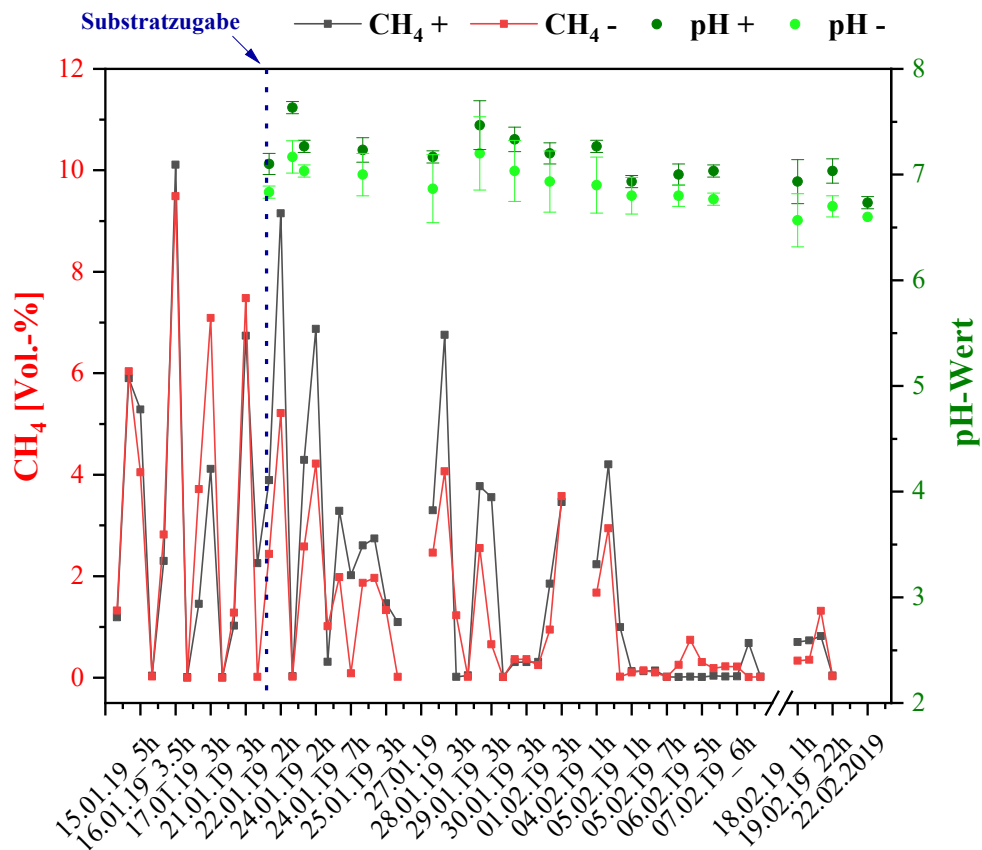


Abbildung 59: Methankonzentration in der methanogenen Ko-Kultur mit Holzpellets, in denen der pH-Wert eingestellt wurde (+) und Kultur, in welcher der pH-Wert nicht eingestellt wurde (-). Nach 7 Tagen der Kultivierung wurden die Holzpellets (Substratzugabe) zugegeben. Auf Grund einer besseren Übersichtlichkeit ist die Standardabweichung der Methankonzentration nicht dargestellt, kann jedoch im Anhang gefunden werden.

Zur finalen Klärung, was zu einer Inhibierung der methanogenen Organismen geführt hat, bedarf es noch weiterer Untersuchungen, um aussagen zu können, ob der pH-Wert der ausschlaggebende Faktor ist oder ob noch andere (biotische) Parameter eine Rolle spielen.

4 Diskussion

Umweltdenitrifikationsanlagen stellen eine einfache und kostengünstige Möglichkeit dar, den Nitratüberschuss in Ökosystemen zu reduzieren und eine Eutrophierung von Gewässern zu vermeiden. Das Design und der Aufbau der Anlagen sind simpel. An einem effizienten Nitratabbau ist jedoch eine Reihe an Faktoren beteiligt, deren komplexes Zusammenspiel eingehend untersucht werden muss. Ziel dieser Arbeit war es, die Funktionalität einer in Mitteleuropa errichteten Umweltdenitrifikationsanlage zu untersuchen, da der Stand der Forschung vorrangig auf Anlagen aus Amerika, Kanada und Neuseeland beruht. Denitrifikationsanlagen dieser Art sind in Deutschland bisher noch nicht im Detail charakterisiert worden, was die Ergebnisse des vorliegenden Pilotprojekts im wissenschaftlichen Kontext besonders relevant macht. In dieser Arbeit sollten die maßgeblichen Einflussgrößen auf die Denitrifikationsleistung bestimmt sowie die Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte betrachtet werden. Zudem war es das Ziel die Funktionalität der Anlage als Funktion des katalysierenden Mikrobioms begreifen zu können. Daher wurde bis dato eine nicht erreichte Vielzahl an Sequenzdaten ausgewertet, um Schlüsselorganismen identifizieren und die Interaktion der Mikroorganismen analysieren zu können.

Darüber hinaus wurden zwei offene Fragestellungen in Laborreaktoren evaluiert. Zum einen, welche Organismen bei Eintritt einer DNRA nach Zugabe hoher Nitratkonzentrationen beteiligt sind. Zum anderen sollte der Inhibition der methanogenen Organismen in Holzpellet-Reaktoren nachgegangen werden.

4.1 Funktionalität und Limitation der Freiland-Umweltdenitrifikationsanlage

Bei der Planung einer Denitrifikationsanlage ist eine sorgfältige Ermittlung der Randbedingungen, wie der klimatischen Gegebenheiten, des Einzugsgebiets, der Abflussmengen sowie der Topographie notwendig, um die Dimensionierung der Anlage passend gestalten zu können. Neben der Bewertung der Nitratentfernungsleistung und beeinflussender Faktoren ist die potentielle Entstehung umweltschädlicher Produkte zu berücksichtigen. Dabei handelt es sich insbesondere um die Produktion von Treibhausgasen wie N_2O oder CH_4 und die Freisetzung von ökotoxischem NO_2^- durch einen unvollständig ablaufenden Denitrifikationsprozess. Eine Nutzen-Schaden-Abwägung ist daher erforderlich, um individuell über die Sinnhaftigkeit der Errichtung einer Denitrifikationsanlage zu entscheiden.

4.1.1 Nitratentfernung und limitierende Faktoren der untersuchten Anlage

Im vorliegenden Fall des Moor *Mürmes* in der Vulkaneifel war die Nitratbelastung durch die landwirtschaftlichen Äcker so hoch, dass nur eine Umweltdenitrifikationsanlage eine Eutrophierung des Moores verhindern konnte. Mit Hilfe der aufgebauten Monitoring-Station wurde die im Zu- und Ablauf auftretende Nitratkonzentration über dreieinhalb Jahre erfasst und die Umweltdenitrifikationsanlage umfangreich charakterisiert. Dies ermöglicht eine detaillierte Bewertung der Nitratentfernungsleistung.

Um die Nitratentfernungsrate verschiedener Studien mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten zu vergleichen, ist die Methode der Berechnung ausschlaggebend. So beziehen manche Studien die Porosität und das effektive wassergefüllte Porenvolumen in ihre Berechnung der Nitratentfernungsrate mit ein (Ghane *et al.*, 2015; Healy *et al.*, 2012). Andere Studie hingegen vernachlässigen die Porosität und verwenden das gesamte Beckenvolumen (Christianson *et al.*, 2013; Schipper *et al.*, 2010; Schipper *et al.*, 2010; Warneke, Schipper, Bruesewitz & Baisden, 2011). Da das Ergebnis der Porositätsberechnung in der vorliegenden Arbeit nicht valide war, wurde letztere Berechnungsmethode, die das gesamte Beckenvolumen zu Grunde legt, verwendet. Die Ergebnisse wurden dementsprechend auch nur mit Studien verglichen, die dieselbe Berechnungsmethode anwandten.

Im Analysezeitraum von 2016 bis 2019 erzielte die Anlage wiederholt sehr hohe Nitratreduktionen und Nitratentfernungseffizienzen von bis zu 100%. Die Anlage erreichte dabei maximale Nitratentfernungsraten von 12,1 g NO₃-N m⁻³ d⁻¹ für die simulierten Abflusswerte und 7,88 g NO₃-N m⁻³ d⁻¹ für die gemessenen Abflusswerte. Die durchschnittliche Nitratentfernungsrate der simulierten Abflusswerte lag bei 1,18 g NO₃-N m⁻³ d⁻¹ und für die gemessenen Flussraten bei 0,39 g NO₃-N m⁻³ d⁻¹. Dabei muss bedacht werden, dass für die gemessenen Flussraten nur der Zeitraum von 2018 bis 2019 beobachtet und bei den simulierten Werten auch das Jahr 2017 mit einberechnet wurde, was unter anderem Einfluss auf den Unterschied der beiden Raten hatte.

Im Vergleich zu anderen untersuchten Freilanddenitrifikationsanlagen, die mit Holzhackschnitzeln betrieben wurden, liegen die ermittelten Werte in einem vergleichbaren Bereich. Warneke *et al.* (2011) ermittelte maximale Nitratentfernungsraten von 8,73 ± 1,45 g NO₃-N m⁻³ d⁻¹ (Warneke, Schipper, Bruesewitz & Baisden, 2011). Schipper *et al.* (2010) untersuchten mehrere Standorte und stellten jeweils unterschiedliche Nitratentfernungsraten fest. So schwankten die Werte bei einem Standort von 0 bis 11 g NO₃-N m⁻³ d⁻¹ und beim anderen Standort lag die durchschnittliche Nitratentfernungsrate bei 1,4 g NO₃-N m⁻³ d⁻¹

(Schipper *et al.*, 2010). Christianson *et al.* (2013) beobachteten mit 0,38 bis 1,06 g NO₃-N m⁻³ d⁻¹ vergleichbare Werte in Anlagen mit Holzhackschnitzeln (Christianson *et al.*, 2013). Vergleicht man diese Literaturwerte mit den in dieser Arbeit gemessenen, zeigt sich ein vergleichbares Niveau bei der maximalen und durchschnittlichen Nitratentfernungsrates. Allerdings ist zu bedenken, dass die maximale durchschnittliche Anlagenleistung auch von der verfügbaren Nitratmenge abhängt. Wenn die Anlage eine größere Nitratmenge reduzieren könnte, als zur Verfügung steht, ist die Nitratmenge der limitierende Faktor. Dies führt zu einer vordergründig geringeren Nitratentfernungsrates und einer Unterschätzung des Anlagenpotentials. Ein Hinweis auf eine vorliegende Nitratlimitierung ist eine vollständige Nitratreduktion am Ablauf der Anlage (Christianson *et al.*, 2013; Robertson *et al.*, 2005; Schipper *et al.*, 2010). Dies wurde in der vorliegenden Arbeit mehrfach über längere Zeitabschnitte beobachtet, was darauf hinweist, dass die Anlage zeitweise nicht voll ausgelastet war. Dass eine deutlich höhere durchschnittliche Nitratentfernungsrates erzielt werden kann, zeigte eine Studie von Warneke *et al.*, bei der es zu keiner Nitratlimitierung kam und somit die durchschnittliche Rate bei 7,6 g N m⁻³ d⁻¹ lag (Warneke, Schipper, Bruesewitz, McDonald, *et al.*, 2011).

Zusätzlich ist die Nitratlimitierung eng mit der HRT bzw. der Flussrate verknüpft. Ist die Flussrate hoch bzw. die HRT kurz, sollte die Nitratentfernungsrates steigen und zugleich die Effizienz der Anlage sinken (Lepine *et al.*, 2015). In der vorliegenden Arbeit wurde eine solche Gegebenheit am 28.11.2017 beobachtet. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine vergleichsweise hohe Flussrate von 0,5 l/s gemessen und die simulativ ermittelte, theoretische HRT betrug 2,4 Tage. Gleichzeitig war die einfließende Nitratkonzentration mit 252,3 mg/l sehr hoch, womit potentiell keine Nitratlimitation vorlag. Die Nitratentfernungsrates erreichte mit 6,41 g N m⁻³ d⁻¹ vergleichbare Werte wie bei Warneke *et al.* (2011) und die Nitratentfernungseffizienz sank auf 50%. Dies zeigt, dass eine erhöhte Flussrate und hohe Nitratkonzentrationen die Anlageneffizienz senken, gleichzeitig trotzdem eine hohe Nitratentfernungsratesleistung erbracht und ein signifikanter Anteil des Nitrats reduziert werden kann.

Die Nitratentfernungseffizienz erreichte in der vorliegenden Arbeit, vorrangig in klimatisch wärmeren Zeitabschnitten des Analysezeitraums mit geringerer Flussrate, hohe Werte. Neben der HRT hat auch die Temperatur einen Einfluss auf die Nitratentfernungsratesleistung, vor allem in den kalten Wintermonaten. In diesen wird zudem mehr gelöster Sauerstoff (DO) in die Anlage transportiert und beeinträchtigt die Denitrifikationsleistung der Mikroorganismen zusätzlich (Greenan *et al.*, 2009).

In der vorliegenden Arbeit traten beide Faktoren - niedrige Temperaturen und hohe Abflussraten - überwiegend gemeinsam in den kalten, regenreichen Wintermonaten auf, wobei die Anlageneffizienz sank (Abbildung 31, Kapitel 3.1.4). Der zusätzliche Temperatureinfluss konnte auf Basis der ermittelten Messdaten nicht eindeutig verifiziert werden, da die getrennte Betrachtung beider Parameter, insbesondere im Feldmaßstab, schwer realisierbar ist. Jedoch ist der Einfluss der Temperatur auf die Nitratentfernungsleistung in der vorliegenden Arbeit nicht auszuschließen, da mehrere Studien mit Holzhackschnitzeln der Temperatur sogar einen größeren Einfluss zuschreiben als der Flussrate (Cameron & Schipper, 2012; van Driel *et al.*, 2006; Halaburka *et al.*, 2019; Nordström & Herbert, 2018; Warneke, Schipper, Matiassek, *et al.*, 2011).

Insgesamt verifizieren die Ergebnisse dieser Arbeit die Hypothese, dass Umweltdenitrifikationsanlagen erfolgreich zur Nitratreduzierung in Mitteleuropa eingesetzt werden können. Die kontinuierlichen Messungen der Monitoring-Station lieferten umfangreiche Ergebnisse, die zeigten, dass die Anlage in längeren Zeitabschnitten des Jahres signifikante Mengen Nitrat entfernte. Gleichzeitig wurden jedoch auch Anlagenlimitationen beobachtet, insbesondere die der sinkenden Effizienz bei der Nitratentfernung. Diese wurde durch mehrere Parameter beeinflusst: Nitratkonzentration, Flussrate und Temperatur. Diese und besonders der Temperatureinfluss sollten auf Laborebene mit dem Holzsubstrat und der mikrobiellen Zusammensetzung aus der Denitrifikationsanlage D7 getrennt für sich weiter untersucht und bewertet werden. Die Analyse des DO könnte zusätzliche Informationen zum Temperatureinfluss liefern. Die beiden Nitratentfernungsmetriken - Effizienz und Rate - könnten zudem anlagenseitig durch eine Kontrolle der Flussrate bzw. HRT in ein ausgewogeneres Gleichgewicht gebracht werden. Somit würde die Anlage näher am Optimum betrieben und gleichmäßiger ausgelastet werden. Maßnahmen hierzu werden in Kapitel 4.4 erläutert.

4.1.2 Entstehung umweltwirksamer Nebenprodukte

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Produktion umweltwirksamer Nebenprodukte zu identifizieren. Dabei sollten die Umweltbedingungen festgestellt werden, bei denen diese auftreten und der Einfluss der mikrobiellen Zusammensetzung verifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden im Wesentlichen drei umweltschädliche Nebenprodukte festgestellt: Nitrit, Methan und CO₂. Letzteres ist ein Endprodukt der heterotrophen

Denitrifikation und somit unvermeidbar. Daher liegt der Fokus im Folgenden auf der Entstehung von Nitrit und Methan in der Denitrifikationsanlage.

Nitritakkumulation

Eine Nitritakkumulation ist in der vorliegenden Arbeit eindeutig innerhalb der Umweltdenitrifikationsanlage D7 festgestellt worden. Diese fiel am höchsten im November 2017 aus (Kapitel 3.1.5, Abbildung 34). Die Frage, welcher Parameter ausschlaggebend für eine Nitritakkumulation ist, kann nicht auf eine einzelne Größe alleine zurückgeführt werden. Insgesamt wurden jedoch drei Haupteinflussfaktoren beobachtet: die Flussrate, die Nitratkonzentration und das Mikrobiom.

In der vorliegenden Untersuchung wurde eine Nitritakkumulation häufig bei erhöhten Flussraten beobachtet. Diese und folglich eine kurze HRT im Becken stellen eine Möglichkeit für die Nitritakkumulation dar, die dazu führt, dass Nitrit aus der Anlage entlassen wird, bevor es die Mikroorganismen weiter reduzieren. Allerdings gab es auch Ausnahmen, beispielsweise im Februar 2019 mit Werten von über 1,5 mg/l NO_2^- bei einer geringen Zuflussrate von 0,2 l/s. Hier könnte ein weiterer, bisher nicht identifizierter Parameter die Nitritakkumulation beeinflusst haben.

Neben der Flussrate zeigte auch die Höhe der einfließenden Nitratkonzentration einen Einfluss auf die Nitritakkumulation, was insbesondere die Messung Ende November 2017 bestätigte. So fiel die Nitritkonzentration durch die hohen einfließenden Nitratwerte (210 mg/l) mit 4,8 mg/l am höchsten an St. 4 aus. Die Nitritkonzentration nahm von St. 1 (1,74 mg/l) bis St. 4 kontinuierlich zu und nahm anschließend bis zum Ablauf auf 3,8 mg/l ab (Kap. 3.1.5, Abb. 45). Das zeigt, dass eine hohe einfließende Nitratkonzentration bei einer kurzen HRT zu einer Nitritakkumulation führt. Bei dieser Messung konnte das Nitrit zudem nicht vollständig abgebaut werden. Auch Shen *et al.* (2013) beobachteten ähnliches in einem Bioreaktor mit Stärke und Polycaprolacton. Niedrigere Nitratkonzentrationen im Zulaufs und eine konstante Flussrate senkten die Nitritkonzentration im Ablaufwasser signifikant (Shen *et al.*, 2013). Das Zusammenwirken mehrerer Prozessparameter (HRT, Nitratkonzentration) an der Nitritentstehung wird durch diese Beobachtung bekräftigt.

Ein weiterer wichtiger Faktor für eine Akkumulation von Nitrit ist die mikrobielle Zusammensetzung, die in Umweltdenitrifikationsanlagen bisher selten berücksichtigt wurde. Mehrere Organismen reduzieren bevorzugt nur Nitrat und akkumulieren dabei Nitrit (Lycus *et al.*, 2017; Wilderer *et al.*, 1987). In der durchgeführten Metatranskriptom-Analyse (Kap. 3.1.6.2) wurde eine erhöhte Genexpression des NarGHI Komplexes (TPM: 22,4) bei der Gattung *Thauera*, welche zur Ordnung Rhodocyclales gehört, beobachtet. Gleichzeitig

konnte bei dieser Gattung keine Genexpression für die Nitritreduktase (*nirS/nirK*) festgestellt werden. Dieser Organismus trägt folglich potentiell zur Nitritakkumulation in der Anlage bei. Eine Nitritakkumulation durch diesen Organismus wurde auch in anderen Studien beobachtet und auf eine NO_2^- -Reduktionshemmung durch NO_3^- zurückgeführt. Es erfolgte keine Transkription von *nir*-Genen bis das gesamte Nitrat aufgebraucht war (Du *et al.*, 2016; Liu *et al.*, 2013). Auch zum Zeitpunkt der Probenentnahme für die Metagenom- und Metatranskriptom-Sequenzierung waren an der Probenentnahmestelle noch 7,02 mg/l Nitrat und 0,65 mg/l NO_2^- vorhanden. Die vorhandene Nitratkonzentration würde erklären, wieso für die Gattung *Thauera* keine Genexpression der *nir*-Gene festgestellt werden konnte. Der Einfluss der Nitratkonzentration auf die Nitritakkumulation wird dadurch erneut verdeutlicht.

Neben der Nitratkonzentration und der HRT können weitere Parameter die Mikroorganismen hinsichtlich einer Nitritakkumulation beeinflussen, wie beispielsweise niedrige Wassertemperaturen. Das Wachstum und die Aktivität vieler denitrifizierender Organismen wird durch niedrige Temperaturen gehemmt und führt zu einer unvollständigen Denitrifikation (Liao *et al.*, 2018). In der vorliegenden Untersuchung konnte der Wasserstemperatur keine eindeutige Einflussnahme auf die Nitritakkumulation zugeschrieben werden. Denn im Analysezeitraum stiegen die Nitratkonzentration und Flussrate bei niedrigen Wassertemperaturen meist zusammen an, so dass der Temperatureinfluss alleine nicht beobachtet werden konnte.

Allgemein wurde die Entstehung von Nitrit in Studien über Holzhack-schnitzel-Denitrifikationsanlagen selten eingehender analysiert oder die ermittelten Konzentrationen fielen gering aus (Grießmeier & Gescher, 2018; Nordström & Herbert, 2018; Warneke, Schipper, Bruesewitz, McDonald, *et al.*, 2011). Gibert *et al.* (2008) beobachteten für Hartholz-basierte Labordenitrifikationsreaktoren sporadisch hohe Nitritkonzentrationen von bis zu 21 mg/dm³ $\text{NO}_2\text{-N}$, konnten jedoch keine eindeutige Erklärung dafür finden und fordern mehr Forschungsarbeiten zu diesem Themengebiet (Gibert *et al.*, 2008).

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass die Entstehung von Nitrit kein sporadisches Ereignis, sondern durchaus ein ernstzunehmendes Nebenprodukt ist und in zukünftigen Forschungsarbeiten intensivere Beachtung finden sollte. Die Analyse des Mikrobioms, welches in Kapitel 4.1.4 eingehender diskutiert wird, liefert hierbei wichtige Erkenntnisse zu den molekularbiologischen Prozessen und Hinweise zu einer Eindämmung dieses Nebenprodukts.

Methanproduktion

Neben der Entstehung von Nitrit wurde die Entstehung von Methan, ein weiterer umweltwirksamer Parameter, beobachtet. Das Auftreten von Nitrit und Methan innerhalb einer Anlage ist, nach der Hypothese mehrerer Studien, ungewöhnlich, die besagen, dass die Methanogenese durch die Denitrifikation beziehungsweise deren Zwischenprodukte gehemmt wird (Klüber & Conrad, 1998; Roy & Conrad, 1999; Tugtas & Spyros, 2006). In der untersuchten Umweltdenitrifikationsanlage konnte jedoch genau dies beobachtet werden. Insbesondere an Probenentnahmestelle St. 1, die dem Zulauf am nächsten liegt, wurden die höchsten Nitratkonzentrationen, aber auch stets die höchsten Methanemissionen gemessen (Kapitel 3.1.3/3.1.5). Letztere waren in den trockenen Sommermonaten, in denen kein nitrathaltiges Wasser in die Anlage strömte immer am höchsten. Jedoch gab es auch Beobachtungszeiträume (Okt. 17, April 18, Juni 18), in denen Nitrat mit geringer Flussrate (0,03 bis 0,09 l/s) in die Anlage einfluss und trotzdem Methan an St. 1 (0,7 bis 4,2 Vol.-%) emittiert wurde. Dahingegen produzierten weiter abwärts in der Anlage gelegene Probeentnahmestellen, wie St. 4, kein Methan. Dort wären methanogene Organismen allerdings potentiell geschützt vor toxischen Zwischenprodukten der Denitrifikation. Eine Möglichkeit wäre, dass sich in den Holzhackschnitzeln Nischen bilden, in welchen methanogene Organismen getrennt von denitrifizierenden Mikroorganismen existieren. Denitrifizierende Organismen treten hauptsächlich in der planktonischen Phase auf, so dass methanogene Organismen in tieferen Lagen des Biofilms auf den Holzhackschnitzeln vor toxischen Zwischenprodukten geschützt sein könnten. Eine simultane Denitrifikation und Methanogenese wurde bereits in anderen Studien beobachtet, wenn diese beiden Prozesse in unterschiedlichen Biofilmlagen oder Kompartimenten stattfanden (Andalib *et al.*, 2011; Lin & Chen, 1995).

Jedoch zeigte die 16S-rRNA-Amplikon-Analyse, dass methanogene Organismen an St. 3 mit Ausnahme von Nov. 2017 und April 2018 nur in der planktonischen und nicht in der sessilen Phase auftraten. Auch die Metagenomanalyse vom April 2018 bestätigte, dass methanogene Organismen in der festen Phase deutlich unterrepräsentiert waren. Wenn davon ausgegangen wird, dass sich die mikrobielle Verteilung an St. 1 ähnlich verhält, kann ein simultaner Ablauf beider Prozesse durch eine räumliche Trennung von methanogenen und denitrifizierenden Organismen so nicht erklärt werden. Eine weitere Möglichkeit könnte jedoch die Substratverfügbarkeit für methanogene Organismen (Acetat/ H₂, CO₂) an St. 1 darstellen. Diese könnte im vorderen Teil der Anlage höher ausfallen als im hinteren, da die Analyse der denitrifizierenden Schlüsselorganismen zeigte, dass Acetat von einem Großteil dieser als Elektronendonator verwendet wird. So wäre es denkbar, dass Acetat vorrangig im vorderen

Bereich - in welchem noch mehr Nitrat vorhanden ist - verbraucht wird und somit im hinteren Teil der Anlage für acetoklastische methanogene Organismen nicht mehr verfügbar ist. Gleichzeitig wird durch die heterotrophe Denitrifikation auch CO₂ produziert, das ein Substrat für hydrogenotrophe methanogene Organismen darstellt. Zudem scheint bei einem COD/N Verhältnis über 10 kein inhibitorischer Effekt mehr für methanogene Organismen auf Grund einer Kohlenstoffsubstratkonkurrenz stattzufinden, was bei gegebenen Verhältnissen eine weitere Erklärung für eine Ko-Existenz der beiden Prozesse sein könnte (Andalib *et al.*, 2011).

Eine weitere unvorhergesehene Beobachtung waren die Schwankungen der Methanemission an St. 6 in der vorderen Hälfte der Anlage, welche gegensätzlich alternierend zur Sauerstoffkonzentration verliefen. Die Methanogenese ist ein sehr sauerstoffempfindlicher Prozess und daher ist nachvollziehbar, dass die Methanproduktion bei steigenden Sauerstoffkonzentrationen abnimmt (Erkel *et al.*, 1998). Schwieriger zu erklären ist, warum es vorrangig nur an St. 6 zu den gemessenen Sauerstoffschwankungen kam. Die Entstehung von Sauerstoff durch eine oxygene phototrophe Photosynthese ist aufgrund der Dunkelheit in den Schächten und der Tageszeit (6 Uhr) unrealistisch. Eine Möglichkeit könnte sein, dass Luft und somit auch Sauerstoff durch gaszehrende Stoffwechselprozesse in den Schacht von außen einströmte. Dieser würde dann von aeroben und fakultativ anaeroben Mikroorganismen verbraucht werden. Sobald der Sauerstoffgehalt wieder sinkt, würde die Methanogenese erneut beginnen. Mittels einer Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse sollte dieses beobachtete Phänomen weitergehend untersucht und aufgeklärt werden. Allerdings konnten die Gasschwankungen zum geplanten Probenentnahmezeitpunkt nicht mehr an St. 6, sondern an St. 5 detektiert werden (Kapitel 3.1.5). Dies lässt vermuten, dass die Schwankungen der Methan- und Sauerstoffwerte mit weiteren Vorgängen innerhalb der Anlage zusammenhängen wie beispielsweise dem Fließverhalten.

Wie diese Arbeit, stellten auch andere Freilanduntersuchungen eine steigende Methanemission in den Sommermonaten bei höheren Temperaturen und geringerer Flussrate fest (Davis *et al.*, 2019; Elgood *et al.*, 2010; Ghane *et al.*, 2015). Eine mögliche Erklärung ist, dass die Kohlenstoffquelle mit steigender Temperatur schneller zersetzt wird, was zu mehr Ausgangssubstrat für methanogene Organismen führt (Cameron & Schipper, 2010). Außerdem stimulieren höhere Temperaturen aerobe Mikroorganismen, welche den im Wasser vorhandenen DO verbrauchen und somit die Bedingungen für methanogene Mikroorganismen begünstigen (Warneke, Schipper, Bruesewitz, McDonald, *et al.*, 2011). Dies tritt vor allem dann ein, wenn kein Wasser in die Anlage fließt und diese sich im *Batch*-Modus befindet. Der DO und das Nitrat werden vollständig verbraucht und führen somit zu

reduzierenden Verhältnissen in der Anlage. Beim Design dieser Becken sollte somit immer mit bedacht werden, dass trockene Perioden mit geringem Nitratreintrag in die Anlage, potentielle Umweltrisiken, wie die Emission von Methan, mit sich bringen können. Diese sollten verhindert oder auf ein Minimum reduziert werden. Mögliche Maßnahmen hierzu werden in Kapitel 4.4 diskutiert.

Weitere umweltwirksame Produkte

Die Produktion weiterer umweltwirksamer Substanzen, wie Ammonium und N_2O wurde bei der Untersuchung dieser Umweltdenitrifikationsanlage nicht oder nur in geringen Mengen detektiert. Ammonium entsteht durch den DNRA-Prozess. Doch trotz teilweiser erhöhter TOC-Konzentrationen (hohe Elektronendonorkapazität), welche laut Literatur eine DNRA begünstigen, blieb die Ammoniumkonzentration in der Anlage niedrig und spielte daher eine untergeordnete Rolle (Tiedje, 1988). Dies deckt sich auch mit anderen Untersuchungen (Greenan *et al.*, 2006; Long *et al.*, 2011; Schipper *et al.*, 2005; Schipper *et al.*, 2010; Warneke, Schipper, Bruesewitz, McDonald, *et al.*, 2011). Die DNRA als konkurrierender Prozess zur Denitrifikation kann somit in der hier untersuchten Umweltdenitrifikationsanlage vernachlässigt werden.

Des Weiteren fiel auch die N_2O -Produktion - wie bei anderen Studien - gering aus (Ghane *et al.*, 2015; Healy *et al.*, 2012; Moorman *et al.*, 2010; Woli *et al.*, 2010). Die hohe Expression des *nosZ*-Gens (TPM: 238,9), welches für den letzten Schritt der Denitrifikation von N_2O zu N_2 verantwortlich ist, unterstützt diese Beobachtung. Hierbei kommt Vertretern der Nitrosomonadales (*Sulfuritalea*) und *Cand. Accumulibacter* eine Schlüsselfunktion zu, welche das Gen vorrangig exprimierten und diese sich somit günstig auf die Umweltverträglichkeit auswirken.

Die höchste N_2O -Konzentration wurde Ende November 2017 gemessen. Das ist plausibel, da hier im Zulauf auch die höchsten Nitratkonzentrationen auftraten. Der Denitrifikationsprozess lief zu diesem Zeitpunkt nicht vollständig ab und es wurden erhöhte Nitrat- und Nitritwerte im Ablaufwasser festgestellt. Das erklärt, warum St. 4 für diesen Zeitpunkt - neben der höchsten Nitritkonzentration - auch die höchste N_2O -Konzentration aufwies, da sich die Messstelle im hinteren Teil der Anlage nahe des Ablaufs befindet (Kap. 2.1.1, Abb. 10) und das Wasser somit aus der Anlage floss, bevor die Denitrifikation vollständig abgeschlossen werden konnte.

Ein weiteres Produkt, das diskutiert werden muss, ist der TOC-Gehalt. Werte von über 40 mg/l stellen bereits eine sehr hohe Belastung für Gewässer dar. Für die Erhaltung der

Wassergüteklasse II (mäßige Belastung) ist daher ein geringerer Wert von 5 mg/l TOC anzustreben (LAWA-Arbeitskreis, 1998). In der vorliegenden Arbeit war der TOC-Gehalt am Ablauf der Anlage meist höher als jener des Zulaufs. Das beweist, dass ein gewisser Teil des organischen Kohlenstoffs ausgewaschen und mikrobiell nicht verwertet wurde. Jedoch lag die TOC-Konzentration der Kontrollwerte am Ablauf der Anlage meist unter dem Grenzwert von 40 mg/l, mit Ausnahme dreier Ereignisse (April 2017, März 2018 und 2019). Zudem war der durchschnittlich gemessene TOC-Gehalt geringer als in anderen Studien, die Holzhackschnitzeln als C-Quelle betrachteten. In diesen zeigten zudem vor allem Weichholzarten, wie Kiefernholz, mit durchschnittlich 138,3 mg/l eine höhere TOC-Auswaschung als Reaktoren, die mit Harthölzern wie Buchenholz (70,3 mg/l) betrieben wurden (Lopez-Ponnada *et al.*, 2017). Diesen Unterschied konnte auch eine dieser Arbeit vorangestellte Untersuchung feststellen. Dort zeigten Reaktoren mit Holzpellets, die vorrangig aus Kiefernholz bestanden, einen deutlich höheren TOC-Gehalt als Reaktoren, die mit Pappel-Holzhackschnitzel betrieben wurden (Grießmeier & Gescher, 2018). Dies bestätigt, dass die Holzhackschnitzelart (Buchenholz) in der vorliegenden Arbeit bezüglich der TOC-Auswaschung die richtige Wahl darstellte. Zukünftige Studien sollten daher nicht nur auf die Art des C-Substrats (Holzhackschnitzel), sondern auch auf die Holzart achten.

4.1.3 Fließverhalten in der Anlage

Mit Hilfe des Uranin-Tracerversuchs sollten die Durchflusseigenschaften sowie die *in-situ* Porositätswerte der Holzhackschnitzel-Anlage ermittelt werden. Das Ergebnis des Tracerversuchs ergab eine nicht valide Porosität von 1,6. Dieses Ergebnis steht im Gegensatz zu anderen Tracerversuchen, die in Anlagen mit Holzhackschnitzeln einen Porositätswert von 0,6 bis 0,83 ermittelten (Cameron & Schipper, 2012; van Driel *et al.*, 2006; Robertson, 2010). Der unrealistische Porositätswert dieser Anlage resultierte in einer längeren realen HRT von 4,5 Tagen, während die theoretisch berechnete HRT 2,2 Tage betrug. Wäre die reale HRT kürzer als die theoretische ausgefallen, hätte darüber berechnet werden können, wieviel Prozent der Anlage tatsächlich durchströmt und genutzt werden. Da aber das Gegenteil der Fall war, müsste die Anlage ein größeres Volumen aufweisen, um der Diskrepanz zwischen theoretischer und realer HRT gerecht zu werden. Eine Charakterisierung des Fließ- und Strömungsverhaltens in der Anlage gestaltete sich daher komplizierter als angenommen.

Eine Erklärung könnte jedoch sein, dass die reale Fließstrecke in der Anlage länger als die zur Berechnung verwendete ist, der Tracer zurückgehalten oder sogar absorbiert wurde. Dies

würde auch die Schwerpunktgeschwindigkeit und Fläche für die Berechnung der Porosität erhöhen. Auch sogenannte Rückhaltezone, in welchen ein Teil des Wassers länger verweilt, sind denkbar. Zudem sprechen ein steiler Anstieg bzw. Abfall und ein geringes Tailing der Uraninkurve dafür, dass das Denitrifikationsbecken allgemein schlecht durchmischt ist (Solar, 2019). Dass die Anlage nicht gleichmäßig durchströmt wird, bestätigt auch die Analyse der AKS, welche eine ungleichmäßige Verteilung des Uranins an den Messstellen aufzeigte. Zudem bekräftigt auch die unterschiedliche Gaszusammensetzung der einzelnen Probenentnahmestellen die Hypothese einer schlechten Durchmischung des Wassers in der Anlage, da ansonsten die Gaszusammensetzung für jede Probenentnahmestelle ähnlicher ausfallen müsste.

Anhand der Nitratreduktion entlang des Beckens konnte nicht ausgesagt werden, in welchem Abschnitt diese bevorzugt stattfand. Zeitweilig lief sie vorrangig im vorderen Teil, zwischen St. 1 zu St. 3, ab und teilweise bevorzugt im hinteren Teil der Anlage, zwischen St. 3 und 4 oder von St. 4 zum Ablauf. Nur im ersten Abschnitt der Anlage, vom Zulauf bis St. 1, wurde generell die geringste Nitrat-Abnahme gemessen, außer im April 2019 bei einer sehr geringen Flussrate. Interessant war zudem eine Beobachtung im Mai 2019, bei der die Nitratkonzentration an St. 4 höher ausfiel als an St. 3. Dies kann darauf hindeuten, dass bei geringen Abflussraten weniger Wasser zu St. 3 gelangt. Diese Vermutung unterstützt auch der AKS-Versuch. Die Uraninabsorption war an St. 3 von allen Probeentnahmestellen bei einer Flussrate von 0,09 l/s am geringsten. Allgemein zeigt dieses unterschiedliche Verhalten der Nitratreduktion und der Uraninabsorption entlang der Anlage, dass sich mit der Flussrate nicht nur die Verweilzeit im Becken ändern kann, sondern auch das lokale Verweilverhalten mit seinen bevorzugten Fließpfaden.

Insgesamt deutet vieles darauf hin, dass in der Anlage kein homogenes eindimensionales Fließen in Längsrichtung über den gesamten Querschnitt stattfindet. Viel mehr kann davon ausgegangen werden, dass sich in der Anlage lokal Zonen höherer Permeabilität ausgebildet haben, durch welche das Wasser bevorzugt fließt und in andere Bereiche weniger Wasser gelangt, beziehungsweise in welchen es zurückgehalten wird. Da die tatsächlich genutzte Fläche in der Anlage jedoch unbekannt ist, schließt sich daraus, dass Formel 4 (Kapitel 2.1.6) in dem vorliegenden Fall nicht so einfach angewendet werden kann.

4.1.4 Das Mikrobiom der Umweltdenitrifikationsanlage

Diese Studie zeigt zum ersten Mal die genaue mikrobielle Zusammensetzung und Interaktion von Schlüsselorganismen in einer Umweltdenitrifikationsanlage und liefert somit wichtige Erkenntnisse über die grundlegenden Stoffwechselprozesse.

Allgemein zeichnet sich eine stabile *Community* zum einen durch Resilienz aus, was die Erholungsrate einer Gemeinschaft nach einer Störung beschreibt und zum anderen durch Resistenz, was die Unempfindlichkeit einer Gemeinschaft gegen Störungen darstellt (Shade *et al.*, 2012). Die mikrobielle Zusammensetzung in der hier untersuchten Denitrifikationsanlage war grundsätzlich zu jedem Analysezeitpunkt ähnlich. Dies zeigt, dass sich eine stabile mikrobielle Gemeinschaft von Anbeginn in der Anlage behaupten konnte, deren Zusammensetzung sich nur geringfügig durch äußere Störungen (z.B. der Witterung) änderte, was eine hohe Resistenz der *Community* vermuten lässt. Zudem spielt die Domäne der Bacteria eine bedeutendere Rolle für die Anlage, als jene der Archaea, da nur ein geringer Anteil der *reads* letzteren zugeordnet werden konnte. Eine stabile mikrobielle *Community* deutet darauf hin, dass ein Ökosystem auch funktional robust ist, jedoch zeigte die Anlage zu mehreren Zeitpunkten eine beeinträchtigte Funktionalität, so dass diese Hypothese hier nicht ausnahmslos zutrifft. Jedoch muss auch bedacht werden, dass eine 16S-rRNA-Amplikon-Analyse nur aufzeigt, welche Organismen vorhanden sind, jedoch nicht, welche dazu befähigt sind, in den entscheidenden Prozessen aktiv mitzuwirken. Um diesbezüglich profundere Informationen zu erhalten, ist die durchgeführte Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse unverzichtbar. Dabei wurden der Nitrat- und Celluloseabbau näher betrachtet.

Nitratabbau

Mit Hilfe der Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse wurde festgestellt, dass sich die Schlüsselorganismen der Denitrifikation vorrangig in der planktonischen Phase der Anlage befanden und weniger im Biofilm auf den Holzhackschnitzeln. Damit wird im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal ein neuer Forschungsbereich in Umweltdenitrifikationsanlagen näher beleuchtet. Denn sowohl eine genaue Charakterisierung der Schlüsselorganismen als auch die Untersuchung der verschiedenen Phasen (planktonisch und fest) mit ihrer mikrobiellen Zusammensetzung und Funktion wurde in bisherigen Forschungsarbeiten nicht berücksichtigt. Die Ergebnisse dieser Analyse liefern daher wichtige Erkenntnisse zur mikrobiellen Aufgabenteilung in den Phasen und zur Aufdeckung möglicher Systemlimitationen.

Das vorrangige Auftreten denitrifizierender Organismen in der planktonischen Phase kann sich bei hohen Flussraten kritisch auf die Funktionalität der Anlage auswirken. Es besteht die Möglichkeit, dass die Bakterien aus der Anlage herausgespült werden, falls ihre Generationszeit nicht schnell genug ist. Dies wäre ein weiterer funktionslimitierender Faktor für die Anlage und würde die oft reduzierte Nitratentfernungsleistung in den Winter- und Frühlingsmonaten bei hohen Abflussraten erklären. Es zeigte sich aber auch, dass sich nach

kalten, abflussreichen Zeiträumen stets wieder eine Zunahme der Nitratentfernungsleistung auf bis zu 100% einstellte. Falls sich in der Anlage sogenannte Rückhaltezone gebildet haben, in denen die denitrifizierenden Mikroorganismen nicht ausgespült werden, kann die Verbesserung der Denitrifikationsleistung damit erklärt werden, dass die Mikroorganismen bei zurückgehenden Flussraten wieder in den Rest des Beckens ausgeschwemmt werden und sich erneut ansiedeln können. Zudem würde das die gleichbleibende mikrobielle Zusammensetzung über die Jahreszeiten hinweg erklären, da sich die mikrobielle Diversität so nicht grundlegend ändern würde.

Neben der Lokalisierung des Denitrifikationsprozesses in der planktonischen Phase lag ein weiterer Forschungsaspekt auf der Identifizierung der mikrobiellen Schlüsselorganismen in der Freilandanlage. In vielen Studien wurde dieser Aspekt bisher vernachlässigt oder bei der Untersuchung der mikrobiellen Zusammensetzung nur auf funktionelle Markergene bezogen (Chen *et al.*, 2013; Fatehi-Pouladi *et al.*, 2019; Warneke, Schipper, Matiasek, *et al.*, 2011). Damit kann jedoch keine Aussage getroffen werden, welche Organismen im Speziellen am Nitratabbau beteiligt sind.

Das häufigste Phylum, welches die höchste Abundanz der gesamten mikrobiellen Gemeinschaft aufwies und durch alle Sequenzierergebnisse (16S-rRNA-Amplikon und Metagenom/Metatranskriptom) bestätigt werden konnte, waren die Proteobakterien. Zudem sind deren Vertreter nicht nur am häufigsten vorhanden, sondern auch aktiv am Denitrifikationsprozess in der Freilandanlage beteiligt. Dabei wurden insbesondere Vertreter der Ordnungen Burkholderiales, Rhodospirillales, *Candidatus Accumulibacter*, Rhodocyclales und Nitrosomonadales als Schlüsselorganismen identifiziert. Bei den Burkholderiales dominierte die Gattung *Acidovorax*, *Undibacterium*, *Noviherbispirillum* und *Janthinobacterium*, welche bereits mehrfach beschrieben wurden, zur heterotrophen Denitrifikation befähigt zu sein (Heylen *et al.*, 2008; Ishii *et al.*, 2017; Nalcaci *et al.*, 2011; Saia *et al.*, 2016). Aus der Ordnung Rhodospirillales war am Denitrifikationsprozess fast ausschließlich die Gattung *Magnetospirillum* beteiligt, die vorrangig aufgrund ihrer Magnetotaxis bekannt ist (Blakemore, 1975). Allerdings hat eine Studie bei *Magnetospirillum gryphiswaldense* eine Magnetit-Biomineralisation festgestellt, welche mit einer dissimilatorischen Nitratreduktion verbunden ist. Es wurde dabei auch ein kompletter Denitrifikationsweg mit allen Denitrifikationsgenen identifiziert (Li *et al.*, 2012).

Ein weiterer Schlüsselorganismus, *Candidatus Accumulibacter*, ist als Polyphosphat-akkumulierender Organismus (PAO) bekannt, der vor allem in Kläranlagen vorkommt und zur biologischen Entfernung von Phosphat beiträgt (Hesselmann *et al.*, 1999). Es wurde

weiterhin gezeigt, dass *Ca. Accumulibacter phosphatis* die Aufnahme von Phosphat mit Nitrat oder Nitrit als Elektronenakzeptor anoxisch durchführen kann und somit zur Denitrifikation befähigt ist (Kong *et al.*, 2004). Dabei ist vor allem interessant, dass *Ca. Accumulibacter phosphatis* in zwei Kladen aufgeteilt wird, wobei der Klade II das *nar*-Gen fehlt und diese so nur Nitrit aber nicht Nitrat als Elektronenakzeptor verwenden (Martín *et al.*, 2006). Solche Organismen könnten vorteilhaft für Umweltdenitrifikationsanlagen sein, da durch sie die Wahrscheinlichkeit einer Nitritakkumulation sinken könnte. In der Tat ordnete auch die vorliegende Arbeit nur eine sehr geringe Genexpression der respiratorischen Nitratreduktase (Nar) (TPM: 0,003) *Ca. Accumulibacter* zu. Allerdings wurde fast die Hälfte der TPMs (TPM: 19) der Genexpression für die periplasmatische Nitratreduktase (Nap) mit *Ca. Accumulibacter* verknüpft. Das Vorhandensein der Nap-Reduktase und die Abwesenheit der Nar-Reduktase beobachtete bereits eine andere Studie und brachte dies mit der möglichen Entstehung einer DNRA durch diesen Organismus in Verbindung (Camejo *et al.*, 2019). Dass dieser Organismus zur DNRA befähigt ist, wurde jedoch bisher nicht näher untersucht und auch die Metatranskriptom-Analyse der vorliegenden Arbeit stellte keine Genexpression von *nrf*-Genen durch *Ca. Accumulibacter* fest.

Die am Denitrifikationsprozess beteiligten Vertreter der Rhodocyclales konnten meist nur bis auf die Familie Rhodocyclaceae bestimmt werden, jedoch ist auch diese bekannt dafür, denitrifizierende Mikroorganismen zu enthalten (Adav *et al.*, 2010). Zudem wurde in Belebtschlammproben via *stable isotope probing* gezeigt, dass einige Vertreter dieser Familie acetatabbauende Denitrifizierer sind (Ginige *et al.*, 2005). Dies trifft im Übrigen auch für die anderen denitrifizierenden Schlüsselorganismen der Ordnungen Burkholderiales, Rhodospirillales und *Ca. Accumulibacter* zu, wie anhand der Metagenom- und Metatranskriptom-Analyse festgestellt wurde. Für die Ordnung Rhodocyclales konnte die vorliegende Arbeit zwar keine hohe Genexpression acetatabbauender Enzyme feststellen, was jedoch nicht vollständig ausschließt, dass auch von diesen Organismen Acetat verwendet wird. Denn insgesamt fiel die Genexpression auch für alle anderen untersuchten Enzyme des Kohlenstoffabbaus bei dieser Ordnung gering aus. Da es jedoch so aussieht, als ob Vertreter dieser Ordnung den Citrat-Zyklus verwenden (Tabelle 21), kann Acetat als Substrat durchaus möglich sein.

Das Ergebnis, dass viele der denitrifizierenden Schlüsselorganismen Acetat als C-Substrat und somit Fermentations-Endprodukte verwenden, zeigt, dass diese Organismen mit fermentierenden Organismen nicht um Glucose, das Endprodukt des Celluloseabbaus konkurrieren. Somit geht mit dem Nitrat- sowie dem Holzsubstratabbau ein komplexes

Zusammenspiel mehrerer unterschiedlicher Organismen einher, die gegenseitig auf ihre Stoffwechselprodukte angewiesen sind.

Auch die Ordnung Nitrosomonadales beinhaltet Schlüsselorganismen, bei denen eine Verwendung von Acetat als Elektronendonator nicht festgestellt werden konnte. Die Genexpression aller untersuchten - am Kohlenstoffabbau beteiligten - Enzyme fiel gering aus (Tabelle 21). Ein Großteil der hoch exprimierten Denitrifikationsgene konnte der Gattung *Sulfuritalea* und hier insbesondere *Sulfuritalea hydrogenovorans*, sowie der Gattung *Sideroxydans* zugeordnet werden. *Sulfuritalea hydrogenovorans* wird als autotrophes Bakterium beschrieben, das mit der Oxidation von Thiosulfat, elementarem Schwefel und Wasserstoff wachsen kann und Nitrat als Elektronenakzeptor verwendet (Kojima & Fukui, 2011). Daher ist denkbar, dass diese Organismen auch in der hier untersuchten Denitrifikationsanlage diesen Stoffwechselprozess katalysieren. Bekräftigend wirkt, dass die Genexpression von am Pyruvatabbau und Citrat-Zyklus beteiligten Enzymen bei der Ordnung Nitrosomonadales gering ausfiel (Tabelle 21). Das unterstreicht die Möglichkeit eines lithotrophen Lebensstils. So ist auch *Sideroxydans lithotrophicus* als lithoautotrophes Fe(II)-oxidierendes Bakterium beschrieben (Emerson & Moyer, 1997) und exprimierte in der vorliegenden Arbeit vorrangig das *nirS*-Gen innerhalb der Ordnung Nitrosomonadales, was eine Beteiligung dieses Organismus an der Nitritentfernung möglich macht. So könnte dieser Organismus im Speziellen an einer Nitritreduktion gekoppelten Eisen(II)-Oxidation beteiligt sein. Das Vorhandensein einer Nitritreduktase wurde bereits in einer anderen Studie beobachtet, allerdings wurde über eine nitritabhängige Fe(II)-Oxidation für diesen Organismus im Speziellen noch nicht berichtet (Jewell *et al.*, 2016). Jedoch wurde in einer Anreicherungskultur eine Fe(II)-Oxidation mit Nitrat für Mitglieder dieser Gattung abgeleitet (Blöthe & Roden, 2009). Auch in der vorliegenden Arbeit ist die Anwesenheit metalloxidierender Organismen durchaus möglich, da in der unmittelbaren Umgebung der Denitrifikationsanlage häufig irisierende dünne Häutchen von Eisenoxiden, die einem „Ölfilm“ ähnelten, an der Moorwasseroberfläche festgestellt werden konnten (Fuchs *et al.*, 2014).

Celluloseabbau

Mikrobielle Analysen von Umweltdenitrifikationsanlagen setzten den Fokus bisher vorrangig auf die Untersuchung des Denitrifikationsprozesses. Da jedoch die heterotrophe Denitrifikation bei der Behandlung nitratreichem Abwassers in Anlagen mit einer organischen Kohlenstoffquelle eine führende Rolle spielt, ist auch die Betrachtung der Hydrolyse des Kohlenstoffsubstrats und somit die Bereitstellung leichter verwertbarer Stoffe

ein bedeutender Aspekt (Ghafari *et al.*, 2008). Dieser wurde in der vorliegenden Arbeit eingehender untersucht und stellt somit ein weiteres Forschungsfeld von Umweltdenitrifikationsanlagen dar, in welchem bisher nur wenige Erkenntnisse vorliegen. Der Celluloseabbau ist räumlich vom Denitrifikationsprozess getrennt, da für ersteren eine höhere Genexpression entsprechender Enzyme in der Biofilmphase auf den Holzhackschnitzeln gefunden wurde. Lediglich für ein Enzym (Arabinofuranosidase) konnte eine erhöhte Genexpression in der planktonischen Phase bestimmt werden, welches der Ordnung Synechococcales (Cyanobakterien) zugeordnet wird. Da diese Ordnung weder in der 16S-rRNA-Amplikon-Analyse noch in der taxonomischen Auswertung des Metagenoms festgestellt werden konnte und auch nicht dafür bekannt ist, eine wesentliche Rolle beim Hemicelluloseabbau zu spielen, handelt es sich hierbei vermutlich um einen Analysefehler.

Neben der räumlichen Trennung des Celluloseabbaus vom Denitrifikationsprozesses gab es auch Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung bei den beiden Prozessen. Während die Fähigkeit zur Denitrifikation eindeutig dem Phylum der Proteobakterien zugeschrieben wurde, ist die Zusammensetzung an (hemi-)celluloseabbauenden Mikroorganismen diverser. So spielen hier auch Pilze eine bedeutende Rolle, die für ihre Beteiligung am Celluloseabbau im anoxischem Milieu bekannt sind (Gupta *et al.*, 2012; Leschine, 1995). Eine Untersuchungen zur anaeroben Zersetzung von Pappelholz zeigte hingegen, dass Pilze, im Vergleich zu Bakterien, eher eine untergeordnete Rolle spielten (van der Lelie *et al.*, 2012). In der vorliegenden Arbeit konnte dies jedoch nicht festgestellt werden, da hier Bakterien und Pilze zu annähernd gleichen Teilen am Holzabbau beteiligt waren. So stammten (hemi-)celluloseabbauende Vertreter der Pilze, aus der Klasse Sordariomycetes und Leotiomycetes (Abteilung: Ascomycota) sowie aus den Agaricomycetes (Abteilung: Basidiomycota). Die Genexpression für die entsprechenden Enzyme fiel allgemein bei den Ascomycota höher aus als bei den Basidiomycota. Dies widerspricht Untersuchungen, die zum Beispiel eine höhere Abbaufähigkeit von subalpinen Blattstreu bei den Basidiomycota feststellten (Osono & Takeda, 2008). Jedoch ist allgemein die Fähigkeit des aeroben Celluloseabbaus unter den Ascomycota und Basidiomycota weit verbreitet, während ihre Beteiligung unter anoxischen Bedingungen noch weniger erforscht ist (De Boer *et al.*, 2005). Bekannte anaerobe Celluloseabbauer in der Domäne der Pilze, wie die Chytridomycetes, wurden in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden (Lynd *et al.*, 2002). Da die Genexpression von Laccasen bei der Probenentnahme in dem hier untersuchten System jedoch gering ausfiel, kann davon ausgegangen werden, dass weitestgehend anoxische Verhältnisse herrschten und so eine Beteiligung der Ascomycota und Basidiomycota am anaeroben Holzabbau nicht auszuschließen ist. Allgemein repräsentieren

zum Beispiel die Sordariomycetes eine der größten Klassen der Ascomycota. Diese umfasst ein sehr diverses Spektrum verschiedener Arten, inklusive vieler Pflanzenpathogene, die auch zum Celluloseabbau befähigt sind (Maharachchikumbura *et al.*, 2016).

(Hemi-)celluloseabbauende Bakterien wurden in der vorliegenden Untersuchung in verschiedenen Phyla gefunden, vorrangig bei den Proteobakterien, Actinobakterien, Bacteroidetes und Verrucomicrobia. Deren Beteiligung beim anaeroben Celluloseabbau konnte auch bereits in anderen Studien festgestellt werden (van der Lelie *et al.*, 2012; Schwarz, 2001; Vanwonterghem *et al.*, 2016). Ordnungen mit Vertretern, welche die höchste Expression für cellulolytische und hemicellulolytische Enzyme zeigten, waren die Rhizobiales und Chthoniobacterales. Vor allem über letztere Ordnung ist allgemein noch wenig bekannt, da das Phylum der Verrucomicrobia, zu welchem diese Ordnung gehört, noch nicht allzu lange bekannt ist. Zudem gibt es trotz ihrer phylogenetischen Breite nur wenige kultivierte Vertreter (Spring *et al.*, 2016). Die Ordnung Rhizobiales hingegen ist intensiv untersucht worden und vor allem für ihre Fähigkeit zur N₂-Fixierung und ihre Symbiose mit Pflanzen bekannt (Palacios & Newton, 2005). Zudem ist bei der Gattung *Rhizobium* das *celC* Gen bekannt, welches für eine Endoglukanase kodiert, die jedoch nicht am Celluloseabbau, sondern an der Cellulose-Synthese beteiligt ist (Robledo *et al.*, 2012). Allerdings konnte bei Vertretern der Rhizobiales auch die Anwesenheit verschiedener Glukosidasen festgestellt werden und bei manchen Gattungen (*Rhizobium*) auch die Fähigkeit zum Abbau von Carboxymethylcellulose (Berthelot & Delmotte, 1999; Mateos *et al.*, 1992). Ob diese auch unter anoxischen Bedingungen aktiv sind, ist hingegen noch wenig erforscht.

Eine Beteiligung bekannter bakterieller anaerober Celluloseabbauer wurde in der vorliegenden Arbeit hingegen wenig beobachtet. Die Genexpression der (hemi-)celluloseabbauenden Enzyme, die dem Phylum Firmicutes und vor allem der Ordnung Clostridiales zugeordnet werden konnte, fiel überraschend gering aus (TPM: 0,06). Organismen dieser Ordnung spielen somit bei der Holzzersetzung in dieser Denitrifikationsanlage keine wichtige Rolle, obwohl sie in anderen Ökosystemen bereits mehrfach als anaerobe Celluloseabbauer beschrieben wurden (van der Lelie *et al.*, 2012; Leschine, 1995; Lynd *et al.*, 2002; Schwarz, 2001). Ähnliches konnte auch für die Gattung *Fibrobacter*, der eine wichtige cellulolytische Funktion im Pansen einnimmt und Vertretern der Actinomycetales, die für verschiedene Funktionen am Abbau organischer Substanzen bekannt sind, gezeigt werden (Kobayashi *et al.*, 2008; Küster, 1979). Auch die Ordnung Bacteroidales mit der Gattung *Bacteroides*, welchen teilweise eine cellulolytische Funktion zugeschrieben wird, zeigten beim Celluloseabbau in der vorliegenden Arbeit keine Aktivität

(Robert *et al.*, 2007). Bekannte anaerobe Celluloseabbauer sind somit bei der anaeroben Zersetzung des Holzmaterials in dieser Denitrifikationsanlage unbedeutend.

Insgesamt zeigte die Analyse der Schlüsselorganismen, dass die Umweltdenitrifikationsanlage ein komplexes mikrobielles Ökosystem beherbergt. Schlüsselfunktionen für die Funktionalität dieser Anlagen können nicht einzelnen Phyla und gar einzelnen Ordnungen oder Gattungen alleine zugeschrieben werden, da immer mehrere Mikroorganismen beteiligt sind. So zersetzt eine Vielfalt an Mikroorganismen das Holzsubstrat, dessen Endprodukt (Glukose) weiter verstoffwechselt wird, bevor es von Denitrifizierern, vorrangig Proteobakterien, zur Nitratreduktion verwendet wird.

4.2 Laboruntersuchungen

Umwelddenitrifikationsanlagen im Labormaßstab ermöglichen es, zusätzliche Erkenntnisse zur Funktionalität von Freilandanlagen zu erlangen. Insbesondere die Möglichkeit, einzelne Fragestellungen unter kontrollierten Bedingungen zu untersuchen, trägt zum besseren Verständnis etwaiger Limitationen und somit zur Optimierung solcher Anlagen bei. In dieser Arbeit sollten vorrangig zwei Fragestellungen geklärt werden, die im Folgenden diskutiert werden.

4.2.1 DNRA in Holzhackschnitzel-Reaktoren

Mit den entwickelten Labor-Reaktoren sollte zum einen die Nitratreduktionsleistung nach Zugabe verschieden hoher Nitratkonzentrationen getestet werden und zum anderen sollte das Einsetzen einer Ammoniumproduktion nach Zugabe hoher Nitratmengen reproduziert werden. Die Zugabe hoher Nitratkonzentrationen sollte einen Stresstest für solche Denitrifikationssysteme repräsentieren und die Nitratentfernungskapazität bei verschiedenen Nitratkonzentrationen demonstrieren. Die Nitratreduktionsleistung war wieder, wie bereits in der vorangegangenen Untersuchung (Kapitel 1.7), stabil und kontinuierlich für moderate und höhere Nitratkonzentrationen. So lag die maximale Nitratentfernungsrates nach der Zugabe der fünffachen Nitratmenge bei $0,82 \text{ mmol NO}_3^- \text{ l}^{-1} \text{ d}^{-1}$, was umgerechnet $11,5 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ entspricht. Diese maximale Nitratentfernungsrates zeigt eine gute Übereinstimmung mit jener der Freiland-Denitrifikationsanlage in der Vulkaneifel: $7,88$ bzw. $12,1 \text{ g NO}_3\text{-N m}^{-3} \text{ d}^{-1}$ für die gemessene bzw. simulierte Flussrate (siehe Kapitel 4.1.1).

Höhere Nitratkonzentrationen von mehr als 11 mmol/l stellten jedoch eine Herausforderung für die Laborreaktoren dar, da eine einsetzende Ammoniumproduktion beobachtet und somit reproduziert werden konnte. Die Ergebnisse der Metatranskriptom-Analyse bestätigten die Hypothese, dass eine Verschiebung von Denitrifikation zu DNRA bei höheren Nitratkonzentrationen stattfand. Diese Beobachtung wird nicht durch das allgemeine Lehrbuchwissen gestützt, welches davon ausgeht, dass eine DNRA von einem hohen $C_{\text{org}}/\text{NO}_3^-$ -Verhältnis gefördert wird (Rütting *et al.*, 2011; Tiedje, 1988). In der vorliegenden Arbeit scheinen vor allem Mitglieder der Ordnung Ignavibacteriales Schlüsselorganismen bei der beobachteten Verschiebung der Denitrifikation hin zur DNRA zu sein. Auch bioinformatische Daten aus dem verfügbaren Genom von *I. album* deuten darauf hin, dass dieser Organismus den zweiten Schritt der DNRA, nämlich die Reduktion von Nitrit zu Ammonium katalysieren kann, da er einen NrfAH Komplex besitzt. Dieser Organismus ist jedoch nicht in der Lage, Nitrat in Nitrit umzuwandeln. Dennoch enthält das Genom von *I.*

album auch Gene für eine NO- und N₂O- Reduktase, was darauf hindeutet, dass dieser Organismus auch am Denitrifikationsprozess teilnehmen kann (Liu *et al.*, 2012). Derzeit ist noch unbekannt, unter welchen Bedingungen *I. album* den Weg der Ammoniumproduktion wählt und wann es die Reduktion von NO zu N₂O und schlussendlich zu N₂ katalysiert. Dennoch ist *Ignavibacterium* auf andere nitratreduzierende Organismen angewiesen, welche den ersten Schritt der Nitratreduktion katalysieren.

Die hohe mikrobielle Diversität in den Laborreaktoren zeigt, dass ein komplexes Netzwerk an Organismen am Nitratreduktionsprozess beteiligt sind. So sind einige Organismen, wie *Ignavibacterium*, nur an einigen Schritten der Denitrifikation oder des DNRA-Prozesses involviert, während andere Organismen wie zum Beispiel Mitglieder der Ordnung Pseudomonadales und Rhodocyclales alle am Denitrifikationsprozess beteiligten Gene besitzen und exprimieren. Dennoch scheinen Mitglieder der Pseudomonadales in den Laborreaktoren eine relevante Rolle im Denitrifikationsprozess bei niedrigen Nitratkonzentrationen zu spielen, während Rhodocyclales und Rhizobiales bei höheren Nitratkonzentrationen dominieren (Grießmeier *et al.*, 2017).

Neben dem Einfluss höherer Nitratkonzentrationen auf die Ammoniumproduktion konnte in der vorliegenden Arbeit auch gezeigt werden, dass der Celluloseabbau durch höhere Nitratkonzentrationen positiv beeinflusst wurde. Dies bestätigten die erhöhten TPM Werte für Gene, die celluloseabbauende Enzyme kodieren. Insbesondere celluloseabbauende Bakterien, die zu den Clostridiales, Actinomycetales und Bacteroidetes gehören, scheinen über einen bisher unbekanntem Mechanismus von höheren Nitratkonzentrationen zu profitieren. Dies könnte eine positive Feedbackwirkung auf nitratabbauende Organismen haben, die typischerweise Fermentationsendprodukte weiter verstoffwechseln. Weiterhin konnten die hier beschriebenen metatranskriptomischen Ergebnisse durch eine Studie von Berlemont und Martiny (2013) bestätigt werden. Die Autoren bezeichnen Organismen, die nur die β -Glukosidasen exprimieren als potentielle Opportunisten, da diese nur die Cellobiose verstoffwechseln können und auf weitere Organismen angewiesen sind, die den ersten Schritt der Cellulosehydrolyse katalysieren. So fand sich in dem Phylum der Bacteroidetes ein höherer Anteil an potentiellen Opportunisten, während potentielle Celluloseabbauer im Phylum der Proteobakterien, Actinobakterien und Firmicutes identifiziert wurden (Berlemont & Martiny, 2013). Diese Beobachtung konnte auch in dieser Arbeit gemacht werden, wo hauptsächlich Vertreter der Bacteroidetes die β -Glukosidase produzierten, während Actinobakterien und Proteobakterien die Hauptproduzenten von Enzymen sind, die die anfängliche Depolymerisation von Cellulose katalysieren.

Mit dieser Analyse konnten, neben den Grundlagen des Nitrateliminierungsprozesses in Denitrifikationsanlagen, auch neue Facetten bezüglich des Stickstoffkreislaufes und dessen Zusammenspiel mit dem Kohlenstoffkreislauf aufgezeigt werden. Dies kann auch für viele weitere Ökosysteme – neben Umweltdenitrifikationsanlagen – von Bedeutung sein (Grießmeier *et al.*, 2017).

4.2.2 Inhibierung methanogener Organismen durch Holzpellets

Die Versuche der Ko-Kultur mit methanogenen Modellorganismen und Holzpellets zeigten eindeutig, dass methanogene Organismen durch dieses Kohlenstoffsubstrat inhibiert werden und die Beobachtung in den Holzpellet-Reaktoren der vorangegangenen Studie keine Ausnahme darstellte (Grießmeier & Gescher, 2018). Die zufällige Auswahl der methanogenen Modellorganismen, die nicht notwendigerweise mit jenen in den Laborreaktoren überstimmen, verdeutlicht zudem, dass Holzpellets generell eine beeinträchtigende Wirkung auf die Aktivität vieler methanogener Organismen haben. Nicht vollständig konnte bisher geklärt werden, was der Grund für diese Inhibierung ist. Eine pH-Wert-Senkung auf unter 6,4 als entscheidender Parameter stellt durchaus eine plausible Erklärung dar. Dass sich dies negativ auf die Aktivität vieler methanogener Organismen auswirkt, bestätigen auch unterschiedliche Studien (Filipe & Grady, 1998; van Kessel & Russell, 1996; Ye *et al.*, 2012). Allerdings konnte eine signifikante pH-Wert-Senkung nur einmal beobachtet werden. In den anderen Versuchen sank der pH-Wert hingegen nur geringfügig, obwohl das gleiche Medium mit dem gleichen Puffer verwendet wurde.

Da laut Hersteller keine Bindemittel oder Ähnliches verwendet wurde und es sich bei den Holzpellets schlicht um gepresstes Holz handelt, stellt sich die Frage, warum die Holzpellets im Vergleich zu den Holzhackschnitzeln den pH-Wert absenken können. Eine Möglichkeit wäre der Kiefernholzanteil in den Holzpellets. Manche Nadelholzarten können den pH-Wert des Bodens senken, was in Zusammenhang mit dem geringeren Calciumgehalt in den Blättern gebracht wird (Reich *et al.*, 2005). Der hier durchgeführte abiotische Versuch mit den verwendeten Weich- und Hartholz-Pellets ergab allerdings keinen deutlichen Abfall des pH-Werts und keinen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Holzpelletarten. Auch beim zweiten Versuch fiel der pH-Wert nur auf 6,6 ab. In diesem Bereich kann eine angemessene Aktivität der methanogenen Organismen aufrecht erhalten werden (Filipe & Grady, 1998).

Da hier gegen Ende des Versuchszeitraumes trotz des stabilen pH-Werts eine abnehmende Methanproduktion beobachtet wurde, ist es möglich, dass noch weitere Faktoren eine Rolle

bei der Inhibierung gespielt haben. Da auch die Sterilisation der Holzpellets und Holzhackschnitzel nicht erfolgreich war, ist eine biotische inhibitorische Einflussnahme anderer Organismen, welche sich auf den Holzpellets befinden, nicht ausgeschlossen. Durch das im Medium vorhandene Sulfat, könnten beispielsweise Sulfatreduzierer methanogene Organismen verdrängen, da sie um dieselben Substrate (Acetat und H_2) konkurrieren. Thermodynamisch betrachtet können sulfatreduzierende Organismen jedoch geringere Konzentrationen der Ausgangssubstrate nutzen, und lenken somit den Elektronenfluss in Richtung Sulfatreduktion (Lovley *et al.*, 1982; Lovley & Klug, 1983; Mountfort *et al.*, 1980). Eine mikrobielle Diversitätsanalyse der Holzpellets und Holzhackschnitzel würde weitere Erkenntnisse bringen, da dann feststellbar wäre, welche Mikroorganismen auf dem jeweiligen Substrat vorhanden sind und potentiell inhibierend wirken.

Eine durch die C-Quelle verursachte Inhibierung von methanogenen Organismen in Umweltdenitrifikationsanlagen wurde bisher noch nicht nachgewiesen. Die Aufklärung des inhibierenden Faktors hat allerdings großes Potential für Umweltdenitrifikationsanlagen, da so ein Schadstoffaustausch von Nitrat zu Methan verhindert und die Nachhaltigkeit und Umweltverträglichkeit dieser Anlagen deutlich gesteigert werden könnte.

4.3 Mikrobieller Vergleich der Labor- und Freiland-Umweltdenitrifikationsanlage

Um Laborreaktoren mit Freilandanlagen besser vergleichen und die Untersuchungsergebnisse transferieren zu können, ist die Betrachtung des Mikrobioms entscheidend, da die wesentlichen Stoffwechselprozesse durch die Mikroorganismen gelenkt werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Schlüsselorganismen der Denitrifikation sowohl in der Umweltdenitrifikationsanlage im Freiland als auch bei den Laborreaktoren maßgeblich Mitgliedern des Phylums der Proteobakterien zugeordnet. Beim Vergleich beider Reaktoren gab es auch bezüglich der Ordnungen einige Übereinstimmungen (Burkholderiales, Rhodospirillales und Rhodocyclales). Bei der Freilandanalyse kam allerdings den Ordnungen Burkholderiales und Rhodospirillales eine größere Bedeutung zu, während die Ordnungen Rhodocyclales und Rhizobiales im Labor eine wichtigere Rolle spielten. Zum Zeitpunkt der Probenentnahme bei der Freilandanlage war die Ordnung Rhizobiales stark unterrepräsentiert, während sie bei anderen Analysezeitpunkten der 16S-rRNA-Amplikon-Sequenzierung eine hohe Abundanz aufwies. Daher ist es möglich, dass Vertretern dieser Ordnung unter anderen Umständen auch im Freiland mehr Bedeutung zukommt und ihre Beteiligung auf Grund des Zeitpunkts der Probeentnahme unterschätzt wurde. Weiterhin gab

es auch Ordnungen wie die Nitrosomonadales und *Ca. Accumulibacter*, die im Labor nicht detektiert werden konnten, im Freiland jedoch vorhanden waren und denen eine Schlüsselfunktion im Denitrifikationsprozess zugeschrieben wurde. Im Gegensatz dazu kam Vertretern der Ordnung Pseudomonadales bei niedrigen Nitratkonzentrationen im Labor eine Schlüsselfunktion zu, während diese im Freiland mengenmäßig unterrepräsentiert waren und auch deren Beitrag zum Denitrifikationsprozess sehr gering ausfiel.

Die Expression von Genen, die am DNRA-Prozesses beteiligt waren (*nrf*) fiel in der Freilandanlage gering aus (TPM: 1,75), da dieser Prozess eine untergeordnete Rolle spielte. Bei genauerer phylogenetischer Betrachtung dieser Genexpression konnten jedoch 5,9% der TPM den Ignavibacteria zugeordnet werden. Vertreter dieses Phylums waren in den Laborreaktoren wesentlich an der Verschiebung von Denitrifikation zu DNRA unter hohen Nitratkonzentrationen beteiligt. Ein Vorhandensein und eine geringe Aktivität dieser Bakterien in den Freilandanlagen zeigt somit, dass die Entstehung einer DNRA unter sehr hohen Nitratkonzentrationen nicht komplett ausgeschlossen werden kann.

Die mikrobiellen Übereinstimmungen bezüglich des Nitratabbaus zwischen den Laborreaktoren und der Freilandanlage lassen vermuten, dass diesen Ordnungen nicht nur in der vorliegend untersuchten Denitrifikationsanlage eine Schlüsselfunktion zukommt, sondern sie auch in anderen Anlagen dieser Art einen wesentlichen Beitrag beim Nitratabbau leisten können.

Bezüglich der mikrobiellen Hydrolyse des Holzsubstrats zeigten sich einige Unterschiede in der mikrobiellen Zusammensetzung, was unter anderem mit der unterschiedlichen Holzart (Freiland: Buche, Labor: Pappel) der verwendeten Holzhackschnitzel zusammenhängen kann. Während in der Laboranalyse eine höhere Beteiligung bekannter Celluloseabbauer aus der Ordnung Clostridiales und Actinomycetales vorlag, war deren Aktivität in der Freilandanlage sehr gering bzw. nicht vorhanden. Auch die Genexpression von celluloseabbauenden Enzymen durch Vertreter der Pilze fiel in den Laboranalysen signifikant geringer aus als in der Freilanduntersuchung. Hierbei muss jedoch bedacht werden, dass für die Laborreaktoren keine zusätzliche Metagenom-Analyse durchgeführt wurde. Die Ergebnisse stützen sich allein auf die Metatranskriptom-Sequenzierung. Daher gestaltet sich eine tiefere phylogenetische Zuordnung schwieriger. Aufgrund einiger fehlender Klassifizierungen kann somit die Beteiligung von Pilzen am Celluloseabbau im Laborversuch auch unterschätzt worden sein.

Neben Unterschieden konnten jedoch auch Gemeinsamkeiten beim mikrobiellen Substratabbau gefunden werden. So konnte eine Beteiligung von Vertretern der Proteobakterien an der Hydrolyse der Cellulose in beiden Reaktoren festgestellt werden, auch wenn diese in der Laboranalyse meist phylogenetisch nicht genauer bestimmt werden konnten. Die gesamte Genexpression von Exoglukanasen in der Festphase fiel in beiden Laborreaktoren vergleichsweise gering aus (TPM Freiland: 0,26, TPM, Labor: 0,13 bis 1,17). Das ist überraschend, da dieses Enzym für die Bereitstellung von Cellobiose verantwortlich ist und somit das Ausgangssubstrat für die β -Glukosidase bildet, deren Genexpression in beiden Untersuchungen deutlich höher lag. Allerdings ist zu bedenken, dass es eine Vielzahl an GH-Familien gibt, für die mehrere am Celluloseabbau beteiligte Enzymaktivitäten beschrieben sind, beispielsweise GH5 oder GH48. Daher ist eine Trennung der Enzymfunktionen, die an den einzelnen Schritten am Celluloseabbau beteiligt sind, nicht immer möglich. So ist es denkbar, dass mehr Enzyme mit einer Exoglukanasen-Aktivität vorhanden waren, als mit Hilfe der Metatranskriptom-Analyse zugeordnet wurden. Bezüglich der Genexpression von β -Glukosidase gab es weitere Übereinstimmungen zwischen Labor- und Freilanduntersuchung. In beiden Fällen exprimierten Vertreter der Bacteroidetes vorrangig nur dieses Enzym, womit sie als opportunistische Celluloseabbauer angesehen werden können, die zur Hydrolyse des Cellulosemoleküls nur geringfügig beitragen (Berlemont & Martiny, 2013).

4.4 Zukünftige Schritte zur Optimierung von Umweltdenitrifikationsanlagen

Die Untersuchung der Freilandanlage in der Vulkaneifel bestätigte, dass diese in Mitteleuropa funktional betrieben und zum Nitratabbau eingesetzt werden kann. Eine optimale Funktionalität ist jedoch nicht unter jeder Bedingung gegeben und somit besteht noch Optimierungspotential.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass zwei Prozessparameter - Temperatur und Flussrate - entscheidend für die Anlageneffizienz sind. Die Flussrate schwankte im Analysezeitraum stark und ist witterungsbedingt schwer kontrollierbar. Der Bau eines Vorbeckens vor dem Zulauf könnte negative Einflüsse durch sehr hohe oder geringe Flussraten kontrollierbarer gestalten. Ein gedrosselter Zulauf aus einem Vorbecken erlaubt ein gleichmäßigeres Einströmen des Wassers und Trockenperioden könnten verkürzt und so das Risiko einer potentiellen Methanemission reduziert werden. Zugleich sinkt die Wahrscheinlichkeit einer unvollständigen Denitrifikation und der damit verbundenen Nitritakkumulation, insbesondere, wenn eine dauerhaft geringe Flussrate von unter 0,2 l/s

eingestellt wird. Durch einen regelbaren, kontrollierten Zufluss könnte zudem überprüft werden, ab welchem Schwellenwert unerwünschte Nebenprodukte entstehen. Eine derartige Konstruktion würde zwar den Aufbau von Umwelddenitrifikationsanlagen komplexer gestalten, gleichzeitig jedoch die Anlagen kontrollierbarer machen und somit die Umweltverträglichkeit erhöhen.

Ein weiterer möglicher einflussnehmender Prozessparameter von Umwelddenitrifikationsanlage ist die Wassertemperatur. Da die äußeren Witterungsbedingungen nicht beeinflusst werden können, bleibt nur die Möglichkeit, die Aufenthaltszeit im Becken zu verlängern, um eine erfolgreiche Nitratentfernung bei niedrigen Wassertemperaturen zu gewährleisten. Auch dies könnte mit einem Vorbecken und einem kontrollierten Zulauf bewerkstelligt werden (Woli *et al.*, 2010).

Eine weitere Optimierung der Anlage könnte durch den Einsatz von Starterkulturen erreicht werden, beispielsweise durch die Zugabe von rein Nitrit-reduzierenden Mikroorganismen, um die Nitritakkumulation einzudämmen. Gleichzeitig könnte mit dem Einsatz solcher Starterkulturen getestet werden, ob sich diese in der Anlage etablieren und die Denitrifikationsleistung auf längere Sicht steigern, bzw. auch bei wechselnden äußeren Einflüssen stabilisieren können.

Wie der Laborversuch mit den Holzpellets gezeigt hat, könnte sich neben Holzhackschnitzeln die zusätzliche Verwendung dieser Kohlenstoffquelle als vorteilhaft erweisen. Methanogene Organismen werden durch dieses Substrat gehemmt und so könnte die Methanemission in trockenen Monaten reduziert werden. In einem Laborversuch könnte mit einer Mischung aus Holzhackschnitzeln und Holzpellets getestet werden, ob die Methanproduktion tatsächlich verringert und gleichzeitig eine stabile Denitrifikationsleistung aufrechterhalten werden kann. Weiterhin haben viele methanogene Organismen nur ein sehr begrenztes pH-Wert-Optimum, in welchem sie aktiv sind. Gegenüber zu niedrigen bzw. zu hohen pH-Werten reagieren sie empfindlich. Der Einsatz dieser Anlagen in Gebieten mit einem pH-Wert des Wassers von unter 6,5 oder über 7,8 würde deren Umweltverträglichkeit steigern, indem die Aktivität methanogener Organismen gesenkt wird. Da das pH-Optimum für Denitrifizierer bei 6 bis 8 liegt, sollte der pH-Wert des Wassers jedoch diese Grenzwerte auch nicht signifikant über- oder unterschreiten, damit die Denitrifikation weiterhin ungehindert ablaufen kann (Filipe & Grady, 1998; Gisi, 1997).

Diese Arbeit zeigt zudem, dass die Vermutung naheliegt, dass die untersuchte Denitrifikationsanlage nur ungleichmäßig durchmischt ist. Somit ist das Anlagenpotential vermutlich nicht vollständig ausgeschöpft. Insbesondere bei hohen Flussraten und hohen Nitratkonzentrationen ist eine effizientere Ausnutzung der Anlage maßgeblich, um die

Funktionalität und Effizienz hochzuhalten. Eine gleichmäßigere Durchmischung der Anlage könnte durch die Einbringung von Schwellen bzw. Balken in den Beckenboden erreicht werden. Das Wasser würde dann mäanderförmig durch das Becken fließen und die Wahrscheinlichkeit der Ausprägung unidirektionaler Fließkanäle verringert werden. Da sich denitrifizierende Mikroorganismen vorrangig in der planktonischen Phase befanden, könnte sich dies zusätzlich positiv auf die Kultivierung dieser Organismen auswirken. Ein vorzeitiges Auswaschen dieser Organismen durch eine bessere räumliche Nutzung der Anlage würde somit verhindert werden.

Insgesamt gibt die vorliegende Arbeit einen tiefgreifenden Einblick in die mikrobiellen Strukturen von Umweltdenitrifikationsanlagen und erhöht so das Verständnis der Abläufe und Wechselwirkungen. Da diese Anlagen noch eine relativ junge Technologie darstellen und langfristig autark eingesetzt werden sollen, ist es von großer Bedeutung, weiterhin langfristige Forschungsarbeiten durchzuführen. Dabei muss grundlegendes Wissen der hier identifizierten Einflussfaktoren erarbeitet, validiert und in den Anlagen implementiert werden. Nur so ist es möglich, deren Leistungsfähigkeit zu optimieren und gleichzeitig die Emissionen umweltwirksamer Nebenprodukte zu senken. Weitere Forschungsaktivitäten in unterschiedlichen Klimazonen und an verschiedenen Standorten wären wünschenswert, um die weitere Datenbasis bezüglich der Leistungsfähigkeit, Entstehung von Nebenprodukte und Mikrobiologie zu vergrößern und so insbesondere die mikrobiologischen Ergebnisse der vorliegenden Arbeit besser einordnen zu können. Nur so haben diese Anlagen das Potential, langfristig, zuverlässig, leistungsstark, autark und umweltverträglich eingesetzt zu werden und einen signifikanten Beitrag zur Bekämpfung des akuten Nitratproblems in der Umwelt zu leisten.

Literaturverzeichnis

- Adav, S. S., Lee, D. J. & Lai, J. Y. (2010). Microbial community of acetate utilizing denitrifiers in aerobic granules. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), 753–762.
- Addy, K., Gold, A. J., Christianson, L. E., David, M. B., Schipper, L. A. & Ratigan, N. A. (2016). Denitrifying Bioreactors for Nitrate Removal: A Meta-Analysis. *Journal of Environment Quality*, 45(3), 873–81.
- Álvarez, C., Reyes-Sosa, F. M. & Díez, B. (2016). Enzymatic hydrolysis of biomass from wood. *Microbial Biotechnology*, 9(2), 149–156.
- Andalib, M., Nakhla, G., McIntee, E. & Zhu, J. (2011). Simultaneous denitrification and methanogenesis (SDM): Review of two decades of research. *Desalination*, 279(1–3), 1–14.
- Bednarek, A., Stolarska, M., Ubraniak, M. & Zalewski, M. (2010). Application of permeable reactive barrier for reduction of nitrogen load in the agricultural areas - preliminary results. *Ecology and Hydrobiology*, 10(2–4), 355–362.
- Bengtsson-Palme, J., Hartmann, M., Eriksson, K. M., Pal, C., Thorell, K., Larsson, D. G. J. *et al.* (2015). metaxa2: Improved identification and taxonomic classification of small and large subunit rRNA in metagenomic data. *Molecular Ecology Resources*, 15(6), 1403–1414.
- Bengtsson-Palme, J., Richardson, R. T., Meola, M., Wurzbacher, C., Tremblay, É. D., Thorell, K. *et al.* (2018). Metaxa2 database builder: Enabling taxonomic identification from metagenomic or metabarcoding data using any genetic marker. *Bioinformatics*, 34(23), 4027–4033.
- Berlemont, R. & Martiny, A. C. (2013). Phylogenetic distribution of potential cellulases in bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(5), 1545–1554.
- Berthelot, K. & Delmotte, F. M. (1999). Purification and Characterization of an α -Glucosidase from *Rhizobium sp.* (Robinia pseudoacacia L.) Strain USDA 4280. *Applied and environmental microbiology*, 65(7), 2907–2911.
- 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*, 42(6), 1074–1084.
- Blakemore, R. (1975). Magnetotactic bacteria. *Science*, 190(4212), 377–379.
- Blöthe, M. & Roden, E. E. (2009). Composition and activity of an autotrophic Fe(II)-oxidizing, nitrate-reducing enrichment culture. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(21), 6937–6940.
- Blowes, D. W., Robertson, W. D., Ptacek, C. J. & Merkley, C. (1994). Removal of agricultural nitrate from tile-drainage effluent water using in-line bioreactors. *Journal of Contaminant Hydrology*, 15(3), 207–221.
- BMUB BMEL. (2017). *Nitratbericht 2016*. Verfügbar unter: www.bmub.bund.de
- De Boer, W., Folman, L. B., Summerbell, R. C. & Boddy, L. (2005). Living in a fungal world: Impact of fungi on soil bacterial niche development. *FEMS Microbiology*

- Reviews*, 29(4), 795–811.
- Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*, 30(15), 2114–2120.
- Bray, N. L., Pimentel, H., Melsted, P. & Pachter, L. (2016). Near-optimal probabilistic RNA-seq quantification. *nature biotechnology*, 34(5), 4–8.
- Brivio, E. & Petsa, I. (2016). Water: Commission refers Germany to the Court of Justice of the EU over water pollution caused by nitrates. *EU Commission - Press release*. Verfügbar unter: http://europa.eu/rapid/press-release_IP-16-1453_en.htm
- Brown, E. (2007). Reactive Nitrogen in the Environment; Too Much or too Little of a Good Thing. *United Nations Environment Programme*, 1–56.
- Buchfink, B., Xie, C. & Huson, D. H. (2014). Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. *Nature Methods*, 12(1), 59–60.
- Camejo, P. Y., Oyserman, B. O., McMahon, K. D. & Noguera, D. R. (2019). Integrated Omic Analyses Provide Evidence that a “*Candidatus Accumulibacter phosphatis*” Strain Performs Denitrification under Microaerobic Conditions. *mSystems*, 4(1), 1–23.
- Cameron, S. G. & Schipper, L. A. (2010). Nitrate removal and hydraulic performance of organic carbon for use in denitrification beds. *Ecological Engineering*, 36(11), 1588–1595.
- Cameron, S. G. & Schipper, L. A. (2012). Hydraulic properties, hydraulic efficiency and nitrate removal of organic carbon media for use in denitrification beds. *Ecological Engineering*, 41, 1–7.
- Canfield, D. E., Glazer, A. N. & Falkowski, P. G. (2010). The Evolution and Future of Earth’s Nitrogen Cycle. *Science*, 330, 192–196.
- Chen, X., Peltier, E., Sturm, B. S. M. & Young, C. B. (2013). Nitrogen removal and nitrifying and denitrifying bacteria quantification in a stormwater bioretention system. *Water Research*, 47(4), 1691–1700.
- Christianson, L. E., Bhandari, A., Helmers, M. J. & Schilfgaard, V. (2012). A Practice-Oriented Review of Woodchip Bioreactors for Subsurface Agricultural Drainage. *Applied Engineering in Agriculture*, 28(6), 861–874.
- Christianson, L., Helmers, M., Bhandari, A. & Moorman, T. (2013). Internal hydraulics of an agricultural drainage denitrification bioreactor. *Ecological Engineering*, 52(3), 298–307.
- Dalsgaard, T., Stewart, F. J., Thamdrup, B., De Brabandere, L., Revsbech, N. P., Ulloa, O. *et al.* (2014). Oxygen at Nanomolar Levels Reversibly Suppresses Process Rates and Gene Expression in Anammox and Denitrification in the Oxygen Minimum Zone off Northern Chile. *mBio*, 5(6), e01966-14.
- Davis, M. P., Martin, E. A., Moorman, T. B., Isenhardt, T. M. & Soupir, M. L. (2019). Nitrous oxide and methane production from denitrifying woodchip bioreactors at three hydraulic residence times. *Journal of environmental management*, 242, 290–297.
- Díaz, R., García, J., Mujeriego, R. & Lucas, M. (2003). A Quick, Low-Cost Treatment Method for Secondary Effluent Nitrate Removal through Denitrification. *Environmental Engineering Science*, 20(6), 693–702.

- van Driel, P., Robertson, W. & Merkley, C. (2006). Denitrification of agricultural drainage using wood-based reactors. *Transactions of the ASABE*, 49(2), 565–573.
- Du, R., Peng, Y., Cao, S., Li, B., Wang, S. & Niu, M. (2016). Mechanisms and microbial structure of partial denitrification with high nitrite accumulation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(4), 2011–2021.
- Elgood, Z., Robertson, W. D., Schiff, S. L. & Elgood, R. (2010). Nitrate removal and greenhouse gas production in a stream-bed denitrifying bioreactor. *Ecological Engineering*, 36(11), 1575–1580.
- Emerson, D. & Moyer, C. (1997). Isolation and Characterization of Novel Iron-Oxidizing Bacteria That Grow at Circumneutral pH. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(12), 4784–4792.
- Erkel, C., Conrad, R. & Liesack, W. (1998). Methanproduzierende Mikroorganismen im Reisfeldboden. *Biospektrum*, 13. Jahrga, 617–619.
- Fatehi-Pouladi, S., Anderson, B. C., Wootton, B., Button, M., Bissegger, S., Rozema, L. *et al.* (2019). Interstitial water microbial communities as an indicator of microbial denitrifying capacity in wood-chip bioreactors. *Science of the Total Environment*, 655, 720–729.
- Filipe, C. D. M. & Grady, C. P. L. (1998). *Biological Wastewater Treatment, Revised and Expanded* (Environmental Science & Pollution). CRC Press.
- Fixen, P. E. & West, F. B. (2002). Nitrogen Fertilizers : Meeting Contemporary Challenges. *AMBIO: A Journal of the Human Environment*, 31(2), 169–176.
- Forst, M., Hierlmeier, R., Kiebel, A. & Ruthsatz, B. (1997). Hoch- und Zwischenmoore in Trockenmaaren der Vulkaneifel. *Angewandte Landschaftsökologie*, 14.
- Forster, P., Ramaswamy, V., Artaxo, P., Berntsen, T., Betts, R., Fahey, D. W. *et al.* (2007). *Changes in atmospheric constituents and in radiative forcing*. (S.Q. Solomon D; Manning, M; Chen, Z; Marquis, M; Averyt, KB; Tignor, M; Miller, HL, Hrsg.). Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press.
- Fuchs, G., Eitinger, T., Heider, J., Kemper, B., Kothe, E., Overmann, J. *et al.* (2014). *Allgemeine Mikrobiologie* (9. Auflage.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Fujinuma, R., Venterea, R., Ranaivoson, A., Moncrief, J. & A. Dittrich, M. (2011). On-site denitrification beds could reduce indirect greenhouse gas emissions from agricultural drainage waters. *AGU Fall Meeting Abstracts*, 504.
- Ghafari, S., Hasan, M. & Aroua, M. K. (2008). Bio-electrochemical removal of nitrate from water and wastewater-A review. *Bioresource Technology*, 99(10), 3965–3974.
- Ghane, E., Fausey, N. R. & Brown, L. C. (2015). Modeling nitrate removal in a denitrification bed. *Water Research*, 71, 294–305.
- Gibert, O., Pomierny, S., Rowe, I. & Kalin, R. M. (2008). Selection of organic substrates as potential reactive materials for use in a denitrification permeable reactive barrier (PRB). *Bioresource Technology*, 99(16), 7587–7596.
- Ginige, M. P., Keller, J. & Blackall, L. L. (2005). Investigation of an acetate-fed denitrifying microbial community by stable isotope probing, full-cycle rRNA analysis, and fluorescent in situ hybridization-microautoradiography. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(12), 8683–8691.

- Gisi, U. (1997). *Bodenökologie* (Bücher : Biowissenschaften). Thieme.
- Glass, C. & Silverstein, J. (1998). Denitrification kinetics of high nitrate concentration water: pH effect on inhibition and nitrite accumulation. *Water Research*, 32(3), 831–839.
- Görner, K. & Hübner, K. (2013). *Gewässerschutz und Abwasserbehandlung*. Springer Berlin Heidelberg.
- Graf, D. R. H., Jones, C. M. & Hallin, S. (2014). Intergenomic comparisons highlight modularity of the denitrification pathway and underpin the importance of community structure for N₂O emissions. *PLoS ONE*, 9(12), 1–20.
- Greenan, C. M., Moorman, T. B., Kaspar, T. C., Parkin, T. B. & Jaynes, D. B. (2006). Comparing Carbon Substrates for Denitrification of Subsurface Drainage Water. *Journal of Environment Quality*, 35(3), 824.
- Greenan, C. M., Moorman, T. B., Parkin, T. B., Kaspar, T. C. & Jaynes, D. B. (2009). Denitrification in Wood Chip Bioreactors at Different Water Flows. *Journal of Environment Quality*, 38(4), 1664.
- Grießmeier, V. (2015). Labor- und Feldversuche zum Anwendungspotential von Umweltdenitrifikationsanlagen.
- Grießmeier, V., Bremges, A., McHardy, A. C. & Gescher, J. (2017). Investigation of different nitrogen reduction routes and their key microbial players in wood chip-driven denitrification beds. *Scientific Reports*, 7(1), 17028.
- Grießmeier, V. & Gescher, J. (2018). Influence of the potential carbon sources for field denitrification beds on their microbial diversity and the fate of carbon and nitrate. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1313.
- Grießmeier, V., Leberecht, K. & Gescher, J. (2019). NO₃⁻ removal efficiency in field denitrification beds: key controlling factors and main implications. *Environmental Microbiology Reports*, 11(3), 316–329.
- Gupta, P., Samant, K. & Sahu, A. (2012). Isolation of cellulose-degrading bacteria and determination of their cellulolytic potential. *International Journal of Microbiology*.
- Halaburka, B. J., Lefevre, G. H. & Luthy, R. G. (2019). Quantifying the temperature dependence of nitrate reduction in woodchip bioreactors: Experimental and modeled results with applied case-study. *Environmental Science: Water Research and Technology*, 5, 782–797.
- Healy, M. G., Barrett, M., Lanigan, G. J., João Serrenho, A., Ibrahim, T. G., Thornton, S. F. *et al.* (2015). Optimizing nitrate removal and evaluating pollution swapping trade-offs from laboratory denitrification bioreactors. *Ecological Engineering*, 74(3), 290–301.
- Healy, M. G., Ibrahim, T. G., Lanigan, G. J., Serrenho, A. J. & Fenton, O. (2012). Nitrate removal rate, efficiency and pollution swapping potential of different organic carbon media in laboratory denitrification bioreactors. *Ecological Engineering*, 40, 198–209.
- Hesselmann, R. P. X., Werlen, C., Hahn, D., Van Der Meer, J. R. & Zehnder, A. J. B. (1999). Enrichment, phylogenetic analysis and detection of a bacterium that performs enhanced biological phosphate removal in activated sludge. *Systematic and Applied Microbiology*, 22(3), 454–465.
- Heylen, K., Lebbe, L. & de Vos, P. (2008). *Acidovorax caeni* sp. nov., a denitrifying species with genetically diverse isolates from activated sludge. *International Journal of*

- Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58(1), 73–77.
- Horn, S. J., Vaaje-Kolstad, G., Westereng, B. & Eijsink, V. G. (2012). Novel enzymes for the degradation of cellulose. *Biotechnology for Biofuels*, 5(1), 45.
- Huerta-Cepas, J., Szklarczyk, D., Heller, D., Hernández-Plaza, A., Forslund, S. K., Cook, H. *et al.* (2019). EggNOG 5.0: A hierarchical, functionally and phylogenetically annotated orthology resource based on 5090 organisms and 2502 viruses. *Nucleic Acids Research*, 47(D1), D309–D314.
- Hyatt, D., Chen, G. L., LoCasio, P. F., Land, M. L., Larimer, F. W. & Hauser, L. J. (2010). Prodigal: Prokaryotic gene recognition and translation initiation site identification. *BMC Bioinformatics*, 11(1), 119.
- Ishii, S., Ashida, N., Ohno, H., Segawa, T., Yabe, S., Otsuka, S. *et al.* (2017). *Noviherbaspirillum denitrificans* sp. Nov., a denitrifying bacterium isolated from rice paddy soil and *Noviherbaspirillum autotrophicum* sp. nov., a denitrifying, facultatively autotrophic bacterium isolated from rice paddy soil and proposal to reclassify H. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 1841–1848.
- Jewell, T. N. M., Karaoz, U., Brodie, E. L., Williams, K. H. & Beller, H. R. (2016). Metatranscriptomic evidence of pervasive and diverse chemolithoautotrophy relevant to C, S, N and Fe cycling in a shallow alluvial aquifer. *ISME Journal*, 10(9), 2106–2117.
- van Kessel, J. A. S. & Russell, J. B. (1996). The effect of pH on ruminal methanogenesis. *FEMS Microbiology Ecology*, 20(4), 205–210.
- Klüber, H. D. & Conrad, R. (1998). Effects of nitrate, nitrite, NO and N₂O on methanogenesis and other redox processes in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 25, 301–318.
- Kobayashi, Y., Shinkai, T. & Koike, S. (2008). Ecological and Physiological Characterization Shows that *Fibrobacter succinogenes* Is Important in Rumen Fiber Digestion – Review. *Folia Microbiologica*, 53(3), 195–200.
- Kocour Kroupová, H., Valentová, O., Svobodová, Z., Šauer, P. & Máchová, J. (2018). Toxic effects of nitrite on freshwater organisms: a review. *Reviews in Aquaculture*, 10(3), 525–542.
- Kojima, H. & Fukui, M. (2011). *Sulfuritalea hydrogenivorans* gen. nov., sp. nov., a facultative autotroph isolated from a freshwater lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 61, 1651–1655.
- Kong, Y., Nielsen, J. L. & Nielsen, P. H. (2004). Microautoradiographic study of Rhodocyclus-related polyphosphate- accumulating bacteria in full-scale enhanced biological phosphorus removal plants. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(9), 5383–5390.
- 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*. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(7), 1670–1676.
- Küster, E. (1979). Bedeutung der Aktinomyceten für den Abbau von Cellulose, Lignin und Huminstoffen im Boden. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, 142(3), 365–374.
- LAWA-Arbeitskreis. (1998). Beurteilung der Wasserbeschaffenheit von Fließgewässern in der Bundesrepublik Deutschland - Chemische Gewässergüteklassifikation -. *Konzepte*

und Strategien Oberirdische Gewässer, 35.

- van der Lelie, D., Taghavi, S., McCorkle, S. M., Li, L. L., Malfatti, S. A., Monteleone, D. *et al.* (2012). The metagenome of an anaerobic microbial community decomposing poplar wood chips. *PLoS ONE*, 7(5), e36740.
- Lepine, C., Christianson, L., Sharrer, K. & Summerfelt, S. (2015). Optimizing Hydraulic Retention Times in Denitrifying Woodchip Bioreactors Treating Recirculating Aquaculture System Wastewater. *Journal of Environment Quality*, 45(3), 813–21.
- Leschine, S. B. (1995). Cellulose degradation in anaerobic environments. *Annual Review of Microbiology*, 49(1), 399–426.
- Li, D., Liu, C. M., Luo, R., Sadakane, K. & Lam, T. W. (2015). MEGAHIT: An ultra-fast single-node solution for large and complex metagenomics assembly via succinct de Bruijn graph. *Bioinformatics*, 31(10), 1674–1676.
- Li, Y., Katzmann, E., Borg, S. & Schüler, D. (2012). The periplasmic nitrate reductase nap is required for anaerobic growth and involved in redox control of magnetite biomineralization in *Magnetospirillum gryphiswaldense*. *Journal of Bacteriology*, 194(18), 4847–4856.
- Liao, R., Miao, Y., Li, J., Li, Yan, Wang, Z., Du, J. *et al.* (2018). Temperature dependence of denitrification microbial communities and functional genes in an expanded granular sludge bed reactor treating nitrate-rich wastewater. *RSC Advances*, 8, 42087–42094.
- Lin, Y. F. & Chen, K. C. (1995). Denitrification and methanogenesis in a co-immobilized mixed culture system. *Water Research*, 29(1), 35–43.
- Liu, B., Mao, Y., Bergaust, L., Bakken, L. R. & Frostegård, Å. (2013). Strains in the genus *Thauera* exhibit remarkably different denitrification regulatory phenotypes. *Environmental Microbiology*, 15(10), 2816–2828.
- Liu, X., Li, M., Castelle, C. J., Probst, A. J., Zhou, Z., Pan, J. *et al.* (2018). Insights into the ecology, evolution, and metabolism of the widespread Woese archaeal lineages. *Microbiome*, 6(1), 1–16.
- Liu, Z., Frigaard, N., Vogl, K., Iino, T., Ohkuma, M., Overmann, J. *et al.* (2012). Complete genome of *Ignavibacterium album*, a metabolically versatile, flagellated, facultative anaerobe from the phylum Chlorobi. *Frontiers in Microbiology*, 3(185), 1–15.
- Long, L. M., Schipper, L. A. & Bruesewitz, D. A. (2011). Long-term nitrate removal in a denitrification wall. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 140(3–4), 514–520.
- López-Mondéjar, R., Zühlke, D., Becher, D., Riedel, K. & Baldrian, P. (2016). Cellulose and hemicellulose decomposition by forest soil bacteria proceeds by the action of structurally variable enzymatic systems. *Scientific Reports*, 6, 1–12.
- Lopez-Ponnada, E. V., Lynn, T. J., Peterson, M., Ergas, S. J. & Mihelcic, J. R. (2017). Application of denitrifying wood chip bioreactors for management of residential non-point sources of nitrogen. *Journal of Biological Engineering*, 11(1), 1–14.
- Lovley, D. R., Dwyer, D. F. & Klug, M. J. (1982). Kinetic Analysis of Competition Between Sulfate Reducers and Methanogens for Hydrogen in Sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 43(6), 1373–1379.
- Lovley, D. R. & Klug, M. J. (1983). Sulfate Reducers Can Outcompete Methanogens at Freshwater Sulfate Concentrations. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(1),

187–192.

- Lycus, P., Bøthun, K. L., Bergaust, L., Shapleigh, J. P., Bakken, L. R. & Frostegård, Å. (2017). Phenotypic and genotypic richness of denitrifiers revealed by a novel isolation strategy. *ISME Journal*, *11*(10), 2219–2232.
- Lynd, L. R., Weimer, P. J., van Zyl, W. H. & Pretorius, I. S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *66*(3), 506–577.
- Magoč, T. & Salzberg, S. L. (2011). FLASH: Fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies. *Bioinformatics*, *27*(21), 2957–2963.
- Maharachchikumbura, S. S. N., Hyde, K. D., Jones, E. B. G., McKenzie, E. H. C., Bhat, J. D., Dayarathne, M. C. *et al.* (2016). Families of Sordariomycetes. *Fungal Diversity*, *79*, 1–317.
- Martín, H. G., Ivanova, N., Kunin, V., Warnecke, F., Barry, K. W., McHardy, A. C. *et al.* (2006). Metagenomic analysis of two enhanced biological phosphorus removal (EBPR) sludge communities. *Nature Biotechnology*, *24*(10), 1263–1269.
- Mateos, P. F., Jimenez-Zurdo, J. I., Chen, J., Squartini, A. S., Haak, S. K., Martinez-Molina, E. *et al.* (1992). Cell-associated pectinolytic and cellulolytic enzymes in *Rhizobium leguminosarum* biovar trifolii. *Applied and Environmental Microbiology*, *58*(6), 1816–1822.
- Metcalf & Eddy, I., Tchobanoglous, G., Burton, F. L. & Stensel, H. D. (2003). *Wastewater Engineering: Treatment and Reuse* (McGraw-Hill Series in Civil and Environmental Engineering). McGraw-Hill.
- Moorman, T. B., Parkin, T. B., Kaspar, T. C. & Jaynes, D. B. (2010). Denitrification activity, wood loss, and N₂O emissions over 9 years from a wood chip bioreactor. *Ecological Engineering*, *36*(11), 1567–1574.
- Mountfort, D., Asher, R. A., Mays, E. L. & Tiedje, J. M. (1980). Carbon and Electron Flow in Mud and Sandflat Intertidal Sediments at Delaware Inlet, Nelson, New Zealand. *Applied and Environmental Microbiology*, *39*(4), 686–694.
- Nalcaci, O. O., Böke, N. & Ovez, B. (2011). Potential of the bacterial strain *Acidovorax avenae* subsp. *avenae* LMG 17238 and macro algae *Gracilaria verrucosa* for denitrification. *Desalination*, *274*(1–3), 44–53.
- Nordström, A. & Herbert, R. B. (2018). Determination of major biogeochemical processes in a denitrifying woodchip bioreactor for treating mine drainage. *Ecological Engineering*, *110*, 54–66.
- Osono, T. & Takeda, H. (2008). Fungal decomposition of *Abies* needle and *Betula* leaf litter. *Mycologia*, *98*(2), 172–179.
- Ottow, J. C. G. (2011). *Mikrobiologie von Böden: Biodiversität, Ökophysiologie und Metagenomik* (1. Auflage). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- Ovez, B., Mergaert, J. & Saglam, M. (2006). Biological denitrification in drinking water treatment using the seaweed *Gracilaria verrucosa* as carbon source and biofilm carrier. *Water Environ Res*, *78*(4), 430–434.
- Palacios, R. & Newton, W. E. (2005). *Genomes and Genomics of Nitrogen-fixing Organisms* (Nitrogen Fixation: Origins, Applications, and Research Progress). (R. Palacios & W.E.

- Newton, Hrsg.) (1. Auflage). Dordrecht: Springer-Verlag.
- Reich, P. B., Oleksyn, J., Modrzyński, J., Mrozinski, P., Hobbie, S. E., Eissenstat, D. M. *et al.* (2005). Linking litter calcium, earthworms and soil properties: a common garden test with 14 tree species. *Ecology Letters*, 8, 811–818.
- Reyes, C., Schneider, D., Lipka, M., Thürmer, A., Böttcher, M. E. & Friedrich, M. W. (2017). Nitrogen Metabolism Genes from Temperate Marine Sediments. *Marine Biotechnology*, 19(2), 175–190.
- Rhode, H. (1990). A Comparison of the Contribution of Various Gases to the Greenhouse Effect. *Science*, 248, 1217–1219.
- Van Rijn, J., Tal, Y. & Barak, Y. (1996). Influence of volatile fatty acids on nitrite accumulation by a *Pseudomonas stutzeri* strain isolated from a denitrifying fluidized bed reactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(7), 2615–2620.
- Robert, C., Chassard, C., Lawson, P. A. & Bernalier-Donadille, A. (2007). *Bacteroides cellulosilyticus* sp. nov., a cellulolytic bacterium from the human gut microbial community. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 57(7), 1516–1520.
- Robertson, W. D. (2010). Nitrate removal rates in woodchip media of varying age. *Ecological Engineering*, 36(11), 1581–1587.
- Robertson, W. D. & Cherry, J. A. (1995). In Situ Denitrification of Septic-System Nitrate Using Reactive Porous Media Barriers: Field Trials. *Groundwater*, 33(1), 99–111.
- Robertson, W. D., Ford, G. I. & Lombardo, P. S. (2005). Wood-based filter for nitrate removal in septic systems. *ASAE*, 48(1), 121–128.
- Robledo, M., Rivera, L., Jiménez-Zurdo, J. I., Rivas, R., Dazzo, F., Velázquez, E. *et al.* (2012). Role of *Rhizobium* endoglucanase CelC2 in cellulose biosynthesis and biofilm formation on plant roots and abiotic surfaces. *Microbial Cell Factories*, 11, 1–12.
- Rocher, V., Laverman, A. M., Gasperi, J., Azimi, S., Guérin, S., Mottelet, S. *et al.* (2015). Nitrite accumulation during denitrification depends on the carbon quality and quantity in wastewater treatment with biofilters. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(13), 10179–10188.
- Roy, R. & Conrad, R. (1999). Effect of methanogenic precursors (acetate, hydrogen, propionate) on the suppression of methane production by nitrate in anoxic rice field soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 28(1), 49–61.
- Rütting, T., Boeckx, P., Müller, C. & Klemmedtsson, L. (2011). Assessment of the importance of dissimilatory nitrate reduction to ammonium for the terrestrial nitrogen cycle. *Biogeosciences*, 8(7), 1779–1791.
- Saia, F. T., Souza, T. S. O., Duarte, R. T. D., Pozzi, E., Fonseca, D. & Foresti, E. (2016). Microbial community in a pilot-scale bioreactor promoting anaerobic digestion and sulfur-driven denitrification for domestic sewage treatment. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 39(2), 341–352.
- Saleh-Lakha, S., Shannon, K. E., Henderson, S. L., Goyer, C., Trevors, J. T., Zebarth, B. J. *et al.* (2009). Effect of pH and Temperature on Denitrification Gene Expression and Activity in *Pseudomonas mandelii*. *Applied Environmental Microbiology*, 75(12), 3903–3911.

- Saliling, W. J. B., Westerman, P. W. & Losordo, T. M. (2007). Wood chips and wheat straw as alternative biofilter media for denitrification reactors treating aquaculture and other wastewaters with high nitrate concentrations. *Aquacultural Engineering*, 37(3), 222–233.
- Schinner, F. & Sonnleitner, R. (1996). *Bodenökologie: Mikrobiologie und Bodenenzymatik Band I: Grundlagen, Klima, Vegetation und Bodentyp* (Band I.). Berlin Heidelberg: Springer.
- Schipper, L. A., Barkle, G. F. & Vojvodic-Vukovic, M. (2005). Maximum Rates of Nitrate Removal in a Denitrification Wall. *Journal of Environmental Quality*, 34(4), 1270–1276.
- Schipper, L. A., Cameron, S. C. & Warneke, S. (2010). Nitrate removal from three different effluents using large-scale denitrification beds. *Ecological Engineering*, 36(11), 1552–1557.
- Schipper, Louis A., Robertson, W. D., Gold, A. J., Jaynes, D. B. & Cameron, S. C. (2010). Denitrifying bioreactors - An approach for reducing nitrate loads to receiving waters. *Ecological Engineering*, 36(11), 1532–1543.
- Schipper, L. A. & Vojvodić-Vuković, M. (2001). Five years of nitrate removal, denitrification and carbon dynamics in a denitrification wall. *Water Research*, 35(14), 3473–3477.
- Schwarz, W. H. (2001). The cellulosome and cellulose degradation by anaerobic bacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*, 56, 634–649.
- Shade, A., Peter, H., Allison, S. D., Baho, D. L., Berga, M., Bürgmann, H. *et al.* (2012). Fundamentals of microbial community resistance and resilience. *Frontiers in Microbiology*, 3(417), 1–19.
- Shen, Z., Zhou, Y., Hu, J. & Wang, J. (2013). Denitrification performance and microbial diversity in a packed-bed bioreactor using biodegradable polymer as carbon source and biofilm carrier. *Journal of hazardous materials*, 250–251, 431–438.
- Šimek, M. & Cooper, J. E. (2002). The influence of soil pH on denitrification: Progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. *European Journal of Soil Science*, 53(3), 345–354.
- Skerman, V. B. D. & MacRae, I. C. (1957). The influence of oxygen availability on the degree of nitrate reduction by *Pseudomonas denitrificans*. *Canadian Journal of Microbiology*, 3(3), 505–530.
- Solar, J. (2019). Wasser- und Stofftransport in einer Umweltdenitrifikationsanlage.
- Spring, S., Bunk, B., Spröer, C., Schumann, P., Rohde, M., Tindall, B. J. *et al.* (2016). Characterization of the first cultured representative of Verrucomicrobia subdivision 5 indicates the proposal of a novel phylum. *ISME Journal*, 10(12), 2801–2816.
- Stahl, A. D. & Amann, R. (1991). Development and Application of Nucleic Acid Probes. In E. Stackebrandt & M. Goodfellow (Hrsg.), *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics* (S. 205–248). New York: John Wiley and Sons.
- Tiedje, J. M. (1988). Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. In A.J.N. Zehnder (Hrsg.), *Environmental Microbiology of Anaerobes* (S. 179–244). New York: Wiley.

- Tugtas, A. E. & Spyros, G. P. (2006). Inhibitory effects of nitrogen oxides on a mixed methanogenic culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(3), 444–544.
- Vanwonterghem, I., Jensen, P. D., Rabaey, K. & Tyson, G. W. (2016). Genome-centric resolution of microbial diversity, metabolism and interactions in anaerobic digestion. *Environmental Microbiology*, 18(9), 3144–3158.
- Vitousek, P. M., Aber, J. D., Howarth, R. W., Likens, G. E., Matson, P. A., Schindler, D. W. *et al.* (1997). Technical Report: Human Alteration of the Global Nitrogen Cycle: Sources and Consequences. *Source: Ecological Applications*, 7(3), 737–750.
- Volokita, M., Abeliovich, A. & Soares, M. I. M. (1996). Denitrification of groundwater using cotton as energy source. *Water Science and Technology*, 34(1–2), 379–385.
- Volokita, Michal, Belkin, S., Abeliovich, A. & Soares, M. I. M. (1996). Biological denitrification of drinking water using newspaper. *Water Research*, 30(4), 965–971.
- Warneke, S., Schipper, L. A., Bruesewitz, D. A. & Baisden, W. T. (2011). A comparison of different approaches for measuring denitrification rates in a nitrate removing bioreactor. *Water Research*, 45(14), 4141–4151.
- Warneke, S., Schipper, L. A., Bruesewitz, D. A., McDonald, I. & Cameron, S. (2011). Rates, controls and potential adverse effects of nitrate removal in a denitrification bed. *Ecological Engineering*, 37(3), 511–522.
- Warneke, S., Schipper, L. A., Matiasek, M. G., Scow, K. M., Cameron, S., Bruesewitz, D. A. *et al.* (2011). Nitrate removal, communities of denitrifiers and adverse effects in different carbon substrates for use in denitrification beds. *Water Research*, 45(17), 5463–5475.
- Wilderer, P. A., Jones, W. L. & Dau, U. (1987). Competition in denitrification systems affecting reduction rates and accumulation of nitrite. *Water Research*, 21(2), 239–245.
- Wilson, D. B. (2011). Microbial diversity of cellulose hydrolysis. *Current Opinion in Microbiology*, 14(3), 259–263.
- Woli, K. P., David, M. B., Cooke, R. A., McIsaac, G. F. & Mitchell, C. A. (2010). Nitrogen balance in and export from agricultural fields associated with controlled drainage systems and denitrifying bioreactors. *Ecological Engineering*, 36(11), 1558–1566.
- Ye, R., Jin, Q., Bohannan, B., Keller, J. K., McAllister, S. A. & Bridgman, S. D. (2012). pH controls over anaerobic carbon mineralization, the efficiency of methane production, and methanogenic pathways in peatlands across an ombrotrophic-minerotrophic gradient. *Soil Biology and Biochemistry*, 54, 36–47.
- Zumft, W. G. (1997). Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 61(4), 533–616.

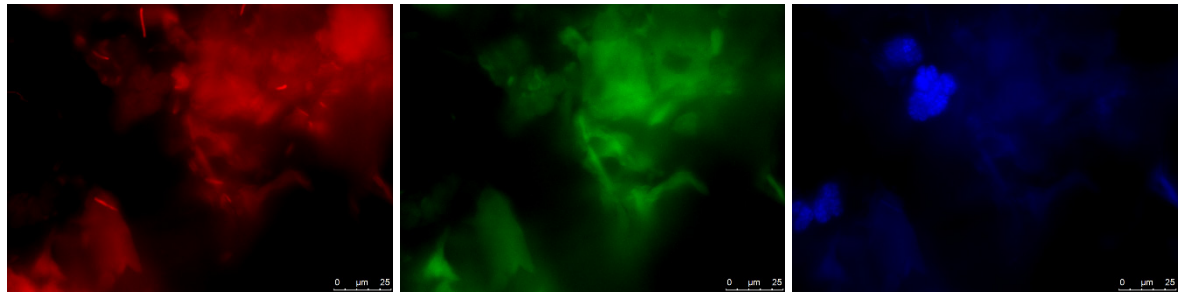
Anhang

Abb. A1: Zeitpunkt t3 der methanogenen Ko-Kultur mit Holzpellets für jeden Filterkanal. In rot Bacteria (EUB338-1, Cy3), in grün Archaea (ARCH915, FITC), in blau DAPI-Gegenfärbung.

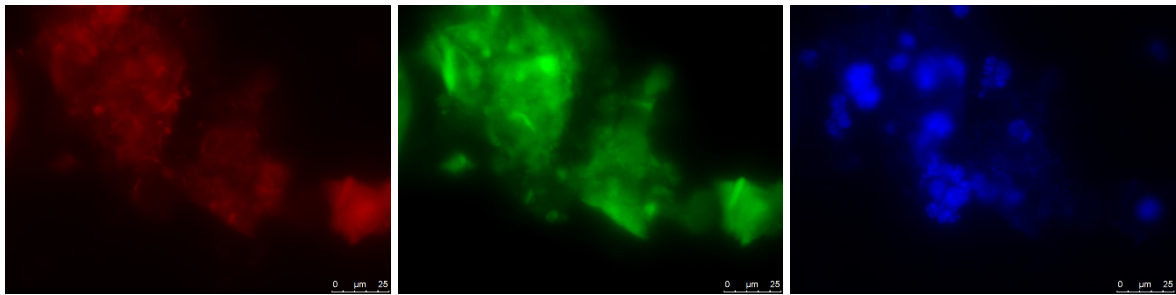


Abb. A2: Zeitpunkt t4 der methanogenen Ko-Kultur mit Holzpellets für jeden Filterkanal. In rot Bacteria (EUB338-1, Cy3), in grün Archaea (ARCH915, FITC), in blau DAPI-Gegenfärbung.

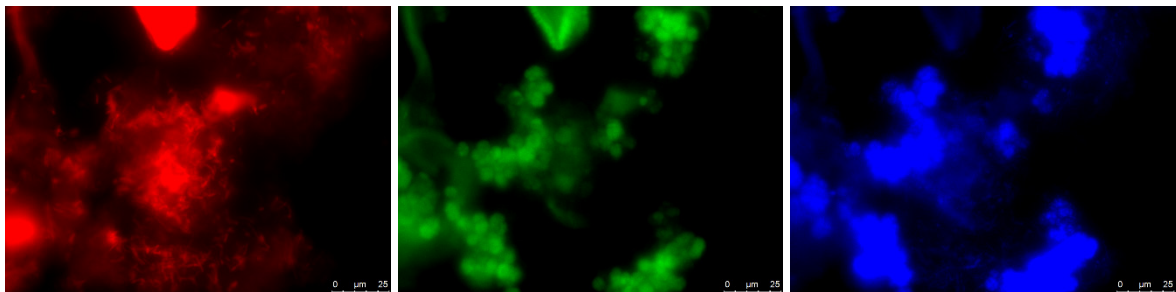


Abb. A3: Zeitpunkt t3 der methanogenen Ko-Kultur mit Holzhackschnittel für jeden Filterkanal. In rot Bacteria (EUB338-1, Cy3), in grün Archaea (ARCH915, FITC), in blau DAPI-Gegenfärbung.

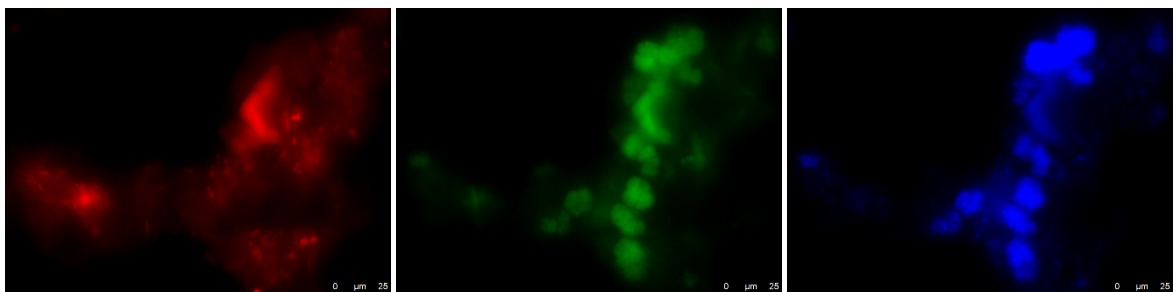


Abb. A4: Zeitpunkt t4 der methanogenen Ko-Kultur mit Holzhackschnittel für jeden Filterkanal. In rot Bacteria (EUB338-1, Cy3), in grün Archaea (ARCH915, FITC), in blau DAPI-Gegenfärbung.

Domaine	Archaea			Eukaryota			Eukaryota			Eukaryota			Eukaryota			Eukaryota			Eukaryota			Eukaryota			Bacteria			Bacteria								
	Fungi			Fungi			Fungi			Fungi			Fungi			Fungi			Fungi			Fungi			Fungi			Bacteria			Bacteria					
Ordering				Chloroflexi			Chloroflexi			Chloroflexi			Chloroflexi			Chloroflexi			Chloroflexi			Chloroflexi			Chloroflexi			Chloroflexi			Chloroflexi					
Wiss. Name/Phylum	Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium			Candidatus Methanohalobium					
Ordering				Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales					
Wiss. Name/Phylum	Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales			Mycobacteriales		

Abb. A 9: TPM-Werte der Enzyme mit cellulolytischer Funktion der einzelnen Phyla und Ordnungen für die planktonische Phase.

Domäne Reich	Bacteria											
	Eukaryota Rungi	Eukaryota Rungi	Eukaryota mycota	Eukaryota mycota	Chamaeozoa	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Eukaryota	Bacteria	Bacteria
wils. Name/Phylum	Actinobacteria											
	Actino-bacteria unsp. 0.0134113											
Ordnung	Actino-bacteria unsp. 0.0134113											
	Actino-bacteria unsp. 0.0134113											
wils. Name/Phylum	Actino-bacteria unsp. 0.0134113											
	Actino-bacteria unsp. 0.0134113											
Ordnung	Actino-bacteria unsp. 0.0134113											
	Actino-bacteria unsp. 0.0134113											

Domäne	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria	Bacteria
Actinobacteria	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994
Chloroflexi	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994	0.00083899	0.01438994

Abb. A 10: TPM-Werte der Enzyme mit hemicellulolytischer Funktion der einzelnen Phyla und Ordnungen für die planktonische Phase.

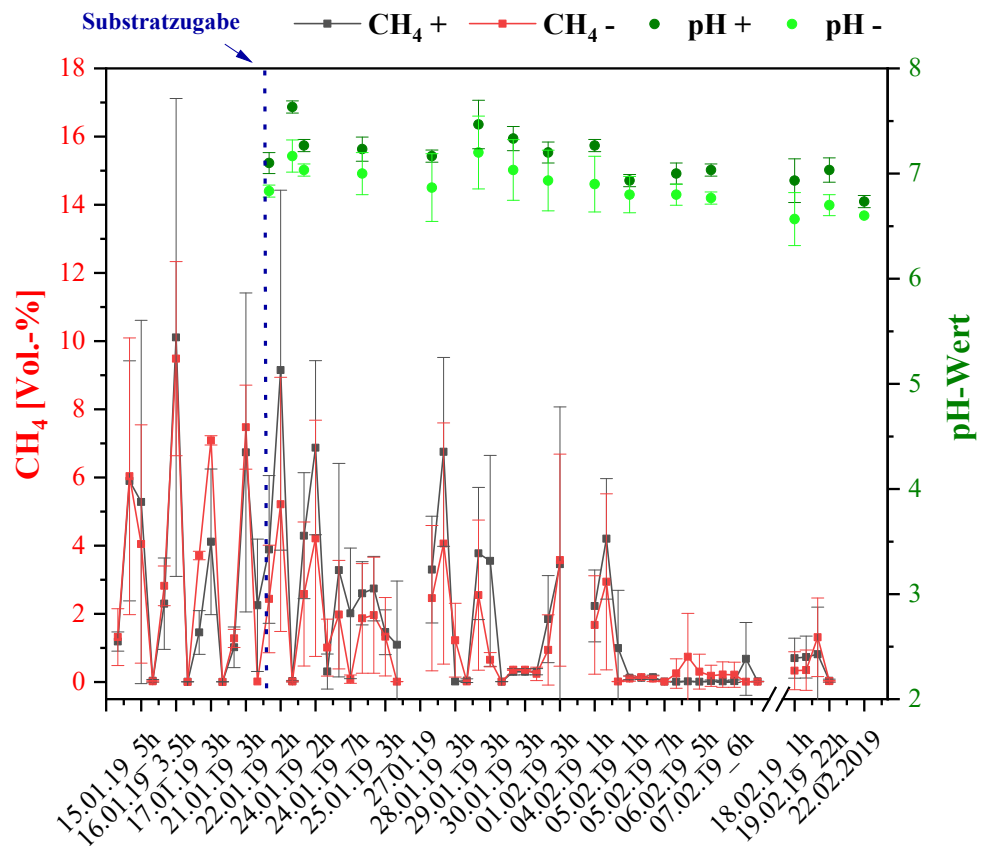


Abb. A 11: Methankonzentration mit Standardabweichung für das zweite Experiment mit der methanogenen Ko-Kultur mit eingestelltem pH-Wert für ein Triplikat (+)