

Band 39

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und  
der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut  
der Universität Karlsruhe (TH)

**Einfluss der chemischen Oxidation auf  
das toxische Potenzial und das biologische  
Abbauverhalten von Industrieabwässern**

Philip Hörsch

Herausgeber  
Fritz H. Frimmel

Karlsruhe 2004

Philip Hörsch

Einfluss der chemischen Oxidation auf das toxische Potenzial und das biologische Abbauverhalten von Industrieabwässern

Herausgeber: Fritz H. Frimmel

Band 39

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH)

Karlsruhe 2004

ISSN: 1612-118X

Lehrstuhl für Wasserchemie und DVGW-Forschungsstelle  
am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH)

Engler-Bunte-Ring 1

D-76131 Karlsruhe

Tel.: +49-(0)721-608-2580

Fax: +49-(0)721-699154

E-mail: [fritz.frimmel@ciw.uni-karlsruhe.de](mailto:fritz.frimmel@ciw.uni-karlsruhe.de)

<http://www.wasserchemie.uni-karlsruhe.de>

Titelbild: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung einer Biofilmprobe. Rot markiert sind die Ammonium-oxidierenden Bakterien, gelb markiert die Nitrit-oxidierenden Bakterien der Gattung *Nitrospira*.

Dieses Werk wird durch das deutsche Urheberrechtsgesetz und internationale Verträge urheberrechtlich geschützt. © 2004 Prof. Dr. F. H. Frimmel. Alle Rechte vorbehalten. All rights reserved.

# **Einfluss der chemischen Oxidation auf das toxische Potenzial und das biologische Abbauverhalten von Industrieabwässern**

zur Erlangung des akademischen Grades eines  
**Doktors der Ingenieurwissenschaften (Dr.-Ing.)**  
an der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik  
der Universität Fridericiana Karlsruhe (TH)

genehmigte

**Dissertation**

von

**Dipl.-Biol. t. o. Philip Hörsch**

aus Ulm

Tag des Kolloquiums:	15.03.2004
Referent:	Prof. Dr. rer. nat. F. H. Frimmel
Korreferent:	Prof. Dr.-Ing. C. Posten



## Vorwort

Diese Arbeit wurde am Lehrstuhl für Wasserchemie am Engler-Bunte-Institut angefertigt. Für die umfangreiche Hilfe und Unterstützung möchte ich mich bei vielen Menschen bedanken:

Herrn Prof. Frimmel möchte ich herzlich für die Aufnahme am Institut und die gegebene Freiheit zum selbstständigen Arbeiten danken. Die Möglichkeit, auch einmal über den Tellerrand hinauszublicken und unbekannte Wege einzuschlagen, haben mir ermöglicht, eigene Fußstapfen zu hinterlassen.

Ebenso möchte ich Herrn Prof. Posten für die freundliche Übernahme des Korreferats danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts gilt mein Dank für ihre Hilfe, den Diskussionen sowie auch den gemeinsamen Unternehmungen außerhalb der Arbeit. Besonders erwähnen möchte ich Dr. Andreas Gorenflo, mit dem ich viele Jahre das Büro geteilt habe und den ich mit den alltäglichen Problemen belästigen konnte, Dr. Christian Zwiener, der bei Fragen immer ein offenes Ohr hatte, Dr. Gerd Ohlenbusch, Thomas Glauner und Elly Karle für ihre Hilfe bei zahlreichen analytischen Methoden und Dr. Thomas Brinkmann für die fruchtbare Zusammenarbeit. Nicht vergessen möchte ich Dr. Daniel Schmitt, Dr. Sebastian Hesse und Axel Heidt für allerlei Hilfen und Gespräche.

Ohne das Engagement vieler studentischer Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen wäre diese Arbeit nie entstanden. Bedanken möchte ich mich bei meinen Diplomarbeitern Alexander Wörz, Christian Schönung, Claudia Fuder, Andreas Speck und Jochen Leve, bei meinem Seminararbeiter Heiko Hinkl und meiner Studienarbeiterin Gabriela Hartmann und bei meiner langjährigen Laborfachkraft und Tausendsassa Carola Graf. Die Arbeit mit ihnen allen hat sehr großen Spaß gemacht.

Ebenso möchte ich PD Dr. Ursula Obst und Dr. Thomas Schwartz vom Forschungszentrum Karlsruhe und der Arbeitsgruppe von Prof. Wilderer (TU München) danken, die mir den Einstieg in die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung erleichterten. Mein Dank gilt weiterhin Dr. Wolf-Rüdiger Müller vom Forschungskärwerk Stuttgart/Büsnau für seine Hilfe und die anregenden Gespräche.

Die in dieser Arbeit verwendeten Industrieabwässer erhielt ich von den Firmen Hoffmann-La Roche AG (Grenzach-Wyhlen) und Ciba Spezialitätenchemie GmbH (Grenzach-Wyhlen). Stellvertretend hierfür danke ich Herrn Gottfried Florian (Hoffmann-La Roche AG) und Herrn Dr. Rolf Lucas (Ciba Spezialitätenchemie GmbH).

Die vorliegende Arbeit wurde im Rahmen eines Promotionsstipendiums des DFG-Graduiertenkollegs 366 „Grenzflächenphänomene in aquatischen Systemen und wässrigen Phasen“ sowie mit Mitteln der DVGW (Deutsche Vereinigung des Gas- und Wasserfaches) gefördert. Ein Reisestipendium der Willy-Hager-Stiftung ermöglichten mir im September 2003 die Teilnahme an der *International Conference on Biofilm Systems* in Kapstadt/Südafrika und die Präsentation meiner Ergebnisse aus den Biofilm-Untersuchungen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Grundlagen</b>	<b>5</b>
2.1	Chemisch-biologische Abwasserbehandlung . . . . .	5
2.2	Chemische Behandlungsverfahren . . . . .	6
2.2.1	Ozonbasierte Oxidationsverfahren . . . . .	7
2.2.2	UV-basierte Oxidationsverfahren . . . . .	11
2.2.3	Anwendung chemisch-biologischer Abwasser- behandlung . . . . .	13
2.2.4	Abwässer aus der Produktion optischer Aufheller . . . . .	15
2.2.5	Reaktoren für die chemische Oxidation . . . . .	15
2.3	Biologische Behandlungsverfahren . . . . .	17
2.3.1	Reaktoren für die biologische Abwasserbehandlung . . . . .	17
2.3.2	Biologische Abbauvorgänge . . . . .	18
2.4	Biologische Bewertungsmethoden . . . . .	19
2.4.1	Statische Abbautests . . . . .	20
2.4.2	Bedeutung statischer Abbautests . . . . .	21
2.4.3	Kontinuierlich geführte Abbautests . . . . .	21
2.4.4	Toxizitätsuntersuchung . . . . .	22
2.5	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH) . . . . .	23
2.5.1	Klassische Nachweismethoden von Bakterien . . . . .	23
2.5.2	<i>In-situ</i> Gensonden-Konzept . . . . .	26
2.5.3	Praxis der FISH . . . . .	27
2.5.4	Stammbaum- und Populationsanalysen . . . . .	31
2.5.5	Alternativen und Weiterentwicklungen . . . . .	33
2.6	Abwassersysteme und FISH . . . . .	35
2.6.1	Relevante Bakteriengruppen . . . . .	35
2.6.2	Allgemeine Populationsanalysen . . . . .	36
2.6.3	Spezielle Populationsanalysen . . . . .	37
2.6.4	Nitrifikation . . . . .	38
2.6.5	Phylogenie der Nitrifikanten . . . . .	39

2.6.6	Populationsanalysen der Nitrifikanten . . . . .	41
<b>3</b>	<b>Experimentelle Angaben</b>	<b>47</b>
3.1	Analytische Methoden . . . . .	47
3.1.1	Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) . . . . .	47
3.1.2	LC-DOC Untersuchung . . . . .	47
3.1.3	Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) . . . . .	48
3.1.4	Spektraler Absorptionskoeffizient (SAK) . . . . .	48
3.1.5	pH-Wert . . . . .	48
3.1.6	Ionenchromatographie (IC) . . . . .	48
3.1.7	Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC) . . . . .	49
3.1.8	LC-MS . . . . .	49
3.1.9	Gaschromatographie (GC-MS) . . . . .	50
3.1.10	Wasserstoffperoxid-Bestimmung . . . . .	51
3.1.11	Ammonium-Bestimmung . . . . .	51
3.2	Reaktorkonstruktion und -charakterisierung . . . . .	52
3.2.1	Reaktorkonstruktion . . . . .	52
3.2.2	Reaktorcharakterisierung . . . . .	54
3.3	Biologische Untersuchungsmethoden . . . . .	58
3.3.1	Toxizitätstest . . . . .	58
3.3.2	Biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB) . . . . .	59
3.3.3	Festbettbiofilmreaktoren . . . . .	59
3.4	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (FISH) . . . . .	62
3.4.1	Lösungen und Materialien für FISH . . . . .	62
3.4.2	Sonden und Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	65
3.4.3	Durchführung der CTC/DAPI-Färbung . . . . .	66
3.4.4	Biofilmprobenentnahme und Fixierung . . . . .	67
3.4.5	Durchführung der <i>in-situ</i> Hybridisierung . . . . .	68
3.4.6	Mikroskopie und Bildverarbeitung . . . . .	68
3.5	Versuchsdurchführung . . . . .	70
3.5.1	Abwässer . . . . .	70
3.5.2	Oxidationsexperimente . . . . .	72
3.5.3	Biologische Untersuchungen . . . . .	72
3.5.4	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung . . . . .	74
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	<b>77</b>
4.1	Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 1 . . . . .	77
4.1.1	Oxidation von Abwasser 1 . . . . .	77
4.1.2	Zusammenfassung: Behandlung Abwasser 1 . . . . .	81
4.2	Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 2 . . . . .	81
4.2.1	Oxidation von Abwasser 2 . . . . .	83



4.2.2	AOX-Abbau bei Abwasser 2 . . . . .	85
4.2.3	Inhaltsstoffe von Abwasser 2 . . . . .	87
4.2.4	Zusammenfassung: Behandlung Abwasser 2 . . . . .	87
4.3	Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 3 . . . . .	89
4.3.1	Oxidation von Abwasser 3 . . . . .	89
4.3.2	Inhaltsstoffe von Abwasser 3 . . . . .	92
4.3.3	Veränderte Verfahrensführung für Abwasser 3 und Schlussfolgerung . . . . .	92
4.4	Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 4 . . . . .	94
4.4.1	Oxidation von Abwasser 4 . . . . .	94
4.4.2	Absorptionsverhalten und Einzelstoffanalytik . . . . .	95
4.4.3	Zusammenfassung: Behandlung Abwasser 4 . . . . .	97
4.5	Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 5 . . . . .	101
4.5.1	Oxidation von Abwasser 5 . . . . .	101
4.5.2	Einzelstoffanalytik bei Abwasser 5 . . . . .	102
4.5.3	Oxidation der Einzelsubstanzen . . . . .	104
4.5.4	Gelchromatographische Untersuchungen . . . . .	106
4.5.5	Biologischer Abbau Abwasser 5 . . . . .	109
4.5.6	Zusammenfassung: Behandlung Abwasser 5 . . . . .	110
4.6	Abbau von Abwasser 5 in Biofilmreaktoren . . . . .	110
4.6.1	DOC-Abbau in Biofilmreaktoren (System 1) . . . . .	111
4.6.2	Zusammenfassung Abbauversuche System 1 . . . . .	113
4.7	Populationsanalyse System 1 . . . . .	113
4.7.1	Aktivitätsmessung mit CTC . . . . .	113
4.7.2	FISH-Analyse . . . . .	115
4.7.3	Zusammenfassung: Populationsanalyse System 1 . . . . .	117
4.8	Nitrifikation in Biofilmreaktoren . . . . .	118
4.8.1	DOC-Elimination . . . . .	119
4.8.2	Nitrifikation Abwasser 5 . . . . .	119
4.8.3	Nitrifikation Abwasser 5 ozont . . . . .	122
4.8.4	Autotroph betriebene Reaktoren . . . . .	122
4.8.5	Nitrifikation in den Vergleichsreaktoren . . . . .	123
4.8.6	Gelchromatographische Untersuchungen . . . . .	126
4.9	Populationsanalyse System 2 . . . . .	128
4.9.1	Populationszusammensetzung der Nitrifikanten . . . . .	128
4.9.2	Populationsanalyse bei Dosierung biologisch leicht abbaubarer C-Quellen . . . . .	129
4.9.3	Populationsanalyse bei Dosierung von Abwasser 5 ozont . . . . .	130
4.9.4	Populationsanalyse bei Dosierung von Abwasser 5 . . . . .	132
4.9.5	Zusammenfassung: Populationsanalyse System 2 . . . . .	132

<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>139</b>
<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>146</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>172</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>175</b>
<b>A Symbol- und Chemikalienverzeichnis</b>	<b>177</b>
<b>B Angaben zum Oxidationsreaktor</b>	<b>183</b>
<b>C Angaben zu den untersuchten Abwässern</b>	<b>187</b>
<b>D Daten zu den Oxidationsversuchen</b>	<b>191</b>
<b>E Daten zum Abbau in Biofilmreaktoren</b>	<b>199</b>
<b>F Angaben zu FISH</b>	<b>209</b>

# Kapitel 1

## Einleitung

Die Knappheit des Rohstoffs Wasser sowie die weltweite Notwendigkeit für sauberes Wasser erfordern eine möglichst vollständige Reinigung von Abwässern, die im häuslichen, landwirtschaftlichen und industriellen Bereich anfallen. Während erstere meist unproblematisch in kommunalen Abwasserreinigungsanlagen (Kläranlagen) mit Hilfe physikalischer (mechanischer) sowie biologischer Methoden behandelt werden können, ist bei industriellen Abwässern meist ein aufwändigeres Vorgehen notwendig. Grund hierfür ist ihr Gehalt an refraktären, d.h. biologisch schwer abbaubaren Verbindungen, sowie toxischen Stoffen, die eine rein biologische Behandlung erschweren oder verhindern [1]. Auch aufgrund der hohen Frachten industrieller Abwässer ist ein effektiver Abbau notwendig, um die gesetzlichen Vorgaben für Abwassereinleitungen in Gewässer oder kommunale Kläranlagen nach der Abwasserverordnung (AbwV) bzw. Rahmen-Abwasser-Verwaltungsverordnung laut §7a des WHG (Wasserhaushaltsgesetz) einzuhalten (Beispiel Anhang 22 der AbwV: Bestimmungen für die chemische Industrie) [2].

Ein geeignetes Verfahren zum Abbau der organischen Stoffe im Abwasser stellt die chemische Oxidation dar. Da die alleinige Behandlung durch Oxidation teilweise nicht möglich und aus wirtschaftlichen Gründen nicht sinnvoll ist, ist die Kombination mit einer biologischen Reinigungsstufe empfehlenswert [3]. Ziel der Oxidation ist somit, organische Substanzen aus dem Abwasser zu entfernen (Verringerung der Fracht) oder chemisch soweit umzuwandeln, dass sie in der biologischen Stufe möglichst vollständig abgebaut werden können. Deswegen ist die Beurteilung einer chemischen Oxidation nur in Verbindung mit einer anschließenden biologischen Reinigungsstufe sinnvoll. Negative Auswirkungen einer Abwasseroxidation können sein: (1) Bildung biologisch nicht abbaubarer Reaktionsprodukte, (2) Bildung toxischer Reaktionsprodukte und (3) Entfernung biologisch abbaubarer Substanzen.

Um die Auswirkungen eines chemisch oxidierten Abwassers auf biologische Systeme zu bestimmen, kann eine Vielzahl biologischer Untersuchungsmethoden eingesetzt werden. Wichtigstes Beurteilungskriterium ist der biologische Abbau, der

mit Hilfe etablierter Testverfahren quantifiziert werden kann. Zu nennen ist hier der biochemische Sauerstoffbedarf, der über einen Zeitraum von 5 Tagen ermittelt wird (BSB<sub>5</sub>, [4, 5]). Für industrielle Zwecke hat es sich bewährt, einen verlängerten Versuchszeitraum von bis zu 28 Tagen zu wählen, wie es beispielsweise im Zahn-Wellens-Test verwirklicht ist [6]. Eine Annäherung von Versuchsergebnissen an Resultate realer Abwassersysteme wird mit Kläranlagen im Labormaßstab [7] oder Festbettreaktoren [8] erreicht. Die Effekte, die z.B. bei der Einleitung industrieller Abwässer in kommunale Kläranlagen auftreten, können damit besser beschrieben werden. Hier spielen die Phänomene der Adaptation der Mikroorganismen, des co-metabolischen Abbaus sowie die endgültige Zusammensetzung der Abwassermatrix eine große Rolle.

Weiteres Beurteilungskriterium ist die Toxizität des oxidierten Abwassers. Hierfür existieren viele biologische Testverfahren, die auf verschiedenen Populationsebenen angesiedelt sind. Für den Kläranlagenbereich bieten sich dabei Toxizitätstests auf zellulärer Ebene an, d.h. die Verwendung einzelner Bakterienspezies (z.B. Leuchtbakterienhemmtest mit *Vibrio fischeri*, Wachstumstest mit *Pseudomonas putida*). Obwohl gerade der Leuchtbakterienhemmtest weit verbreitet ist, wird hier doch nur die Toxizität gegenüber einer einzelnen Bakterienspezies ermittelt, welche mit der wahren Bakterienpopulation in Abwassersystemen keine Gemeinsamkeiten besitzt. Eine Verbesserung stellt die Verwendung von Mischbiozönosen dar, wie sie auch in der Kläranlage selbst vorkommen. Bei Verwendung von Belebtschlamm (z.B. Messung der Sauerstoffaufnahme) ist der gemessene Effekt am besten auf das reale System übertragbar und es können gleichzeitig Aussagen über die biologische Abbaubarkeit gemacht werden.

Kontrovers wird diskutiert, ob eine Erweiterung des Wissens auf mikroskopischer Ebene, d.h. die Kenntnis der am Stoffumsatz beteiligten Bakterien, relevant für den Betrieb einer technischen Anlage, z.B. einer Kläranlage, ist [9]. Funktioniert die Anlage, ist dieses Wissen nicht unbedingt nötig. Andererseits können unter Umständen bestimmte Stoffwechseleigenschaften nicht ausgenutzt werden, da sie nicht bekannt sind. Ebenso könnte bei Kenntnis der beteiligten Bakterien die Prozessführung durch gezielte Einstellung der Prozessparameter optimiert werden [10]. In den vergangenen Jahren wurden deswegen auf der Grundlage molekularbiologischer Arbeiten *in-situ* Detektionssysteme wie die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung etabliert, die einen Nachweis der Bakterien ohne vorherige Anreicherung oder Isolierung erlauben [11, 12]. Dabei wird ausgenutzt, dass die ribosomale Ribonukleinsäure (rRNA) eine Art genetischen Fingerabdruck einer Zelle darstellt, der eine Einordnung in einen phylogenetischen Stammbaum zulässt. Es muss jedoch einschränkend gesagt werden, dass nur solche Bakterien gefunden werden, von denen die rRNA-Sequenz bekannt ist. Mit Hilfe moderner Methoden wie der Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) lässt sich aber die bekannte Anzahl dieser Sequenzen kontinuierlich erhöhen. Weiteres Ziel ist, die Identifizierung der Bakterien mit einer Funk-

tionsanalyse zu koppeln, um bestimmte Stoffwechseleigenschaften einer bestimmten Bakterienart zuweisen zu können [13].

Ziel der vorliegenden Arbeit war eine umfangreiche biologische Beurteilung chemischer Oxidationsverfahren zur Behandlung industrieller Abwasserteilströme. Hierbei sollten folgende Effekte der chemischen Oxidation auf biologische Systeme untersucht werden:

- Beeinflussung der biologischen Abbaubarkeit des Abwassers, Steuerung der kombiniert chemisch-biologischen Behandlung,
- Entstehung toxischer Reaktionsprodukte und deren Verhalten beim biologischen Abbau,
- Beeinflussung des Abbauverhaltens in kontinuierlich betriebenen Festbettbiofilmreaktoren,
- Auswirkungen auf die bakterielle Biozönose und deren Zusammensetzung in Festbettbiofilmreaktoren.

Am Beispiel von fünf unterschiedlichen Abwässern aus dem Bereich der industriellen Synthese von Vitaminen und optischen Aufhellern war der Einfluss der chemischen Oxidation auf die biologische Abbaubarkeit zu untersuchen. Eingesetzt wurden aktivierte Oxidationsverfahren unter Verwendung von Ozon, Wasserstoffperoxid und UV-Bestrahlung (*Advanced Oxidation Processes*, AOP). Als Beurteilungsgrundlage diente die Messung abwasserrelevanter Summenparameter wie chemischer Sauerstoffbedarf (CSB), gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und spektraler Absorptionskoeffizient (SAK). Konnten keine Einzelsubstanzen im Abwasser detektiert werden, so wurde eine gelchromatographische Analyse zur Charakterisierung des DOC durchgeführt, mit deren Hilfe die Oxidation und der Abbau einzelner Fraktionen der Abwasserinhaltsstoffe verfolgt wurde. Mit Hilfe des Leuchtbakterienhemmtests wurde die Entstehung bzw. der Abbau toxischer Substanzen verfolgt. Im Falle eines Abwassers mit gut definierter Zusammensetzung wurden die Toxizität und mangelnde biologische Abbaubarkeit auf einen oder mehrere Inhaltsstoffe zurückgeführt.

Um eine möglichst realitätsnahe Beschreibung des Einflusses der oxidierten Abwässer auf ein biologisches System zu erhalten, wurden kontinuierlich betriebene Abbauexperimente in Festbettbiofilmreaktoren durchgeführt. Dabei wurde aufgezeigt, wie wichtig bei der Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit der Einsatz solcher Laborsysteme ist. Es wurden Experimente zum cometabolischen Abbau durchgeführt, indem ein oxidiertes Abwasser in Mischung mit einem synthetischen Abwasser verwendet wurde. Mit Hilfe der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung wurde

dem Zusammenhang zwischen Abbauleistung und der Populationszusammensetzung nachgegangen. Weiterhin wurde der Einfluss eines Abwasser vor und nach Oxidation auf die bakterielle Nitrifikation untersucht, welche eine wichtige Rolle bei der Stickstoff-Elimination spielt. Folgende Fragestellungen standen dabei im Vordergrund:

- Beurteilung der Hemmwirkung toxischer und/oder refraktärer Abwasserinhaltsstoffe auf die Nitrifikation,
- Beeinflussung der autotrophen Nitrifikanten durch Etablierung einer heterotrophen Bakterienpopulation (Konkurrenz),
- Änderung in der Populationszusammensetzung der Nitrifikanten und Korrelation mit dem Abbauverhalten.

Es wurden die Ammonium-oxidierenden Bakterien mit einem hierarchisch aufgebauten Gensondenset identifiziert, ebenso *Nitrospira* als Vertreter der Nitrit-Oxidierer. Als Vertreter der heterotrophen Bakterien wurden die wichtigsten Untergruppen der Proteobakterien untersucht.

# Kapitel 2

## Grundlagen

### 2.1 Chemisch-biologische Abwasserbehandlung

Chemische Behandlungsmethoden, wie z.B. unterschiedliche Oxidationsverfahren, haben zum Ziel, refraktäre in biologisch verwertbare Substanzen und toxische in nicht-toxische Stoffe umzuwandeln, um das Abwasser einer nachgeschalteten biologischen Reinigungsstufe zugänglich zu machen. Eine Totaloxidation der Störsubstanzen in Abwässern ist aufgrund des hohen Verbrauchs an Oxidationsmitteln und Energie unwirtschaftlich. Deswegen hat eine chemische Vorbehandlung von Abwässern das Ziel, die Oxidation nur so weit auszuführen, dass eine weitergehende Behandlung mit biologischen Methoden möglich wird, was aus ökonomischen Gesichtspunkten einen entscheidenden Vorteil darstellt [3]. Abwässer, bzw. deren Inhaltsstoffe, die sich für ein solch kombiniert chemisch-biologisches Behandlungsverfahren eignen, können in vier verschiedene Kategorien eingeteilt werden [3]:

- **Refraktäre Wasserinhaltsstoffe:** Makromoleküle werden durch Oxidation in kleinere, biologisch verwertbare Substanzen gespalten. Weitere Substanzen, meist anthropogenen Ursprungs wie z.B. Pestizide, werden ebenfalls durch Oxidation in biologisch verwertbare Substanzen umgewandelt.
- **Abwässer mit einem hohen Anteil biologisch abbaubarer Stoffe:** Abwässer mit geringen Konzentrationen an refraktären Substanzen, die nach biologischem Abbau zur Entfernung dieser Restkonzentrationen oxidativ behandelt werden (*polishing*). Dabei sind niedrige Oxidationsmitteldosen möglich. Hierbei kann auch ein biologisch-chemisches Kreislaufverfahren eingesetzt werden.
- **Hemmende Inhaltsstoffe:** Hemmende oder toxische Inhaltsstoffe können die Aktivität eines biologischen Systems verringern. Weiterhin ist ein solch

belastetes biologisches System gegenüber Störeinflüssen anfälliger. Eine vorgeschaltete Oxidation kann eine Entfernung bzw. Umwandlung dieser Stoffe ermöglichen.

- **Dead-end-Zwischenprodukte:** Beim Abbau bestimmter Substanzen kann es zur Akkumulierung von nicht weiter abbaubaren Zwischenprodukten, sog. *dead-end*-Produkten, kommen. Ein biologisch-chemisches Kreislaufverfahren kann hierbei eine Umwandlung dieser Zwischenprodukte in weiter biologisch abbaubare Substanzen bewirken und somit zu einer Mineralisierung führen.

Die Wahl des Oxidationsmittels und damit des eingesetzten Oxidationsverfahrens bestimmt dabei die entstehenden Zwischenprodukte, was für eine anschließende biologische Reinigungsstufe ausschlaggebend ist. Weiterhin muss sichergestellt sein, dass durch den chemischen Oxidationsschritt keine weiteren Verunreinigungen in das Abwasser gelangen, so dass vermieden werden sollte, z.B. stickstoff- oder halogenhaltige Verbindungen zu verwenden [1]. Somit erweisen sich die Oxidationsmittel  $O_2$ ,  $H_2O_2$ ,  $O_3$  sowie OH-Radikale als besonders geeignet (s. Abschnitt 2.2).

## 2.2 Chemische Behandlungsverfahren

Chemische Oxidationsverfahren in der Abwasserbehandlung können in folgende Prozesse eingeteilt werden:

- Nassoxidationsverfahren wie Nieder- und Hochdruckoxidation (Niederdruckoxidation bei  $T < 250\text{ °C}$ ,  $p = 6$  bis  $60$  bar: z.B. LoPrOx-Verfahren der Firma Bayer [14], Hochdruckoxidation bei  $T > 250\text{ °C}$  und  $p = 60$  bis  $200$  bar: z.B. Firma Ciba [15, 16, 17, 18], sowie die Oxidation bei überkritischen Bedingungen ( $T > 374\text{ °C}$ ,  $p > 221$  bar) [19],
- physikalisch-chemische Verfahren wie die Oxidation mit Ozon oder Wasserstoffperoxid [20, 21, 22, 23, 24, 25], die elektrochemische anodische Oxidation [26, 27] sowie die Bestrahlung mit Elektronen (*electron beam*) [28],
- kombinierte chemische Oxidationsverfahren wie der Einsatz von Ozon mit Wasserstoffperoxid [29, 30, 31], Ultraschall [32] oder einem Katalysator [33], weiterhin die Oxidation mit Fentons Reagenz [34, 35],
- photolytische bzw. photokatalytische Oxidationsverfahren, d.h. die Kombination von UV-Bestrahlung mit Ozon oder Wasserstoffperoxid [20, 34, 36], die Photokatalyse mit Titandioxid oder die photochemisch beschleunigte Fenton-Reaktion [37, 38, 39, 40].



Nassoxidationsverfahren, die Sauerstoff bei hohem Druck und hoher Temperatur als Oxidationsmittel verwenden, eignen sich speziell für einen Abwasserbereich, in dem mäßig hohe Abwasserströme (ca. 1 bis 80 m<sup>3</sup>/h) mit sehr hohen Konzentrationen an CSB (ca. 20 bis 300 g/L) auftreten. Zur Optimierung des Oxidationsprozesses ist eine Aufkonzentrierung des Abwassers vorteilhaft, in den meisten Fällen sogar nötig, um den Prozess autotherm zu fahren [16], wodurch das Nassoxidationsverfahren durch den hohen Heizwert wirtschaftlich wird. Die Reaktionsbedingungen erfordern jedoch hohe Ansprüche an das Reaktormaterial, so dass hier hohe Kosten bezüglich des Reaktorbaus als auch seiner Instandhaltung anfallen können. Wäre durch ein optimiertes Oxidationsverfahren unter gemäßigten Reaktionsbedingungen ein entsprechend guter Abbau der organischen Belastung möglich, könnte auf einen Aufkonzentrierungsschritt sowie aufwändige Reaktorkonstruktionen verzichtet werden, was jedoch im Einzelfall (d.h. für jedes Abwasser) ermittelt werden muss. Fällt ein Abwasser bereits in entsprechend hohen Konzentrationen an, ist der Einsatz alternativer Verfahren, wie der Oxidation mit Ozon oder Wasserstoffperoxid, meist nicht möglich, da diese aus wirtschaftlichen und praktischen Gründen auf einen Abwasserstrom bis ca. 3 m<sup>3</sup>/h und einen CSB-Konzentrationsbereich bis ca. 5 g/L beschränkt sind. Eine Verdünnung des Abwassers ist nicht sinnvoll und teilweise auch nicht erlaubt [16].

Die stärkste Oxidationskraft der in Abschnitt 2.1 genannten Oxidationsmittel besitzt das OH-Radikal ( $E_0 = 1,90 - 2,80$  V [41, 42]), welches prinzipiell mit allen oben aufgeführten Prozessen *in-situ* erzeugt werden kann. Wird diese Erzeugung bewusst durch die Wahl der Parameter verstärkt, spricht man auch von *Advanced Oxidation Processes*, oder *Aktivierten Oxidationsverfahren* (AOP). Im folgenden soll kurz auf die Oxidationsprozesse Ozonung (O<sub>3</sub>, O<sub>3</sub>/UV), Peroxon-Verfahren (O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verfahren sowie die photochemisch beschleunigte Fenton-Reaktion (Fe<sup>2+</sup>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV) eingegangen werden. Diese können bei gemäßigten Bedingungen durchgeführt werden und können so eine Alternative zu den Nassoxidationsverfahren darstellen. Ebenso können damit physikalisch-chemische Prozesse wie Membranverfahren oder Adsorptionsverfahren ersetzt werden. Membran- und Adsorptionsverfahren bewirken keine Zerstörung der unerwünschten Stoffe, sondern nur eine Abtrennung oder Überführung in eine andere Phase, womit das Problem der Entsorgung verlagert wird [43, 44]. Weiterhin können Oxidationsprozesse als zusätzlicher Aufbereitungsschritt in der Abwasserbehandlung eingesetzt werden, wenn die in Abschnitt 2.1 aufgeführten Kriterien für ein chemisch-biologisches Kombinationsverfahren erfüllt sind und keine wirtschaftlichen Gründe dagegen sprechen.

### 2.2.1 Ozonbasierte Oxidationsverfahren

**Ozonung** Die chemische Struktur von Ozon im Grundzustand kann mit den in Abbildung 2.1 aufgeführten Resonanzstrukturen angegeben werden [45]. Das Re-

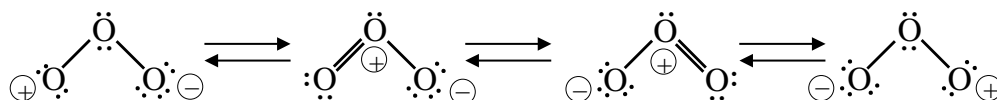


Abbildung 2.1: Resonanzstrukturen von Ozon. Nach [45].

Redoxpotenzial von Ozon beträgt  $E_0 = 2,07 \text{ V}$  [42].

Ozon kann in wässriger Lösung folgende Reaktionen eingehen [45, 46]:

- Elektronen-Transfer-Reaktionen, z.B.:



- O-Atom-Transfer-Reaktionen, z.B.:



- Ozon-Additions-Reaktionen, z.B. an Olefine (Criegee-Mechanismus)

Alkane und gesättigte Alkohole reagieren mit Ozon nur mit sehr niedrigen Reaktionsraten, ebenso Benzol, Pyren, Pyridin und Kohlehydrate. Substituenten an Benzolringen wie Methyl- oder Methoxygruppen aktivieren den aromatischen Ring für elektrophile Angriffe des Ozons [45, 46]. Ebenso reagiert Phenol bei hohen pH-Werten, wo es hauptsächlich als Phenolation vorliegt ( $pK_s = 9,9$ ), sehr schnell mit Ozon über eine Elektronen-Transfer-Reaktion, so dass diese Reaktion als diffusionskontrolliert eingestuft werden kann. Als organische Oxidationsprodukte von Ozonreaktionen werden z.B. Glyoxylat, Maleinat, Oxalat, Acetat und Formiat gefunden [45, 47, 48, 49]. Außer Formiat reagieren diese Stoffe nur sehr langsam mit Ozon, so dass es zu einer Anreicherung dieser Komponenten im ozonten Wasser kommen kann.

Die Zersetzung von Ozon in Wasser bewirkt die Bildung einer Vielzahl weiterer Oxidationsmittel, wie z.B. die des OH-Radikals. Die Selbstzersetzung sowie die Bildung von OH-Radikalen wird durch die Anwesenheit von Hydroxid-Ionen beschleunigt, so dass bei höheren pH-Werten die Reaktionsmechanismen dieser sekundären Oxidationsmittel überwiegen können. In Abbildung 2.2 ist die Zersetzung des Ozons in wässriger Lösung dargestellt, die zu einer Radikal-Kettenreaktion führen kann.

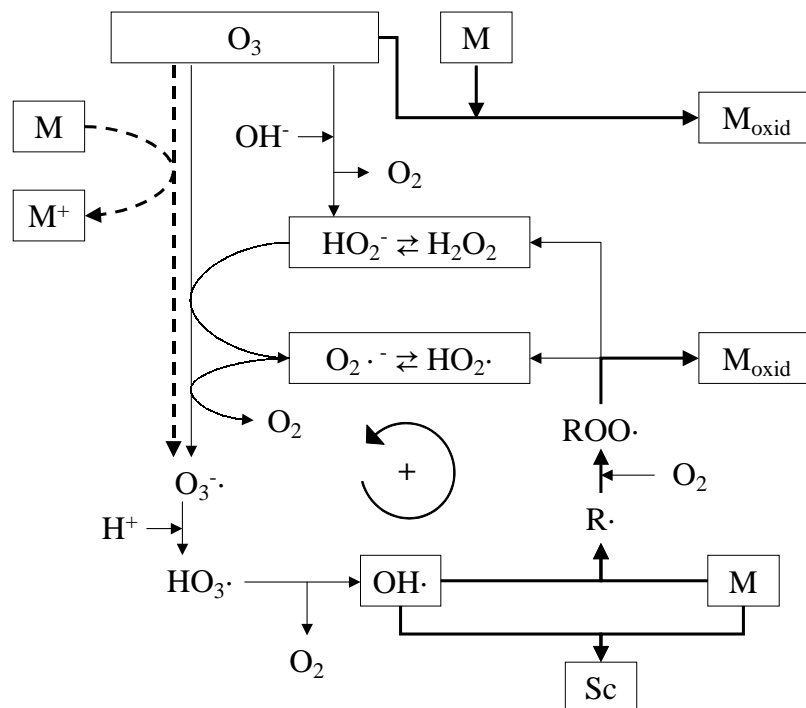


Abbildung 2.2: Reaktionen von Ozon in wässriger Lösung in Anwesenheit von Wasserinhaltsstoffen, die über Elektronen-Transfer-Reaktionen oder direkter Reaktion mit Ozon reagieren.  $M$  = Wasserinhaltsstoff,  $R^{\cdot}$ ,  $ROO^{\cdot}$  = Radikale als Radikalkettenbeschleuniger,  $Sc$  = Produkte aus Reaktionen mit Radikalfängern (*scavenger*). Nach [45].

Das im Ozonzerfallsprozess gebildete Wasserstoffperoxid stellt eine Art Reservoir für die dissoziierte Form  $HO_2^-$  dar, welches schnell mit Ozon unter Bildung von  $O_3^{\cdot-}$  und  $HO_2^{\cdot}$  reagiert (s. Gleichung 2.1). Das schwache Säure/Base-Paar  $O_2^{\cdot-}/HO_2^{\cdot}$  überträgt ein Elektron auf  $O_3$ , wobei zusätzlich  $O_3^{\cdot-}$  entsteht, welches als schwaches Oxidationsmittel angesehen wird. Dieses bildet jedoch  $OH$ -Radikale, welche in der Lage sind, eine Vielzahl von Substanzen zu oxidieren. Die Radikalkette wird dadurch geschlossen, dass  $OH$ -Radikale mit Ozon wiederum  $HO_2^{\cdot}$  bilden. Am Beispiel des Herbizids Atrazin lässt sich zeigen, wie der Radikalkettenmechanismus die Oxidationswirkung gegenüber der reinen Ozonreaktion verbessert. So liegt die Reaktionskonstante des Atrazins mit  $HO^{\cdot}$  bei  $k = 2,1 \cdot 10^9 M^{-1}s^{-1}$ , mit Ozon bei nur  $k = 5,6 M^{-1}s^{-1}$  [50].

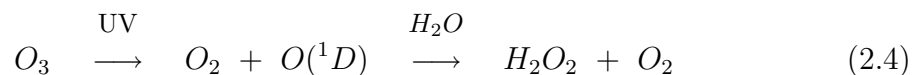
Die Anwesenheit von Wasserinhaltsstoffen kann zu verschiedenen Reaktionen

mit den Zwischenprodukten der Radikalkette führen. Neben der oben beschriebenen direkten Reaktion des molekularen Ozons mit den Wasserinhaltsstoffen können diese mit OH-Radikalen Peroxylradikale bilden ( $\text{ROO}\cdot$ ), wobei im weiteren wiederum  $\text{O}_2^- \cdot / \text{HO}_2 \cdot$  entsteht, was die Radikalkettenreaktion fördert (s. auch Abschnitt 2.2.2). Demgegenüber können bestimmte Wasserinhaltsstoffe wie  $\text{HCO}_3^- / \text{CO}_3^{2-}$  oder bestimmte Alkane, Alkylalkohole oder Alkylcarboxylsäuren OH-Radikale abfangen, ohne dabei Zwischenprodukte der Radikalkette zu bilden. Diese Stoffe werden auch als *scavenger* bezeichnet.

**Ozonung kombiniert mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  oder UV-Strahlung** Um die Ausbeute an OH-Radikalen bei der Ozonung zu erhöhen, ist eine Erhöhung des pH-Wertes sinnvoll, wie oben beschrieben. Eine Zugabe von Wasserstoffperoxid oder die Bestrahlung mit UV-Licht bewirkt ebenfalls, dass vermehrt OH-Radikale gebildet werden. Im Falle von  $\text{H}_2\text{O}_2$  ist dies anhand von Abbildung 2.2 gut zu erkennen. Die Schlüsselreaktion dieses kombinierten Prozesses stellt somit folgende Reaktion dar:



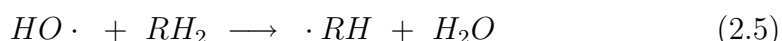
Wird UV-Strahlung zusätzlich zur Ozonung eingesetzt, wird  $\text{O}_3$  nach Gleichung 2.4 zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  umgesetzt, wobei durch Photolyse von  $\text{O}_3$  Sauerstoff sowie ein angeregtes O-Atom entsteht, welches in wässriger Lösung zu  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert.



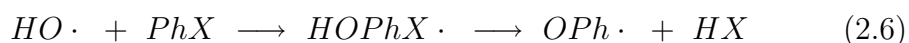
Ozon besitzt im UV-Bereich einen relativ hohen Absorptionskoeffizienten ( $\epsilon_{254\text{nm}} = 3150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [45]), was einen Vorteil gegenüber dem UV/ $\text{H}_2\text{O}_2$ -Verfahren darstellt (s. Abschnitt 2.2.2). Das durch die Photolyse des Ozons und Addition von Wasser entstandene  $\text{H}_2\text{O}_2$  reagiert entsprechend Gleichung 2.3 und bewirkt somit die Aufrechterhaltung des Radikalkettenmechanismus. Das im Oxidationsprozess eines Abwassers optimale Verhältnis von Ozon zu Wasserstoffperoxid muss in den meisten Fällen empirisch bestimmt werden, da dies von der Zusammensetzung des Abwassers abhängt [45]. Wird beim  $\text{O}_3/\text{UV}$ -Verfahren der pH-Wert zu niedrig oder die UV-Intensität zu hoch gewählt, kann eine Anreicherung von  $\text{H}_2\text{O}_2$  auftreten, da dieses dann schneller gebildet wird, als es mit Ozon abreagiert. Nachteil von Ozon ist seine geringe Löslichkeit in Wasser und damit verbunden das Problem des Massetransfers beim Gas/Flüssigkeit-Übergang.

Die gebildeten OH-Radikale reagieren sehr schnell und unselektiv mit einer Vielzahl von Abwasserinhaltsstoffen, insbesondere mit organischen Substanzen mittlerer und höherer Molekülmassen, deren Reaktionsraten als diffusionskontrolliert bezeichnet werden können [46]. Kleinere Moleküle mit einem höheren Oxidationsgrad wie Acetat und Oxalat besitzen dagegen etwas niedrigere Reaktionsraten. Halogenierte Substanzen besitzen zum Teil sehr geringe Reaktionsraten mit OH-Radikalen. Als Radikalfänger wirkt z.B. Carbonat, so dass bei steigendem pH-Wert dieser Effekt zunimmt. Die Reaktionen des OH-Radikals mit organischen Stoffen lassen sich in folgende Klassen einteilen [42]:

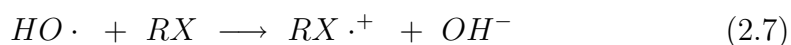
- Wasserstoffabstraktion:



- Elektrophile Substitution (z.B. Dehalogenierung chlorierter Phenole):



- Elektronen-Transfer:



Das entstandene RH-Radikal ( $\cdot RH$ ) in Gleichung 2.5 reagiert mit gelöstem Sauerstoff weiter zu  $RHO_2\cdot$  (s. Gleichung 2.8), welches weitere Reaktionsschritte initiiert, die zum Abbau der organischen Stoffe beitragen [42]:



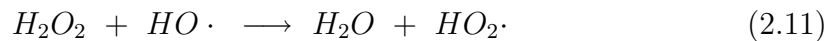
### 2.2.2 UV-basierte Oxidationsverfahren

**UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verfahren** Die Photolyse des Wasserstoffperoxids führt zur Spaltung des Moleküls und in Summe zur Bildung zweier OH-Radikale (s. Gleichung 2.9).



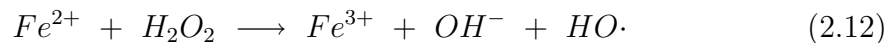
Vorteil dieses Verfahrens zur OH-Radikalproduktion ist die hohe Löslichkeit des Wasserstoffperoxids in Wasser sowie seine einfache Dosiermöglichkeit. Demgegenüber steht jedoch der geringe molare Absorptionskoeffizient des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 254 \text{ nm}$  von  $\epsilon_{254nm} = 18,6 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  [51]. Eine Erhöhung

der  $H_2O_2$ -Konzentration würde zwar eine Verbesserung der OH-Radikal Produktion bewirken, jedoch sind dabei *scavenger*-Reaktionen des  $H_2O_2$  möglich (s. Gleichungen 2.10 und 2.11). Diese können die Oxidationswirkung des Prozesses erniedrigen [42, 52], weshalb die optimale  $H_2O_2$ -Konzentration für jeden Oxidationsprozess angepasst werden sollte.

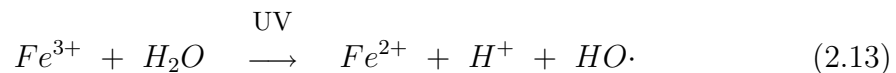


Das Hydroperoxylradikal  $HO_2\cdot$  ist ein schwächeres Oxidationsmittel als das OH-Radikal und kann nicht wie bei ozonbasierten Prozessen zur Aufrechterhaltung des Radikalkettenmechanismus dienen (s. Abbildung 2.2). Enthält das zu behandelnde Abwasser eine hohe Eigenabsorption bei  $\lambda = 254$  nm, so spricht man vom *inner filter effect*, der die Effektivität des UV/ $H_2O_2$ -Verfahrens deutlich herabsetzt. Die Bestrahlung bei Wellenlängen im Bereich von  $\lambda = 210 - 240$  nm kann die OH-Radikal-Bildung verbessern, da hier  $H_2O_2$  einen höheren molaren Extinktionskoeffizienten besitzt [42]. Ein wichtiger Faktor beim UV/ $H_2O_2$ -Verfahren ist die Sauerstoffsättigung im Wasser, da sonst die Bildung von  $RHO_2\cdot$  ausbleibt (s. Gleichung 2.8) und Polymerisationsreaktionen auftreten können [42]. Die Effektivität des UV/ $H_2O_2$ -Verfahrens kann bei hohen pH-Werten und Anwesenheit von Carbonat deutlicher verringert sein als z.B. bei der Ozonung, da dort der *scavenging*-Effekt von Carbonat durch die verstärkte OH-Radikalbildung ausgeglichen werden kann (s. 2.2.1) [44].

**Photo-Fenton Reaktion** Die Grundlage der photochemisch beschleunigten Fenton-Reaktion ist das Fenton-Reagenz ( $Fe^{2+}/H_2O_2$ ), welches in wässriger Lösung die Bildung von OH-Radikalen bewirkt (s. Gleichung 2.12 [53, 54, 52]).



Der Einsatz von UV-Strahlung bewirkt nach Gleichung 2.13 die Regenerierung von  $Fe^{2+}$ , was erlaubt, die eingesetzte Menge an  $Fe^{2+}$  im Fenton-Prozess zu erniedrigen:



Gleichung 2.12 ist eine Vereinfachung des wahren Reaktionsmechanismus, da bei der Erzeugung der OH-Radikale vermutlich hydratisierte  $Fe^{4+}$ -Ionen eine wichtige Rolle spielen [54]. Die Regeneration des  $Fe^{2+}$  kann nicht nur durch UV-Licht, sondern auch durch Licht im sichtbaren Wellenlängenbereich erfolgen [54], was den Einsatz des

Fenton-Prozesses auch bei solarer Bestrahlung attraktiv macht [39, 53, 55]. Nachteilig kann sich auswirken, dass das Optimum der Fenton-Reaktion bei einem pH-Wert von 3 liegt, wodurch ggf. sowohl vor der Oxidation als auch für ein nachfolgendes biologisches Verfahren eine pH-Wert Einstellung vorgenommen werden muss.

### 2.2.3 Anwendung chemisch-biologischer Abwasserbehandlung

Die undefinierte Zusammensetzung vieler Abwässer lässt eine detaillierte Analyse über den Abbau der organischen Belastung selten zu. Dies ist nur dann möglich, wenn eine Substanz die Hauptkomponente darstellt. Hierfür werden viele Untersuchungen mit Modellabwässern durchgeführt, um das Verhalten dieser vorherrschenden Substanz bei verschiedenen Oxidationsverfahren zu untersuchen. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass auch die Matrixeffekte im Realabwasser bei der Übertragung der Versuchsergebnisse berücksichtigt werden müssen, wie zum Beispiel der störende Einfluss von Carbonat bei der Anwendung von AOP [44]. In den meisten Fällen ist bei der Behandlung realer Abwasserströme die Messung verschiedener Summenparameter wie CSB, DOC, SAK oder BSB als Orientierung sinnvoll [56]. Weiterhin kann die Bildung von toxischen Zwischen- oder Endprodukten mit Hilfe biologischer Testverfahren wie Toxizitätstests quantifiziert werden.

#### 2.2.3.1 Anwendung im Bereich industrieller Abwässer

Die Anwendung von Ozon ist besonders für gefärbte Abwässer erfolgreich, die z.B. in Färbereien und der Textilindustrie anfallen [44, 49, 57, 58]. Weiterhin gibt es Untersuchungen zur Behandlung von Gerbereiabwässern [59], Papier- und Zellstoffabwässern [23, 60, 61, 62], Abwässern aus der Melasseverarbeitung [63], der Behandlung von Oliven [64] und Ölschiefer [65], pharmazeutischen Abwässern [29] sowie von speziellen Substanzen wie z.B. Chlor- und Nitroaromaten [66], Dioxan [30], Pyridinen [47], Paracetamol [67], Phenol [68] oder Dichlorbuten [69]. Eine Kopplung von  $O_3$ /UV-Oxidation und Ionenaustauschverfahren wurde erfolgreich zur Behandlung von Cyanid im Abwasser angewendet, indem das bei der Oxidation entstandene Cyanat durch Ionenaustausch ohne Entstehung gefährlicher Cyan-Gase aus dem Abwasser entfernt wurde [70]. Eine Übersicht zur kombiniert chemisch-biologischen Abwasserbehandlung wird z.B. in [1, 3, 56] gegeben, und für die industrielle Anwendung von Ozon in [71, 72].

#### 2.2.3.2 Beobachtungen und Ergebnisse

Die Ergebnisse, die bei vergleichenden Untersuchungen verschiedener aktivierter Oxidationsverfahren erzielt wurden, zeigten, dass bedingt durch die individuellen

Eigenschaften der Abwässer jeweils eine gezielte Anpassung des Oxidationsprozesses erfolgen musste. Bei der Behandlung von Dichlorbuten zeigte sich zum Beispiel, dass die Ozonung bei niedrigen pH-Werten, wo die direkte Reaktion des Ozons bevorzugt war, bessere Abbaugerichte lieferte als bei Bedingungen, die den OH-Radikalkettenmechanismus förderten [69]. Demgegenüber zeigte die Ozonung eines Färbegrad-Abwasser [44], dass hohe pH-Werte eine Verbesserung des Abbaus bewirkten, wobei dabei der *scavenging*-Effekt durch erhöhte Carbonatkonzentrationen berücksichtigt werden musste. Mit Hilfe von UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation wurden beim selben Abwasser ebenfalls gute Abbauleistungen erzielt. Dass diese Ergebnisse jedoch nicht unbedingt auf andere Färberei-Abwässer übertragbar sind, zeigte sich bei [43], wo das UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verfahren weniger effizient war als die Behandlung mit O<sub>3</sub>/UV oder Photo-Fenton.

Es kann festgestellt werden, dass häufig diejenigen Verfahren die höchsten Abbauraten ergaben, in denen OH-Radikale effektiv gebildet wurden, d.h. durch Ozonung bei höheren pH-Werten [29, 63, 68], der Kombination O<sub>3</sub>/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [29, 30, 31] oder der (Photo-) Fenton-Reaktion [35, 40, 53, 68, 73]. Dagegen waren UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verfahren meist aufgrund des *inner filter effects* der Realabwässer (s. 2.2.2) in ihrer Anwendung begrenzt. Das O<sub>3</sub>/UV-Verfahren zeigte nur selten eine deutliche Verbesserung des Prozesses im Vergleich zur reinen Ozonung, meist war der zusätzliche Einsatz der UV-Strahlung nicht gerechtfertigt [68]. In [36] wurde gezeigt, dass nach O<sub>3</sub>/UV-Behandlung eines Textilabwassers eine vollständige Inhibierung des biologischen Abbaus erfolgte, wohingegen bei der reinen Ozonung eine Verbesserung der biologischen Abbaubarkeit auftrat. Dieser Effekt konnte nicht durch Entstehung toxischer Substanzen erklärt werden. Dies zeigt die Notwendigkeit an, den chemischen Schritt nicht für sich alleine, sondern nur in Verbindung mit dem nachfolgenden biologischen Abbau zu betrachten. Dies spielt verstärkt dort eine Rolle, wo im kontinuierlichen Betrieb oder im Kreislaufverfahren die beiden Prozesse direkt miteinander gekoppelt werden [47, 57, 60, 61, 74], da nicht nur toxische Stoffe den biologischen Abbau stören können, sondern auch Parameter wie der pH-Wert oder die Sauerstoffversorgung einen großen Einfluss haben [48]. Demgegenüber kann aber auch die biologische Stufe Oxidationszwischenprodukte entfernen, die die Effektivität des chemischen Oxidationsprozesses herabsetzen würden [48]. Für diese Kreislaufverfahren werden meist biologische Säulenreaktoren mit einem Festbett verwendet, in dem die Mikroorganismen in Biofilmen angesiedelt sind (s. auch Abschnitte 2.3.1 und 2.3.2).

Eine Bewertung der Oxidationsverfahren kann z.B. über die Angabe des Oxidationsmittelbedarfs pro entferntem CSB oder DOC erfolgen (Summe (Ox.-mittel)/ $\Delta$ CSB in g/g, s. Abschnitt 2.2.5) [74] oder mit Hilfe des EE/O-Wertes (*electrical energy required per order of pollutant removal in 1 m<sup>3</sup> wastewater*), der den Energiebedarf berücksichtigt [44].



### 2.2.4 Abwässer aus der Produktion optischer Aufheller

In dieser Arbeit wurden unter anderem Abwässer aus der Produktion der Vorläufersubstanz der optischen Aufheller Dinitrostilbendisulfonsäure (DNS) sowie aus der Produktion der optischen Aufheller Tinopal UP und Tinopal DMS untersucht. Optische Aufheller werden sowohl in der Textil- und Papierindustrie als auch in Waschmitteln verwendet [75, 76, 77]. Deswegen sind sie in vielen industriellen und kommunalen Abwässern vorhanden. Die Synthese erfolgt über eine Oxidation von 4-Nitrotoluol-2-Sulfonsäure zu 4,4-Dinitrostilben-2,2-disulfonsäure (DNS), welche zu 4,4-Diaminostilben-2,2-Disulfonsäure (DAS) reduziert wird. Danach reagiert Cyanurchlorid mit den Aminogruppen. Weitere Reaktionen mit Anilin, Morpholin oder Diethanolamin führen zum fertigen Produkt [78].

Optische Aufheller auf Stilben-Basis existieren in wässriger Lösung in zwei isomeren Strukturen, dem (E)- und dem (Z-) Isomer, wobei letzteres das nicht-fluoreszierende Isomer darstellt. Thermische Isomerisierung kann hierbei vernachlässigt werden im Gegensatz zur Photoisomerisierung, die in der Umwelt eine große Rolle spielt [79, 80, 81]. Optische Aufheller absorbieren Licht im UV-Bereich und emittieren Licht im Bereich von  $\lambda = 400$  bis 480 nm. Sie unterliegen nur einem geringen biologischen Abbau, so dass sie Kläranlagen passieren und in die Umwelt gelangen können. Ein Teil kann jedoch durch Adsorption an Biomasse mit ihr aus dem Abwasser entfernt werden [82, 83]. Toxische Effekte wurden bei optischen Aufhellern bisher nicht festgestellt [76, 82]. In der Umwelt, insbesondere in Oberflächengewässern, ist ein Großteil des Abbaus der optischen Aufheller photochemischen Reaktionen zuzuschreiben, v.a. der Spaltung der Ethylen-Bindung, wobei durch Addition von Sauerstoff oder Hydroxylionen Aldehyde und Alkohole und im weiteren Carboxyle als Reaktionsprodukte entstehen können [84, 85]. Im Gegensatz zur vernachlässigbaren biologischen Abbaubarkeit der optischen Aufheller sind die Reaktionsprodukte besser biologisch abbaubar [86]. Jedoch zeigte die oxidative Behandlung von Tinopal DMS in einer  $\text{TiO}_2$ -Suspension keine derartige Verbesserung [87]. Die oxidative Behandlung von Tinopal UP und Tinopal DMS durch Ozon und OH-Radikale führt zur Bildung von Cyanursäure, Ammelin, Ammelid und Melamin [88].

Die in dieser Arbeit verwendeten Abwässer werden bei der Ciba Spezialitätenchemie, Grenzach, mit Hilfe des Hochdruckoxidationsverfahrens behandelt (s. Abschnitt 2.2), bevor sie in eine betriebsinterne Kläranlage geleitet werden.

### 2.2.5 Reaktoren für die chemische Oxidation

Zur Ozonung im halbtechnischen Maßstab werden hauptsächlich Blasensäulen oder Rührreaktoren verwendet. Der Stoffübergang, d.h. der Ozoneintrag in das Wasser, ist dabei bei Rührreaktoren wesentlich höher. Der Stoffübergangskoeffizient für Ozon ( $k_L a$ -Wert) liegt für diese Reaktoren im Bereich von 0,8 bis  $13 \text{ h}^{-1}$  [89]. Injekti-

Tabelle 2.1: Charakteristische Kenndaten für den Betrieb von Ozonreaktoren.

Parameter	Einheit	Beschreibung
Ozondosis	$\text{mgL}^{-1}\text{s}^{-1}$	ins Abwasservolumen eingebrachte Ozonmasse pro Zeit
spez. Ozondosis	g/g	Ozondosis über die gesamte Reaktionszeit in Bezug auf die Konzentration des Abwassers (z.B. DOC- oder CSB-Konzentration)
Ozoneintragseffizienz	%	Verhältnis von abreagiertem Ozon zur Gesamteintragsmasse an Ozon
Ozонаusbeutekoeffizient	g/g	benötigte Ozonmasse pro Einheit von entferntem DOC oder CSB

onsdüsen mit erhöhtem Gasdruck können den Eintrag von Ozon ins Wasser weiter verbessern. Der  $k_L a$ -Wert setzt sich zusammen aus dem Massetransferkoeffizient auf der Seite der Flüssigkeit  $k_L$  (Übergang gas-flüssig, Index  $L = liquid$ ) und der volumenbezogenen Grenzfläche  $a$  ( $a = A/V$ ). Da diese Grenzfläche nur schwer zu bestimmen ist, wird der  $k_L a$ -Wert als ein zusammengefasster Parameter gemessen (s. auch Abschnitt 3.2.2). Weitere Kenndaten für die Charakterisierung von Ozonreaktoren sind in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Bei der industriellen Anwendung, wo mit hohen Gasvolumenströmen gearbeitet werden muss, werden Injektionsdüsen verwendet, die hohe Stoffübergangsraten erzielen können [89]. Zur Vermeidung der Schaumbildung können auch Reaktoren verwendet werden, die Ozon über Gasdiffusoren (z.B. Membranen, Keramik) in das Wasser einbringen [90]. Ihr Einsatz im Abwasser kann jedoch problematisch sein, da die Poren verstopfen können [89].

Für Bestrahlungsversuche mit UV-Licht können einfache UV-Lampen mit einem Hüllrohr aus Quarzglas in das Abwasser eingetaucht werden. Bei stark absorbierenden Abwässern (*inner filter effect*, s. Abschnitt 2.2.2) sollten aber Reaktoren konstruiert werden, die eine Bestrahlung geringer Schichtdicken ermöglichen, um insbesondere bei Einsatz von Wasserstoffperoxid eine verbesserte OH-Radikal Produktion zu erreichen. Spezielle Bestrahlungsreaktoren werden für das UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verfahren [91], das Photo-Fenton-Verfahren [53, 91] wie auch für die heterogene Photokatalyse mit Titandioxid [39, 53, 92] eingesetzt. Die Nutzung solarer Strahlung ist insbesondere für sonnenreiche Gebiete interessant.

## 2.3 Biologische Behandlungsverfahren

Die technische Nutzung biologischer Prozesse zur Abwasserbehandlung ist kostengünstig und umweltfreundlich. Dabei wird das Stoffwechsellpotenzial von Mikroorganismen in einem technischen System genutzt, welches zeitlich und räumlich begrenzt ist [5]. Durch die geeignete Wahl der Betriebsparameter wird erzielt, dass in der Natur langsam ablaufende Prozesse innerhalb relativ kurzer Zeit ablaufen und es können sich Mikroorganismen im System etablieren, die niedrige Vermehrungsraten aufweisen.

### 2.3.1 Reaktoren für die biologische Abwasserbehandlung

Der sowohl für kommunales wie auch für industrielles Abwasser am häufigsten eingesetzte Prozess ist das Belebungsverfahren [93, 94]. Unter aeroben Bedingungen wird hier ein Großteil der biologisch verwertbaren Substanzen verstoffwechselt, d.h. mineralisiert, in Biomasse umgewandelt oder zum Energiestoffwechsel verwendet. Neben der Elimination organischer Verbindungen sind Umsätze von Stickstoff-, Phosphor- und Schwefel-Verbindungen weitere wichtige Prozesse (s. auch 2.6.4). Zusätzlich können zum Belebungsbecken anoxisch betriebene Becken zugeschaltet sein, die Umsätze unter sauerstofflimitierten Bedingungen mit Nitrit/Nitrat als Elektronenakzeptor ermöglichen. Zur Verbesserung der einzelnen Eliminationsprozesse können je nach Abwassercharakteristik mehrere verschiedene Prozesse hintereinander oder im Kreislauf geschaltet sein [93]. Anaerobe Abschnitte (kein  $O_2$ , kein  $NO_2^-$  oder  $NO_3^-$  vorhanden) sind besonders für die Phosphatelimination wichtig, wo auch sehr niedrige Konzentrationen an Sauerstoff und Nitrit/Nitrat störend wirken können [93]. Weiterhin sind anaerobe Prozesse für den Abbau vieler Stoffe wichtig, wie z.B. Cellulose, aber auch Proteine, Kohlehydrate und Fette, die in komplexen Abbauvorgängen durch extrazelluläre Enzyme zuerst hydrolysiert und anschließend vergoren werden. Als Gärungsprodukte (Fermentationsprodukte) entstehen z.B. Methan, Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff, Alkohole und organische Säuren [5, 95]. Ebenso sind chlorierte Kohlenwasserstoffe, chlorierte Phenole, Aromaten und verschiedene Xenobiotika anaerob metabolisierbar [96, 97]. Anaerobe Prozesse haben den Vorteil, dass Methan als Biogas gewonnen werden kann, der Energieverbrauch niedrig ist (keine Begasung nötig) sowie wenig Überschussschlamm gebildet wird [5].

Speziell für den Bereich der Industrieabwasserbehandlung existieren viele weitere Variationen von Bioreaktoren. Dabei werden häufig nicht suspendierte Mikroorganismen, wie im Belebungsverfahren und anderen Rührreaktoren der Fall, sondern auf Aufwuchsflächen immobilisierte Mikroorganismen eingesetzt (Biofilme). Ein einfaches Beispiel stellt der Tropfkörper dar, der auch in der kommunalen Abwasserbehandlung eingesetzt wird, bei dem mit Hilfe eines Drehsprengers das Abwasser auf das Tropfkörper-Füllmaterial aufgesprüht wird [5]. Innerhalb eines Tropfkörpers

können sich mehrere Zonen mit unterschiedlichen Nährstoffbedingungen ausbilden, so dass viele verschiedene Stoffwechselfvorgänge ablaufen können. Für die Behandlung höher belasteter Abwässer werden Turmtropfkörper eingesetzt [98]. Weitere Festbettreaktoren sind Tauchfilter und Fließbettreaktoren [93, 99]. Als weiterentwickeltes Suspensionsverfahren werden sog. *airlift*-Reaktoren eingesetzt [93].

Eine Optimierung von Biofilmreaktoren kann durch Art des Aufwuchsmaterials erreicht werden, z.B. durch Einsatz von Aktivkohle, welches als Katalysator zur Zersetzung toxischer Peroxide dienen kann [100] oder die Adsorption bestimmter Stoffe ermöglicht, die anschließend biologisch abgebaut werden können [101]. Ebenso können gasdurchlässige Kunststoffschläuche als Aufwuchsmaterial dienen, die eine verbesserte Versorgung der Mikroorganismen mit Sauerstoff ermöglichen [102].

### 2.3.2 Biologische Abbauvorgänge

Grundsätzlich bestehen vielfältige Möglichkeiten, wie organische Substanzen biologisch abgebaut oder verwertet werden können. Neben den Einflussfaktoren wie Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, pH-Wert und Temperatur spielen insbesondere Vorgänge zwischen den einzelnen Vertretern der Mikroorganismen sowie die Art und Zusammensetzung der organischen Substanzen eine wichtige Rolle:

- **Cometabolismus** Wenn eine Population eine Substanz gleichzeitig mit dem eigentlichen Substrat abbaut, ohne daraus selbst direkten Nutzen zu ziehen, wird dies als Cometabolismus bezeichnet. Viele Xenobiotika können so zumindest teilweise abgebaut werden und so als Substrat für andere Populationen dienen, die diese Zwischenprodukte weiter nutzen können [96, 103].
- **Kommensalismus** Ausgehend vom Cometabolismus wird als Kommensalismus bezeichnet, wenn eine Population von der Stoffwechselfleistung einer anderen profitiert, letztere davon aber weder einen Nutzen noch negative Auswirkungen erfährt [103].
- **Synergismus** Hierbei profitieren zwei (oder mehr) Populationen (Consortien) von der jeweiligen Stoffwechselfleistung der anderen. Dies ist auch der Fall, wenn beispielsweise eine Population A das Stoffwechselprodukt einer Population B, welches bei Anreicherung im System inhibierend für Population B wäre, weiter verstoffwechselt [103].

Im Falle der Nitrifikation wurde z.B. beobachtet, dass diese einen cometabolischen Abbau refraktärer Stoffe bewirkt oder Cosubstrate für heterotrophe Mikroorganismen liefern kann, was eine Verbesserung des Gesamtabbaus mit sich bringt [101]. Das Zusammenspiel von Bakterien ist insbesondere in Biofilmen ausgeprägt, was in den in Abschnitt 2.3.1 beschriebenen Festbettreaktoren ausgenutzt werden kann.

Weiterhin bietet die Ansiedelung in Biofilmen für die Mikroorganismen folgende Vorteile [104]:

- Verbesserung der Nährstoffverfügbarkeit durch die Adsorption von Nährstoffen an die Biofilmmatrix, die hauptsächlich aus extrazellulären polymeren Substanzen (Polysaccharide, Proteine, Glyco- und Lipoproteine) und Wasser besteht.
- Schaffung ökologischer Nischen und Ansiedelung von Spezialisten.
- Schutz vor Störeinflüssen wie pH-Wert, Salzbelastung oder toxische Stoffe [102].

Ebenso spielt die Bioverfügbarkeit der Substanzen eine wichtige Rolle. Darunter sind die spezifischen Eigenschaften eines Stoffes hinsichtlich seiner prinzipiellen Verwertbarkeit durch Mikroorganismen zu verstehen, d.h. wie die Mikroorganismen Zugang zum verwertbaren Substrat haben [96]. Dabei sind Wasserlöslichkeit, Membrangängigkeit und Adsorptionsverhalten der Stoffe von großer Bedeutung, weiterhin die Fähigkeit von Mikroorganismen, nicht-membrangängige Stoffe extrazellulär in kleinere, membrangängige Stoffe umzusetzen oder durch synergistische Effekte einen Abbau der Substanz zu erreichen. Ebenso kann beobachtet werden, dass sich Mikroorganismen einem Substrat anpassen können, d.h. sie entwickeln die Fähigkeit, ein Substrat zu verwerten oder sie stellen ihren Stoffwechsel auf das neue Substrat um, indem die entsprechenden Enzyme induziert werden. Dies wird auch als Akklimatisation oder Adaptation bezeichnet (s. Abschnitt 2.4.1). Ebenso kann es in der Adaptationsphase zur Selektion von Spezialisten kommen.

## 2.4 Biologische Bewertungsmethoden in der Abwasserbehandlung

Um die Effektivität einer chemischen Vorbehandlung eines Abwassers zu beurteilen, ist nicht nur die Messung der chemisch-physikalischen Parameter wichtig, sondern auch die Beurteilung der Auswirkungen auf ein biologisches System. Neben den in Abschnitt 2.4.4 behandelten Toxizitätstests sind die biologischen Abbautests das wichtigste Beurteilungskriterium. Toxizitäts- und Abbautests sind nicht immer klar voneinander abzugrenzen. Bei Abbautests kann zwar auch auf toxische Wirkungen des Abwassers geschlossen werden, bei nicht-toxischen Proben kann aber nicht automatisch eine gute biologische Abbaubarkeit angenommen werden.

### 2.4.1 Statische Abbautests

Der klassische biologische Abbautest ist der Biochemische Sauerstoffbedarf (BSB), der über einen Zeitraum von 5 Tagen ( $BSB_5$ ) gemessen wird [4, 5]. Dieser kann z.B. nach der Verdünnungsmethode gemessen werden (DIN 38409 H51). Hierbei wird das Abwasser in verschiedenen Verdünnungsstufen mit einem Inokulum inkubiert, und es wird der Sauerstoffverbrauch über die Verdünnungsstufe aufgetragen. Bei Abweichungen von der Linearität kann auf die Anwesenheit hemmender Substanzen geschlossen werden. Zu beachten ist dabei, dass der BSB bei dieser Methode unterhalb der Löslichkeitskonzentration des Sauerstoffs liegt (bei 20 °C ca. 9 mg/L), was die richtige Wahl der Verdünnungsstufen bei unbekanntem Proben erschwert. Zur Vermeidung der Sauerstofflimitierung kann mit Respirometern gearbeitet werden, die in einem Sapromat angeordnet sein können. Verbrauchter Sauerstoff wird dabei mit Hilfe von Elektrolysezellen nachgeliefert, so dass über längere Zeiträume auch hohe Sauerstoffverbrauchskurven aufgenommen werden können. Wichtige Faktoren bei diesen Messungen sind die Herkunft und das Alter des verwendeten Bakterieninokulums, die Konzentration verschiedener Nährsalze, die Testbedingungen und die Testdauer [105, 106]. Letztere kann zwischen 5 und 28 Tagen betragen, aber auch beliebig verlängert werden.

Eine typische Wachstumskurve im statischen Abbautest (auch: *batch*-Versuch) kann in vier verschiedene Phasen eingeteilt werden: Adaptationsphase, exponentielle Wachstumsphase, stationäre Phase (Plateauphase) und Absterbephase [107]. Die Dauer und der Verlauf insbesondere der beiden erst genannten kann sich bei unterschiedlichen Animpfkulturen (meist Belebtschlamm aus kommunalen oder industriellen Kläranlagen) deutlich unterscheiden [108]. Ausschlaggebend ist hier, ob das Inokulum bereits an das Abwasser adaptiert ist oder nicht.

Der Abbau von Substanzen kann nicht nur über den biochemischen Sauerstoffbedarf, sondern auch durch direkte Messung des CSB, TOC- bzw. DOC-Abbaus verfolgt werden. Diese Testdurchführung wird nach ihren Erfindern Zahn-Wellens-Test genannt, der sich zur Messung der aeroben biologischen Abbaubarkeit von wasserlöslichen Substanzen eignet (DIN EN ISO 9888). Dabei wird der Test solange fortgeführt, bis die Plateauphase erreicht wird, im Normalfall aber nicht länger als 28 Tage. Bei der Interpretation der Ergebnisse sollte deswegen nicht nur der Eliminationsgrad angegeben, sondern auch der Verlauf der Abbaukurve mit einbezogen werden [109]. Weiterhin können erhaltene BSB-Werte auf die CSB-Konzentration bezogen werden, d.h. es werden BSB/CSB oder CSB/BSB-Verhältnisse angegeben, um eine Klassifizierung des Abwassers zu erhalten [3, 29, 110].

### 2.4.2 Bedeutung statischer Abbautests

Solche statischen Untersuchungen lassen durchaus Rückschlüsse auf das Verhalten der Abwässer in Kläranlagen zu [109, 111]. Ebenso lassen sich damit Abbau oder Elimination (z.B. durch Adsorption an die Mikroorganismen) toxischer Substanzen verfolgen, wenn Abbautests mit toxischen Untersuchungen wie Daphnientest oder Leuchtbakterientest verknüpft werden [20, 111]. Auch für Industrieabwässer haben sich solche Untersuchungen bewährt, obwohl Ergebnisse, die aus Versuchen mit einer Zeitdauer von 28 Tagen gewonnen werden, nicht unmittelbar auf Kläranlagen zu übertragen sind. Da der Zahn-Wellens-Test auf die jeweilige Fragestellung angepasst werden kann, was Nährstoffverhältnisse, Konzentration des Testabwassers, Art des Inokulums oder Salzgehalt betrifft, können jedoch realistische Aussagen über das Verhalten in Kläranlagen getroffen werden, wie Untersuchungen bei der Firma Ciba Spezialitätenchemie AG gezeigt haben [6]. Für den Abbau in statischen Tests ist hauptsächlich die Wachstumsrate der Mikroorganismen ausschlaggebend, die in der Kläranlage keine Rolle spielt, solange die entsprechenden Mikroorganismen bereits im System etabliert sind, wofür das Schlammalter verantwortlich ist. Dementsprechend sind die in statischen Tests erhaltenen Ergebnisse sogar meistens zu konservativ, d.h. die wahren Abbauraten können in der Kläranlage höher sein [6]. Ebenso kann die Zugabe von leicht abbaubaren Cosubstraten positive Auswirkungen auf die Testdurchführung haben, da dadurch der physiologische Zustand des Inokulums beurteilt und auch verbessert werden kann (z.B. Verringerung der Adaptationsphase). Die meist nötige Verdünnung von Abwasserproben in statischen Tests spiegelt dabei eher die wirklichen Verhältnisse in Kläranlagen wider als dass sie sie verzerrt [6]. Dies ist insbesondere bei problematischen Abwasserteilströmen der Fall, die vor Einleitung in die Kläranlage mit anderen Abwasserströmen vermischt und dabei verdünnt werden.

### 2.4.3 Kontinuierlich geführte Abbautests

Kontinuierlich betriebene Verfahren wie Festbettreaktoren eignen sich allein durch ihre Verfahrensweise besonders gut als Laborsystem zur realitätsnahen Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit. Weiterhin sind solche Reaktoren leichter zu warten als Modellkläranlagen. Insbesondere für kontinuierliche Prozessführungen mit kombiniert chemisch-biologischer Abwasserbehandlung haben sich solche Reaktoren bewährt [47, 57, 60, 61, 74]. Nachteilig ist das meist nötige große Probenvolumen sowie die notwendige Einstellung optimaler Bedingungen (Nährstoff- und Sauerstoffversorgung, Prozessführung). Durch kontinuierliche Messung des DOC-Abbaus können auch kurzfristige Beeinträchtigungen des Systems (Stoßbelastungen) verfolgt werden [8]. Ähnliche Ziele werden z.B. mit Messungen der Sauerstoffaufnahme [66, 112, 113, 114] oder automatisierten Messung der Nitrifikationskinetik [115] ver-

folgt, um möglichst schnelle Aussagen über die Anwesenheit toxischer Substanzen zu erhalten.

#### 2.4.4 Toxizitätsuntersuchung

Neben dem bereits erwähnten Verdünnungsverfahren zur BSB-Messung (s. 2.4.1) existieren vielfältige Verfahren zur Toxizitätsbestimmung für den Wasser- und Abwasserbereich [116]. Dabei können diese Untersuchungen auf allen Populations-ebenen durchgeführt werden, die auch als Wirkebenen bezeichnet werden. Diese Wirkebenen können auf die Stufen *Molekül-Zelle-Organismus-Biotop* vereinfacht werden, wobei die Empfindlichkeit aufgrund der zunehmenden Komplexität des Untersuchungssystems in dieser Reihenfolge abnimmt, die Richtigkeit oder ökologische Relevanz jedoch zunimmt [117]. Etablierte Prüfmehoden sind z.B. Enzymhemmungstests, Bakterientests (Atmung, Wachstum, Lumineszenz), Algentests (Wachstum), Daphnientests (Beweglichkeit) und Fischttests (Mortalität, Symptomatik) [117, 118, 119].

In Gentoxizitätstests, wie z.B. Ames-Test, umu-test, Comet-Assay oder UDS-Assay [120, 121, 122] können Mutationsraten oder DNA-Schädigungen untersucht werden.

Je nach Ansprechzeit des Tests und der Dauer der Untersuchung kann zwischen akuten und chronischen Toxizitätstests unterschieden werden. Zur Beurteilung der Toxizität ist die Verwendung sogenannter Testbatterien sinnvoll, das heißt der Einsatz mehrerer Testsysteme, da verschiedene Organismen unterschiedlich auf Störsubstanzen ansprechen können [123, 124, 125, 126, 127]. Sicherste Methode für den Kläranlagenbereich ist die Nutzung von Belebtschlamm aus der Anlage selbst, da dadurch die Wahrscheinlichkeit falscher Ergebnisse minimiert wird [114].

##### 2.4.4.1 Leuchtbakterienhemmtest

Weit verbreitet in der Abwasseranalytik, da relativ einfach in der Anwendung, ist der Leuchtbakterienhemmtest mit Bakterien der Art *Vibrio fischeri*, welche kommerziell in flüssig- oder gefriergetrockneter Form erhältlich sind. Die je nach Vertreiber unterschiedlichen Testsysteme liefern im allgemeinen vergleichbare Ergebnisse, so dass die Art des verwendeten Systems keinen Einfluss auf das Versuchsergebnis hat [128]. Deswegen eignet sich der Test auch als Ergänzungsmethode bei Messungen der biologischen Abbaubarkeit und zur umfassenden Beurteilung von Abwasserreinigungsverfahren [36, 58, 59, 114, 125, 129]. Problematisch ist die Tatsache, dass es sich bei *Vibrio fischeri* um eine einzelne, marine Bakterienart handelt, weshalb andere Reaktionen auftreten können als z.B. im Belebtschlamm, wo ein Konsortium von Mikroorganismen verwendet wird [114, 130].



#### 2.4.4.2 Toxizität und Bioabbau von Abwasser

Häufig ist zu beobachten, dass Oxidationsverfahren allgemein zu einer Abnahme der Toxizitätswerte führen [58, 59, 129, 131], wodurch die biologische Abbaubarkeit positiv beeinflusst wird. Dabei kann die Dosis des Oxidationsmittels ebenfalls eine Rolle spielen [132]. Toxische Proben müssen aber nicht zwingend den biologischen Abbau in statischen Tests oder in der Kläranlage beeinflussen, vielmehr stellt sich dann die Frage, ob diese toxischen Substanzen bei der Passage einer biologischen Stufe eliminiert werden können [111]. Wie bereits in Abschnitt 2.2.3 gezeigt, kann eine mit zwei verschiedenen Oxidationsverfahren behandelte Abwasserprobe vergleichbare Toxizitätswerte im Leuchtbakterienhemmtest aufzeigen, aber völlig unterschiedliche Abbauwerte zeigen [36].

Zur Untersuchung komplexer Abwassermatrices kann der Leuchtbakterienhemmtest in miniaturisierter Form [133] als screening-Methode zum Auffinden toxischer Fraktionen oder in bestimmten Fällen von Einzelsubstanzen dienen, wie in [134, 135] dargestellt. In diesen Arbeiten wurde die Gruppe der Benzothiazole als Mitverursacher der Toxizität eines Gerbereiabwassers identifiziert. Je komplexer die Zusammensetzung der Abwassermatrix allerdings ist, desto schwieriger ist die Identifizierung von Einzelsubstanzen [134]. Es kann jedoch zumindest eine Eingrenzung der für die Toxizität verantwortlichen Stoffgruppe(n) vorgenommen werden [136]. So konnte z.B. mit Hilfe eines Daphnientoxizitätstests Chrom[VI] als Verursacher der Toxizität eines Industrieabwassers identifiziert werden, indem verschiedene Fraktionen des Abwassers untersucht wurden und so eine Eingrenzung gelang [137].

## 2.5 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Mit Hilfe der allgemeinen biologischen Abbaumethoden und Toxizitätstests kann eine pragmatische Beurteilung einer Abwasserprobe erfolgen. Dabei wird das biologische System meist als nicht näher definierte Gesamtheit angesehen und nur der nach außen sichtbare Effekt beurteilt. Was innerhalb der Mikroorganismenpopulation geschieht, ist zweitrangig. Insbesondere für technische Systeme wie die Abwasserbehandlung wäre aber ein detaillierteres Wissen über den Einfluss der Abwasserzusammensetzung auf die mikrobielle Populationsstruktur von großem Interesse, um eine Optimierung der Verfahrensführung zu erzielen [9, 10]. Eine Methode, die einen Einblick in die Zusammensetzung der Mikroorganismenpopulation geben kann, ist die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH), die im folgenden behandelt wird.

### 2.5.1 Klassische Nachweismethoden von Bakterien

Bei den klassischen Nachweismethoden von Bakterien werden folgende Verfahren genutzt:

### 2.5.1.1 Mikroskopie

Die direkteste und sicherste Methode für den Nachweis von Bakterien ist die Mikroskopie. Es ist jedoch selten ausschließlich über die Zellmorphologie möglich, bestimmte Spezies zu erkennen oder überhaupt Bakterienpopulationen zu unterscheiden [138]. Es lassen sich jedoch Gesamtzellzahl und dominierende Morphotypen bestimmen. Insbesondere in der Untersuchung von kommunalem Schlamm ist es heutzutage weit verbreitet, mit Hilfe des Schlammbildes eine Aussage über Zustand und Art der Mikroorganismenpopulationen in einer biologischen Kläranlage zu treffen [139]. Insbesondere lassen sich Änderungen eines spezifischen Schlammbildes relativ gut erkennen und entsprechende Maßnahmen können eingeleitet werden. Im Falle eines Auftretens von Blähschlamm ist hier eine erhöhte Anwesenheit von fadenförmigen oder fadenbildenden Bakterien ein Indiz [140, 141]. Die mikroskopische Analyse kann jedoch in diesen Fällen zu Fehlinterpretationen führen, da das Auftreten von Blähschlamm erst bei deutlicher Etablierung der verantwortlichen Bakterien und somit zu spät entdeckt wird, weshalb sich diese Methode nicht als Frühwarnsystem eignet [142].

### 2.5.1.2 Isolierungsverfahren

Klassische Nachweismethoden für bestimmte Bakterienspezies beruhen auf einer Anreicherung und Isolierung der gesuchten Spezies. Dabei bedient man sich selektiver Kultivierungstechniken. Voraussetzung ist, dass sich die gesuchte Spezies kultivieren und in biochemischen Untersuchungen eindeutig zuordnen lässt. Insbesondere bei der Isolierung verschiedener Spezies mit einer gemeinsamen Stoffwechseleigenschaft kommt es zwangsläufig zu einer Selektion bestimmter Spezies, für deren Wachstum die gewählten Kultivierungsbedingungen optimal sind. Andere Spezies, die eine wichtige Rolle in der natürlichen Umwelt spielen, können dabei unterdrückt werden, so dass ihre Anwesenheit nicht erfasst wird. Wichtiges Beispiel hierfür ist die frühere Annahme, dass *Nitrobacter* der dominierende Vertreter der Nitrit-Oxidierer in Abwassersystemen darstellt. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass in realen Systemen andere Nitrit-Oxidierer vertreten sind und *Nitrobacter* nur eine untergeordnete Rolle spielt (s. auch Abschnitt 2.6.6). Ein weiterer Nachteil der kultivierungsabhängigen Nachweismethoden ist neben der Selektion auch die grundsätzliche Unfähigkeit vieler Bakterienspezies, auf den verwendeten Kultivierungsnährmedien zu wachsen, wie in Tabelle 2.2 gezeigt wird. Bemerkenswert dabei ist, dass selbst in Belebtschlamm nur ein geringer Prozentsatz der Gesamtbakterienzahl kultivierbar ist. Dies führt neben der Unterschätzung der Bakterienzahl auch zu einer Verfälschung der wahren Populationsverteilung der Bakterien. Dies konnte z.B. von Wagner et al. [143] gezeigt werden, die eine Bevorzugung der  $\gamma$ -Bakterien gegenüber den  $\beta$ -Bakterien bei Anreicherung auf nährstoffreichen Medien feststellten. Dies wur-

Tabelle 2.2: Anteil der kultivierbaren Bakterien aus verschiedenen Habitaten an der Gesamtzellzahl [147].

Habitat	kultivierbar in %
Boden	0,3
Sediment	0,25
Süßwasser	0,25
Meer	0,1
Belebtschlamm	1-15

de in weiteren Untersuchungen bestätigt, in denen die Zahl von zwei Vertretern der  $\gamma$ -Bakterien (*Acinetobacter ssp.* und *Aeromonas ssp.*) bei kultivierungsabhängigen Verfahren deutlich überschätzt wurde, während die  $\beta$ -Bakterien wiederum den Großteil der mit *in-situ* Methoden nachweisbaren Bakterien darstellten [144]. Dies war deshalb von besonderem Interesse, da *Acinetobacter* früher als wichtigster Vertreter der bakteriellen Phosphatelimination in Abwassersystemen angesehen wurde, was auch durch die Arbeit von Mudaly et al. [145] widerlegt werden konnte. Einen Vergleich über die Ergebnisse aus der Anreicherung mit verschiedenen Nährböden und einer *in-situ* Populationsanalyse einer Belebtschlammprobe wird auch in [146] beschrieben. Hier wurde gezeigt, dass die verschiedenen Nährmedien unterschiedliche Bakteriengruppen bevorzugt nachweisen, wobei keines der Medien die wahre Populationszusammensetzung wiedergeben konnte.

Insbesondere in oligo- oder mesotrophen Systemen führt die Nicht-Kultivierbarkeit zur sogenannten Plattenanomalie oder *great plate count anomaly* [147], d.h. einer großen Divergenz zwischen mikroskopisch nachweisbaren Mikroorganismen und ihrer Bestimmung durch Kultivierungsverfahren, die auf der Anreicherung der Mikroorganismen beruhen. Zu den Bakterien, die zwar bekannt, aber nicht kultivierbar sind, gehören auch viele Vertreter der in Endosymbiose lebenden Bakterien [147].

Diese Tatsachen zeigen, wie wichtig neue Methoden zur Verbesserung der Bakterienidentifizierung sind. Insbesondere in technischen Systemen kann es von Vorteil sein, eine genaue Kenntnis über die im System vorhandenen Bakterien zu haben, um die Prozessauslegung und -steuerung zu erleichtern und zu verbessern. Dies erfordert eine Zusammenarbeit zwischen Vertretern der Mikrobiologie und der Ingenieurwissenschaften [9]. Voraussetzung für eine Verbesserung der Prozesse ist, dass möglichst große Datenmengen zur Bakterienpopulationszusammensetzung aus verschiedenen Abwasseranlagen vorliegen. Somit kann festgestellt werden, welche

Bakteriengruppen und -spezies welche Bedingungen bevorzugen. Dies wiederum ermöglicht eine Anpassung der Prozessparameter und damit eine Optimierung der Gesamtanlage [9]. Auch können damit bisher unbekannte Stoffwechseleigenschaften ausgenutzt werden, die eine dem Abwasser angepasste Verfahrensweise erlauben. Ein Beispiel hierfür ist die bakterielle anaerobe Ammonium-Oxidation, die zwar bereits früh postuliert wurde [148, 149], die dafür verantwortlichen Bakterien aber erst in jüngster Zeit entdeckt [150, 151] und als relevant für technische Zwecke erkannt wurden [13, 149, 152, 153].

### 2.5.2 *In-situ* Gensonden-Konzept

Die Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) eröffnet als molekularbiologische Methode neue Möglichkeiten der *in-situ* Identifizierung einzelner Spezies innerhalb gemischter (realer) Bakterienpopulationen. Ausgangspunkt dieser Methode ist die vergleichende Analyse der Basensequenzen ribosomaler Ribonukleinsäuren (rRNA). Für diese rRNA werden komplementäre Oligonukleotide als Gensonden eingesetzt. Diese sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, womit ein Nachweis der Bakterien, die mit der Sonde gebunden haben, im Fluoreszenzmikroskop gelingt. Die rRNA ist als Bestandteil der Ribosomen, der Ort der Proteinbiosynthese, in allen Zellen vorhanden. Sie ist einsträngig und kann bis zu 3000 Nukleotide (Basen) enthalten. Das Ribosom einer Bakterienzelle setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen, welche aus Proteinen sowie aus rRNA bestehen (s. Abbildung 2.3).

Die rRNA erfüllt als ubiquitär vorkommendes Makromolekül die Voraussetzung zur Verwendung als phylogenetischer Marker. Ihre Basensequenz wurde im Laufe der Evolution weder durch die Degeneration des genetischen Codes noch durch Suppressor-Mutationen beeinflusst [95]. Weitere Bedingungen sind z.B. eine gewisse Komplexität des Markers, der Ausschluss eines lateralen Gentransfers und ein umfassender Datensatz, um fundierte phylogenetische Schlussfolgerungen ziehen zu können [154]. Als besonders geeignet erwiesen sich die 16S- und die 23S-rRNA, wobei momentan die Datenmenge der 16S-rRNA höher ist und demnach die Mehrzahl der Gensonden auf diesen Basensequenzen beruhen. Die Entwicklung der Stammbäume beruht ebenfalls hauptsächlich auf Informationen, die aus der vergleichenden Sequenzanalyse der 16S-rRNA gewonnen wurden [155]. Da die Datenmenge für die 23S-rRNA jedoch stetig wächst [9], wird in Zukunft auch damit eine Stammbaumentwicklung möglich sein. Erste Sondenentwicklungen wurden auf Grundlage der Arbeiten von Woese [155] in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts durchgeführt. Die Markierung erfolgte dabei teilweise radioaktiv [156] oder mit Digoxigenin [157], aber auch bereits mit Fluoreszenzfarbstoffen [11, 158]. Die Charakterisierung der mikrobiellen Ökologie wurde dabei hauptsächlich auf der Ebene der verschiedenen Reiche *Bacteria*, *Archaea* und *Eukarya* [159] oder auf der Ebene der verschiedenen Gruppen der *Bacteria* durchgeführt [12, 160]. Erste

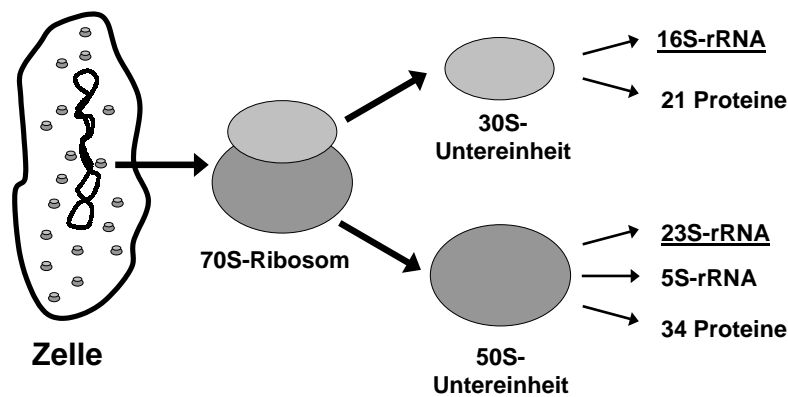


Abbildung 2.3: Zusammensetzung der bakteriellen Ribosomen.

Sonden waren auch gegen einzelne Spezies gerichtet, wie z.B. gegen *E. coli* und *Pseudomonas fluorescens* [157] oder *Desulfobacter* [158] und *Fibrobacter* [11]. Mit der Entwicklung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) [161] vergrößerte sich die Datenmenge der rRNA-Sequenzen und beschleunigte die Entwicklung der Sonden, was sich die Umweltmikrobiologie zu Nutze machte [162]. Ebenso konnte der Zeitaufwand der Klonierung verkürzt werden. Die Kombination der PCR mit *in-situ* Detektionsmethoden ermöglichte dabei erste Identifizierungen vormals nicht kultivierbarer Bakterien [163, 164].

## 2.5.3 Praxis der FISH

### 2.5.3.1 Allgemeines

Die Vorgehensweise der eigentlichen Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung wird in Abbildung 2.4 verdeutlicht. Die Zellen werden fixiert und dabei permeabilisiert, um zu Erreichen, dass die fluoreszenzmarkierten Sonden in die Zellen eindringen können. Nach einem Hybridisierungs- und Waschschrift werden die Zellen unter einem Fluoreszenzmikroskop mit geeigneten optischen Filtern sichtbar gemacht.

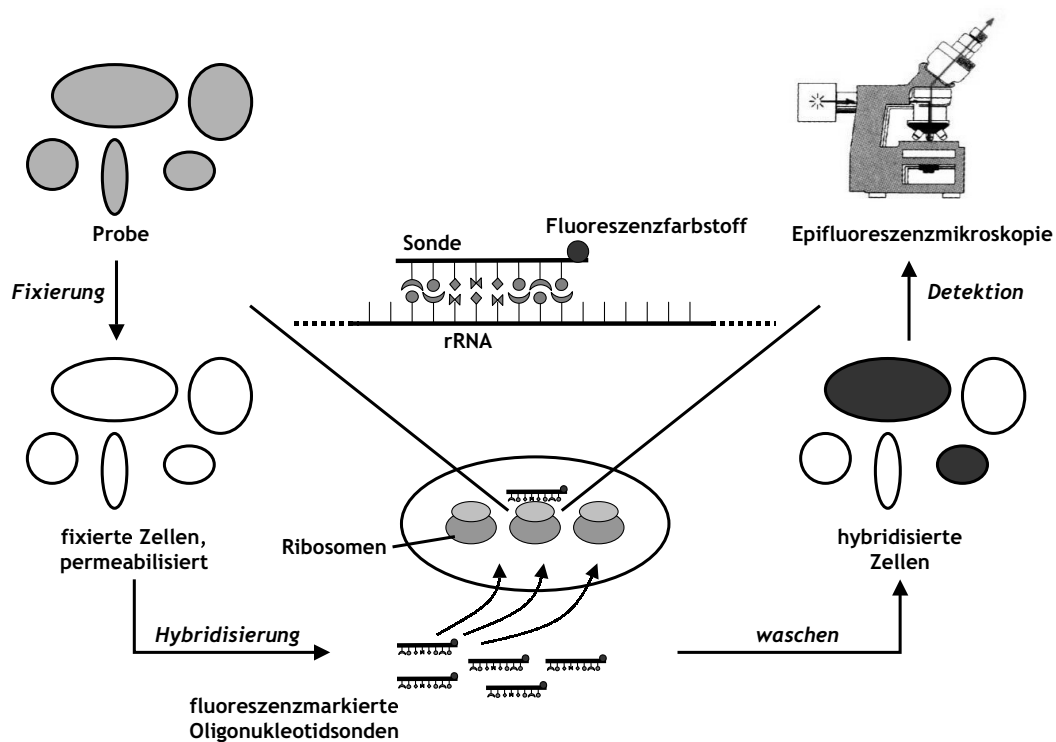


Abbildung 2.4: Darstellung der Vorgehensweise bei der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung, nach [138].

### 2.5.3.2 Fixierung

Vor Hybridisierung werden die Bakterien zunächst in ein Fixativum (Alkohol oder Formaldehyd) überführt. Dadurch werden die Zellen zwar abgetötet - eine Kultivierung ist dann nicht mehr möglich - doch bleiben sie in Form, Zahl und ihrer räumlichen Anordnung zueinander weitgehend im ursprünglichen Zustand. Außerdem sind die so fixierten Zellen über einen längeren Zeitraum zu lagern, so dass auch retrospektiv Analysen mit neu entwickelten Sonden möglich sind [165]. Die Wahl des Fixativums hat durchaus Auswirkungen auf den Erfolg der Hybridisierung, indem es die Durchlässigkeit der Zellmembranen für die Oligonukleotidsonden beeinflusst. Für gramnegative Bakterien, zu denen die in dieser Arbeit untersuchten Spezies gehören, hat sich eine Fixierung mit 4 %iger Paraformaldehyd-Lösung bewährt [166].

### 2.5.3.3 Hybridisierung und Mikroskopie

In einem zweiten Schritt (Hybridisierung) gehen die komplementären Oligonukleotidsonden mit der rRNA eine stabile Bindung ein. Deren Stabilität ist dabei abhängig von Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke und Konzentration an denaturierenden Substanzen [167]. Von Bedeutung ist bei der Hybridisierung die Härte bzw. Stringenz der Reaktionsbedingungen. Im Hybridisierungsverfahren nach [166] wird die Stringenz durch Variation der Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer gesteuert [168]. Eine hohe Konzentration bewirkt dabei eine hohe Stringenz. Unterscheidet sich die Zielregion einer zu identifizierenden Spezies von der einer anderen nur geringfügig, so sind stringentere Bedingungen zu wählen, um eine Fehlbindung der Sonde an die unerwünschte Zielsequenz und somit falsch-positive Befunde zu vermeiden. Die Verwendung sogenannter Kompetitor-Sonden kann zur Vermeidung von Fehlbindungen hilfreich sein. Kompetitor-Sonden sind unmarkierte Oligonukleotide, die zielgerichtet an die unerwünschte Zielregion binden und dadurch eine falsche Bindung der fluoreszenzmarkierten Sonde verhindern [169]. In einem letzten Schritt werden die hybridisierten Zellen mit einem Fluoreszenz-Mikroskop detektiert (Epifluoreszenzmikroskop oder CLSM, s. Abschnitt 2.5.5.4).

### 2.5.3.4 Probleme und Lösungsansätze

Da die Signalintensität von der Anzahl der gebundenen Sonden und diese wiederum von dem rRNA-Gehalt (Anzahl der Ribosomen) der zu detektierenden Zelle bestimmt wird, kann es bei in Abhängigkeit von der Zellaktivität zu niedrigem rRNA-Gehalt zu Fehlinterpretationen kommen, d.h. die zu identifizierende Spezies ist vorhanden, wird jedoch aufgrund einer zu niedrigen Signalintensität nicht detektiert. Abhilfe kann hier zum einen der Einsatz mehrerer artspezifischer Sonden schaffen, die auf verschiedene Sequenzabschnitte gerichtet sind und somit zu einer

Amplifizierung des Fluoreszenzsignals führen, zum anderen bietet die Detektion der Signale mit digitalen Aufnahmetechniken die Möglichkeit der Signalverstärkung. In Abwassersystemen kann jedoch meist von einer ausreichenden Zellaktivität ausgegangen werden, so dass eine *in-situ* Detektion einzelner Bakterienzellen problemlos möglich ist. Aktive Zellen haben einen Ribosomengehalt von ca. 1000 bis 100000 [9], eine schnell wachsenden *E. coli* Zelle enthält z.B. bis zu 70000 Ribosomen [138], so dass das Sondensignal genügend stark wird, um detektiert werden zu können. Aber auch in Abwassersystemen wurde festgestellt, dass bestimmte Fraktionen der Mikroorganismenpopulation geringe rRNA-Gehalte besitzen können. Das kann damit begründet werden, dass die Mikroorganismenfraktion mit hohem rRNA-Gehalt die leicht verwertbaren Substanzen des Abwassers nutzt, die Fraktion mit niedrigem rRNA-Gehalt jedoch die nur langsam verwertbaren Substanzen [170]. Ebenso können kurzzeitig dem System zugeführte toxische oder hemmende Stoffe die Aktivität bestimmter Bakterien erniedrigen, was zwar zu keiner Änderung der Abundanz, jedoch zu einer Abnahme der Ribosomenzahl und somit zu einer Signalschwächung führt. Niedrige Signalintensitäten können auch in der Struktur der ribosomalen RNA begründet sein. Die Zielsequenz der Gensonde kann dabei an einer Stelle der rRNA liegen, die für die Sonde schlecht oder gar nicht zugänglich ist. Ein Beispiel ist die *E. coli*-spezifische Sonde Eco585. Fuchs et al. [169] gelang es, durch den Einsatz mehrerer Helfer-Oligonucleotide, die die dreidimensionale Struktur des rRNA-Moleküls öffnen können, die Bindung der Sonde zu verbessern und das Fluoreszenzsignal um ein vielfaches zu erhöhen. In natürlichen Ökosystemen, in denen oligotrophe Bedingungen vorherrschen, kann das Sondensignal aufgrund niedrigen Ribosomengehalts ebenfalls zu schwach sein. Zur Signalverstärkung können die Zellen vor der Fixierung z.B. mit einer Mischung von Glukose, Hefeextrakt und dem Antibiotikum Chloramphenicol behandelt werden, wodurch eine Erhöhung des Zellvolumens und der Ribosomenzahl bei gleichzeitiger Verhinderung der Zellteilung erreicht wird [171].

Das Detektionslimit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung wird mit ca.  $10^3$  Zellen/mL angegeben [147, 172]. Der Prozentsatz aller mit FISH detektierbaren Zellen kann mit Hilfe einer Sonde, die gegen alle Vertreter der *Bacteria* gerichtet ist, bestimmt werden [158]. Diese Sonde wird mit EUB338 bezeichnet, wobei sich zeigte, dass der kombinierte Einsatz dreier allgemeiner Sonden (EUB338I-III) den Prozentsatz erhöhen kann [173].

Die Schwierigkeit bei der Auswertung von FISH-Analysen ist, dass eine entsprechend hohe Anzahl von Bildausschnitten ausgewertet werden muss, um ein repräsentatives Ergebnis zu erhalten. Um eindeutige Änderungen in einer Populationsstruktur zu erfassen, ist eine quantitative Auswertung vieler Bildausschnitte notwendig. Mit Hilfe konfokaler Laserscanning-Mikroskope und einer automatisierten Bildverarbeitung kann dies erfolgen. Durch Minimierung störender Fluoreszenzsignale (Auto- und Hintergrundfluoreszenz) und einer dreidimensionalen Darstellung kann mit Hilfe sog. *biovolumes* auf die Anteile verschiedener Bakteriengruppen oder -arten ge-



geschlossen werden [9, 149, 174, 175]. Da im Rahmen dieser Arbeit ein konventionelles Epifluoreszenzmikroskop verwendet wurde, welches nicht automatisiert betrieben werden konnte, erfolgte die Auswertung semi-quantitativ (s. Abschnitt 3.4.6).

### 2.5.4 Stammbaum- und Populationsanalysen

Mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) lassen sich aus Umweltproben direkt rRNA-codierende DNA-Abschnitte amplifizieren und in Klondatenbanken integrieren. Mit der Sequenz der rRNA erhält man eine Art Fingerabdruck der Zelle, der sich in einen phylogenetischen Stammbaum einordnen lässt. In der ARB-Datenbank der TU München sind zur Zeit mehr als 22.000 Sequenzen vorhanden [154]. Ein Vergleich der Sequenzen lässt erkennen, dass sowohl konservierte Regionen als auch variable Regionen vorhanden sind, die zur Differenzierung unterschiedlicher Bakteriengruppen und -spezies verwendet werden können. Je geringer die Unterschiede in der Basenabfolge (hohe Sequenzhomologie) sind, desto näher ist die phylogenetische Verwandtschaft. Die Zielsequenzen der Gensonden werden auch als diagnostische Zielsequenzen bezeichnet. Da in Datenbanken jedoch nur bereits bekannte Sequenzen aufgeführt werden können, ist auch bei Einsatz von spezifischen Gensonden nie auszuschließen, dass falsch-positive Identifizierungen auftreten können. Um diese Möglichkeit zu minimieren, wird heutzutage das Mehrfachsondenkonzept verfolgt [146]. Das bedeutet, dass jede Sonde in Verbindung mit einer Sonde paralleler oder übergeordneter Spezifität eingesetzt wird. Eine Sonde paralleler Spezifität bindet entweder an die gleiche rRNA, aber an eine andere Zielsequenz, oder z.B. anstatt an der 16S-rRNA an der 23S-rRNA. Aus der bisher bekannten Datenmenge an 16S-rRNA-Sequenzen lässt sich der in Abbildung 2.5 gezeigte Stammbaum für das Reich der *Bacteria* erstellen.

Mit Hilfe der rRNA-Sequenz konnten in den letzten Jahren völlig neue Entwicklungslinien im Stammbaum der *Bacteria* und *Archaea* entdeckt werden [177]. Man schätzt, dass die bisher beschriebenen 5000 Bakterienarten nur einen Bruchteil der tatsächlichen Artenvielfalt darstellen [138]. Alternative phylogenetische Marker existieren, wie z.B. ribosomale Proteine, Heatshock-Proteine und RNA-Polymerasen [154]. Die Stammbäume, die damit entwickelt werden können, sind nicht zwingend mit den rRNA-Stammbäumen identisch, zeigen aber meist die gleiche Struktur. Man zieht daher den Schluss, dass die rRNA in ihrer Primärstruktur (Sequenz) die Entwicklungsgeschichte der Organismen widerspiegelt, nicht aber die Details. Demgegenüber können Marker auf der Basis einzelner Gene diese Details oft besser darstellen [154].

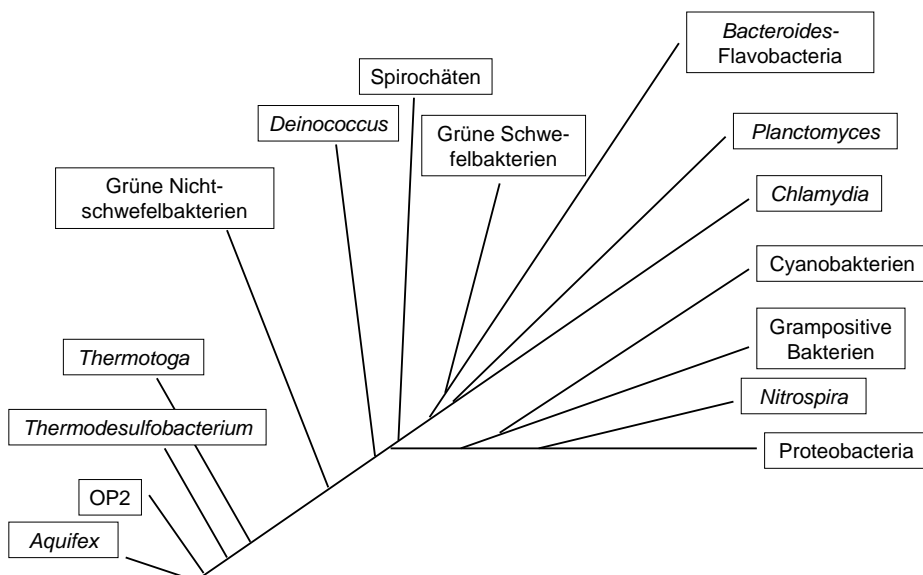


Abbildung 2.5: Phylogenetischer Stammbaum der *Bacteria*, abgeleitet aus 16S-rRNA Sequenzanalysen, nach [176].

#### 2.5.4.1 Ansätze zur Populationsanalyse

Eine Populationsanalyse einer Umweltprobe kann auf zwei Wegen erfolgen. Beim enkaptischen oder hierarchischen Ansatz werden zunächst Sonden einer phylogenetisch höheren Ebene zur Identifizierung herangezogen und mit der Gesamtzellzahl verglichen (z.B. Färbung mit dem DNA-Farbstoff DAPI [146, 178, 179]). Man erhält dadurch eine Aussage über den Anteil der dieser Ebene zugehörigen Organismen. Anschließend werden spezifischere Sonden bis zur gewünschten phylogenetischen Ebene zur Populationsanalyse verwendet [146].

Beim sogenannten *Full-cycle-rRNA-approach*, der für weniger komplexe Systeme geeignet ist, wird die Gesamt-DNA der Probe isoliert, mit Hilfe der PCR werden daraufhin die gewünschten rRNA-codierenden Gene amplifiziert. Durch Klonierung der PCR-Produkte in *E. coli* erhält man eine Datenbank, auf deren Basis neue Sonden entwickelt und für die Umweltprobe eingesetzt werden können [180], was ebenso zur Weiterentwicklung des Stammbaumes genutzt werden kann. Erste Untersuchungen damit wurden von Amann et al. [181] zur Identifizierung von Sulfat-reduzierenden Bakterien in einem Biofilm durchgeführt. Nach Isolierung und Amplifizierung der relevanten 16S-rRNA-Abschnitte wurden Sonden konstruiert, die wieder im gleichen System eingesetzt wurden.

Mit den beschriebenen Ansätzen können Analysen der mikrobiellen Populationsstruktur und -dynamik kultivierungsunabhängig durch Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten Bakterien erfolgen. Sinnvoll bei diesen Analysen ist der gleichzeitige Einsatz mehrerer Sonden, die gegen verschiedene Bakteriengruppen gerichtet und jeweils mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind. Damit können durch geeignete Wahl der Sonden und Farbstoffe sowie Einsatz eines Mikroskops mit mehreren Filterblöcken bis zu sieben verschiedene Bakterienpopulationen in einem Präparat sichtbar gemacht werden [180]. Für eine bessere Visualisierung des Präparates sind verschiedene Softwareprodukte vorhanden, die die mit jeweils einem Filterblock, entsprechend einem Fluoreszenzfarbstoff und damit einer Bakteriengruppe, aufgenommenen Bilder kombiniert und zu einem einzigen Bild zusammenfügt.

## 2.5.5 Alternativen und Weiterentwicklungen

### 2.5.5.1 PCR-DGGE

Eine alternative Populationsanalyse, die ebenfalls auf der rRNA-Diversität der Bakterien beruht, jedoch nicht mit Hilfe von Gensonden arbeitet, ist die mit PCR gekoppelte denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE) [182]. Hierbei lässt sich auch unabhängig vom Wissen der vorhandenen Bakterienpopulationen deren Dynamik in einem biologischen System ermitteln. Mit Hilfe spezifischer Primer werden die rRNA-Sequenzen der DNA amplifiziert (PCR) und in einem Gradientengel aufgetrennt. Anhand des Bandenmusters der verschiedenen rRNA-Moleküle können Aussagen über die Änderungen der Populationsstruktur- und Zusammensetzung getroffen werden [183, 184].

### 2.5.5.2 Funktionsanalysen

Die Fortschritte der mikrobiellen Populationsanalyse in den letzten Jahren werfen aber auch weitere Fragestellungen auf. Zwar werden in fast jeder Umweltprobe neue, bisher nicht kultivierbare Mikroorganismen gefunden. Zum Verständnis der Ökologie dieser Systeme ist jedoch das Wissen nötig, welche Funktion die Bakterien *in-situ* ausüben [9, 13]. Dafür reicht die alleinige Identifikation nicht aus, da auch phylogenetisch nah verwandte Bakterien sehr unterschiedliche Stoffwechseleigenschaften besitzen können. Neuere Entwicklungen haben daher das Ziel, eine Identifizierung *in-situ* mit einer Funktionsanalyse zu koppeln. Dafür eignet sich die vergleichende Sequenzanalyse von bestimmten Funktionsgenen, die für Schlüsselenzyme bestimmter Stoffwechselleistungen codieren, wie z.B. die Ammonium-Monooxygenase (*amoA*-Gen) [13, 185, 186, 187]. Zur Messung der Aktivität *in-situ* ist auch der Nachweis des Transkriptes der 16S-23S-rDNA Spacerregion (*intergenic spacer region*, ISR) mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Sonden geeignet [13, 152]. Diese Spacerregion

wird zusammen mit den rRNA-Genen transkribiert, wird nach der Prozessierung der rRNA-Moleküle aber schnell abgebaut. Dies bedeutet, dass nur in zum Zeitpunkt der Analyse aktiven Zellen (Synthese von rRNA und damit von Ribosomen) ein Nachweis der ISR gelingt. Damit ist ein direkter Zusammenhang zwischen Identifizierung und Aktivität gegeben. Ein ähnlicher Ansatz wird bei Aoi et al. [188] verfolgt, wo die mRNA für die Ammonium-Monooxygenase als Sensor für die Aktivität der Zelle benutzt wird. Damit ist eine wesentliche Verkürzung der Ansprechzeiten möglich, weiterhin können kurzfristige Störungen detektiert werden, die keine Änderungen im Ribosomen- und damit dem rRNA-Gehalt der Zelle verursachen.

### 2.5.5.3 FISH-MAR

Eine Methode, die detaillierten Aufschluss über die Zellaktivität geben kann, ist die Kombination von FISH und Mikroautoradiographie (FISH-MAR) [189, 190, 191, 192]. Die Umweltprobe wird dabei in parallelen Ansätzen mit verschiedenen radioaktiv markierten Substraten inkubiert. Nach Fixierung und einem Waschschrift wird die Probe mit einem Kryotom in dünne Schnitte geschnitten. Nach der Durchführung der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung wird der Schnitt mit einer für Radioaktivität sensitiven Emulsion bedeckt. Eine Schwärzung (Silberkornbildung) zeigt die Stellen der Probe an, an denen die Mikroorganismen radioaktiv markiertes Substrat aufgenommen haben. Die gleichzeitige Analyse der Fluoreszenzsignale lässt dabei eine Identifizierung der Bakterien zu.

### 2.5.5.4 Konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Für erweiterte Populations- und Aktivitätsanalysen werden heutzutage hauptsächlich konfokale Laserscanning-Mikroskope (*confocal laser scanning microscope*, CLSM) eingesetzt [174]. Insbesondere bei mehrschichtigen Präparaten und bei quantitativen Analysen bietet das CLSM den Vorteil, verschiedene Ebenen des Präparates getrennt mit dem Laser zu aktivieren und zu analysieren. Durch Bildverarbeitung am Computer lassen sich anschließend die Aufnahmen der verschiedenen Ebenen zu einem dreidimensionalen Bild zusammenfügen. Dies ermöglicht eine realitätsnahe Ansicht von z.B. Belebtschlammflocken oder Mikroagglomeraten, die Aussagen über das Zusammenspiel verschiedener Bakteriengruppen oder die Nährstoffversorgung innerhalb der Flocken zulässt [190, 193]. Eine quantitative Analyse kann entweder durch Auszählen der Zellen erfolgen, oder aber, was meist einfacher und sicherer ist, über softwareunterstützte Berechnung der Farbanteile der jeweiligen Fluoreszenzfarbstoffe zur Gesamtzellzahl [9, 149, 194]. Ein weiterer Vorteil der CLSM ist, dass die Autofluoreszenz des Präparates sowie diffuse Hintergrundfluoreszenz fast vollständig unterdrückt werden können [146, 194].

Tabelle 2.3: Untergruppen der Proteobakterien mit typischen Vertretern aus dem Wasser-, Abwasser- und Bodenbereich [176, 198, 199, 200].

$\alpha$ -Gruppe	$\beta$ -Gruppe	$\gamma$ -Gruppe	$\delta$ -Gruppe	$\epsilon$ -Gruppe
<i>Acetobacter</i>	<i>Nitrosomonas</i> , <i>Nitrosococcus</i>	<i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i>	<i>Desulfovibrio</i>	<i>Thiovulum</i>
<i>Agrobacterium</i>	<i>Alcaligenes</i>	<i>Acinetobacter</i>	<i>Desulfobacter</i>	<i>Campylobacter</i>
<i>Pseudomonas diminuta</i>	<i>Pseudomonas cepacia</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Myxococcus</i>	<i>Heliobacter</i>
<i>Nitrobacter</i>	<i>Thiobacillus</i>	<i>Ps. putida</i> , <i>Ps. fluorescens</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>Xanthomonas</i>
<i>Azospirillum</i>	Fe- und Mn-Oxidierer	<i>Legionella</i>	<i>Erwinia</i>	<i>Wolinella</i>
<i>Rhizobium</i>	<i>Neisseria</i>	<i>Aeromonas</i>		
<i>Paracoccus denitrificans</i>	<i>Chromobacterium</i>	<i>Vibrio</i>		

## 2.6 Abwassersysteme und FISH

### 2.6.1 Relevante Bakteriengruppen

Die größten und bedeutendsten Gruppen der *Bacteria* stellen die Proteobakterien (früher Purpurbakterien), die gram-positiven Bakterien und die Cyanobakterien dar. Die Proteobakterien werden dabei in verschiedene Untergruppen eingeteilt, denen eine Großzahl wasser- und abwasserrelevanter Bakterien zugehört. In Abwassersystemen stellen sie teilweise mehr als 80 % der Bakterien dar [143]. Sie werden unterteilt in  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ -,  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Proteobakterien, wobei die  $\delta$ - und  $\epsilon$ -Proteobakterien in Abwassersystemen nur eine untergeordnete Rolle spielen [195]. Weitere relevante Abwasserbakterien sind die gram-positiven Bakterien, die je nach Gehalt der DNA an den Basen Guanin und Cytosin in *lowG+C* und *highG+C* Bakterien eingeteilt werden, sowie Bakterien der Gruppe *Cytophaga-Flavobacterium*, weiterhin je nach Abwassereigenschaften verschiedene Spezialisten aus anderen Gruppen der *Bacteria* [195, 196]. Als nicht-bakterielle Vertreter in Abwassersystemen spielen die Protozoen eine wichtige Rolle, da sie durch Abweiden der Bakterien (*grazing*) sowohl deren Zusammensetzung als auch Aktivität maßgeblich beeinflussen können [197]. In Tabelle 2.3 sind wichtige Vertreter der Proteobakterien aufgelistet.

Bei der Einteilung der Proteobakterien in Untergruppen muss angemerkt werden, dass phylogenetisch eng verwandte Bakterien sehr verschiedene Merkmale und StoffwechsellLeistungen aufweisen können, während andererseits physiologisch und

phänotypisch einheitlich erscheinende Gruppen im Stammbaum weit voneinander entfernt stehen können. Bei der Untersuchung der Populationszusammensetzung und -dynamik in einem biologischen System muss diese Tatsache bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden.

### 2.6.2 Allgemeine Populationsanalysen

Die erste Arbeit, die sich mit der *in-situ* Populationsanalyse von Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage beschäftigte, war die Arbeit von Wagner et al. [143]. Dabei wurden auf Basis von Vorarbeiten der selben Arbeitsgruppe [198] die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untergruppen der Proteobakterien untersucht. Es zeigte sich, dass die  $\gamma$ -Untergruppe nicht den Großteil der Bakterien ausmachte, wie es bei vergleichenden Messungen durch Kultivierungsmethoden der Fall war. Dies wurde damit begründet, dass nährstoffreiche Anreicherungsmedien einen Selektionsvorteil für die  $\gamma$ -Bakterien bieten, was zu einer falschen Vorstellung über die Populationszusammensetzung im Belebtschlamm geführt hatte [143]. Weitere vergleichende Untersuchungen von unterschiedlichen Abwasseranlagen kamen zu dem Ergebnis, dass die Populationszusammensetzung dieser Anlagen sehr verschieden sein kann [201]: Eine kommunale Abwasseranlage zeigte die typische Verteilung für Abwassersysteme dieser Art, nämlich einen hohen Anteil an  $\beta$ -Proteobakterien und niedrige, ungefähr ähnliche Anteile von  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Bakterien. Weiterhin wurden Bakterien aus der Gruppe der *Cytophaga-Flavobacterium*-Untergruppe und gram-positive Bakterien untersucht, die ähnliche Anteile wie die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Bakterien aufwiesen. Demgegenüber war in der zweiten Abwasseranlage, in der Molkereiabwasser behandelt wurde, eine klare Dominanz der *Cytophaga-Flavobacterium*-Untergruppe zu finden. Dies zeigte, dass unterschiedliche Nährstoffverhältnisse deutliche Unterschiede in der Bakterienzusammensetzung bedingen können, die bereits mit Gensonden niedriger phylogenetischer Spezifität nachgewiesen werden können.

Ganzheitliche Analysen zu Populationsveränderungen in einem biologischen Abwasserbehandlungssystem eignen sich zur Beurteilung der verschiedenen Effekte, die durch Änderung der Prozessparameter oder der Nährstoffversorgung hervorgerufen werden können. Dazu zählen Parameter wie z.B. hydraulische Retentionszeit (HRT), pH-Wert, Salzgehalt, Temperatur, Sauerstoffversorgung sowie Art und Konzentration der C-Quelle. Weiterhin kann die Reaktion parallel betriebener Systeme auf die Änderung eines Parameters untersucht werden, da z.B. ein gleiches Abbauverhalten nicht zwingend durch die gleiche Biozönose erfolgen muss. Die Biozönose kann in Abwassersystemen eine hohe Diversität besitzen, so dass verschiedene Antworten auf äußere Einflüsse denkbar sind. Es zeigte sich bei Untersuchungen in Belebtschlamm, dass die Bakterienzusammensetzung stark variieren konnte, ohne dass die Abbauleistung davon betroffen war [195, 196]. Weiterhin zeigten Parallelansätze unterschiedliche Adaptationszeiten an neue Nährstoff- und Betriebsparameter, wobei sich

auch die Bakterienzusammensetzung der Ansätze unterschied [202]. In Ballinger et al. [203] ist beschrieben, dass die Erhöhung der C-Quellen-Konzentration in einem Nitrifikationsreaktor und ihre anschließende Erniedrigung auf das Ausgangsniveau dazu führte, dass bei Versuchsende mit Hilfe der FISH die bekannten Ammonium-Oxidierer nicht mehr gefunden werden konnten, obwohl die Nitrifikationsleistung nach außen unbeeinflusst blieb. Dies zeigt, dass die Bakterienpopulation in einem biologischen System sehr dynamisch ist, wobei Unterschiede in einem nach außen vergleichbaren Verhalten resultieren können. Damit verbunden ist auch die Fähigkeit, sich schnell an äußere Störeinflüsse anzupassen, ohne dass die Abbauleistung dauerhaft gestört ist [184]. Um diese teilweise sehr komplexen Populationsanalysen durchzuführen, werden neben der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung häufig weitere Methoden wie die PCR-DGGE eingesetzt [183, 184, 202, 203, 204] (s. Abschnitt 2.5.5).

### 2.6.3 Spezielle Populationsanalysen

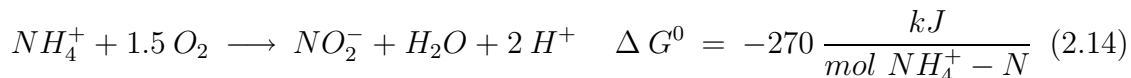
Um spezielle Fragestellungen der Abwasserbehandlung zu bearbeiten, wurden weitere Sonden für bestimmte Vertreter der Abwasserbakterien entwickelt. Beispiele hierfür sind Bakterien, die für die biologische Phosphatelimination verantwortlich sind (*enhanced biological phosphate removal*, EBPR) sowie filamentöse Bakterien, die für das Auftreten von Blähschlamm verantwortlich gemacht werden. Im Falle der Phosphatelimination zeigte sich mit Hilfe der *in-situ* Detektion, dass neben *Acinetobacter* v.a. gram-positive Bakterien mit hohem G+C Gehalt (z.B. *Actinobacteria* [205, 206]) eine wichtige Rolle spielen [207]. Der Anteil an *Acinetobacter* betrug nur ca. 8% und damit weit weniger als durch Anreicherungsverfahren zu vermuten war. Ebenso zeigte sich, dass die  $\beta$ -Bakterien weitaus zahlreicher auftraten als die  $\gamma$ -Bakterien, zu denen *Acinetobacter* zählt [199, 207]. Mit Hilfe von FISH bestätigte sich auch, dass die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Bakterien eine wichtige Rolle im EBPR Prozess spielen [145]. Teilweise ist es jedoch noch unklar, welche Bakterienarten in Realsystemen für die EBPR verantwortlich sind [206], so dass hier weiterhin großer Forschungsbedarf besteht.

Als filamentöse Bakterien wurden mit Hilfe von Gensonden z.B. *Sphaerotilus spec.* [199], *Haliscomenobacter spp.*, *Leptothrix spp.*, *Thiothrix spp.*, Eikelboom Typ 021N [142, 208] sowie *Gordonia spp.* [209] und *Microthrix parvicella* [210, 211] identifiziert. Wird die FISH-Analyse zur Kontrolle von Abwasseranlagen mit automatischer Bildanalyse gekoppelt, kann sie sich als Frühwarnsystem für das Auftreten von Blähschlamm eignen [142].

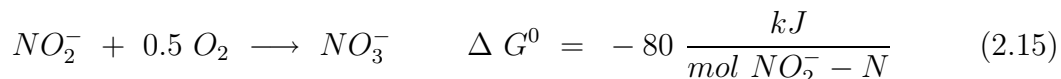
Mit Hilfe molekularbiologischer Methoden lassen sich auch Abwassersysteme zur Behandlung spezieller Schad- oder Problemstoffe untersuchen, wie z.B. der Abbau aromatischer Komponenten [212], die Behandlung von Abwässern unter mesophilen und thermophilen Bedingungen [213, 214] oder anaerobe Systeme [215].

### 2.6.4 Nitrifikation

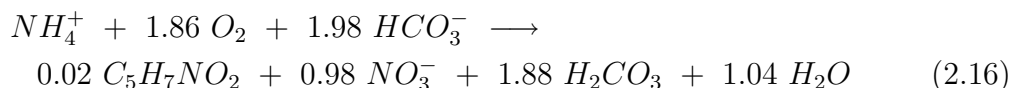
Eine wichtige Abbauleistung biologischer Systeme in der Abwasserbehandlung ist die Nitrifikation. Dabei wird Ammonium in einer zweistufigen Oxidation zuerst in Nitrit und weiter in Nitrat umgewandelt. Die dafür verantwortlichen Bakterien werden allgemein als Nitrifikanten bezeichnet. Damit ist jedoch keine phylogenetisch einheitliche Gruppe verbunden. Das wird umsomehr dadurch deutlich, dass bislang kein Bakterium bekannt ist, welches beide Schritte, d.h. sowohl die Oxidation zu Nitrit als auch die weitere Oxidation zu Nitrat, durchführen kann [216]. Die Mehrzahl der zur Nitrifikation befähigten Bakterien gehören zu den chemoautotrophen Bakterien, d.h. Ammonium bzw. Nitrit fungiert als Elektronendonator und anorganischer Kohlenstoff (Kohlensäureformen,  $\text{CO}_2$ ) als Kohlenstoffquelle. Der erste Schritt wird durch die Ammonium-Oxidierer (AOB, Nitrosifizierer) durchgeführt (s. Gleichung 2.14), zu denen z.B. Bakterien der Gattung *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus* und *Nitrospira* gehören (s. auch Abbildung 2.6). Der erste Teilschritt dieser Reaktion, die Oxidation des Ammonium zu Hydroxylamin, wird katalysiert von der Ammonium-Monooxygenase, deren Strukturgen *amoA* ebenfalls zum Nachweis von AOB verwendet werden kann (s. Abschnitt 2.5.5).



Im zweiten Schritt wird Nitrit durch Nitrit-Oxidierer (Nitrifizierer wie *Nitrobacter* und *Nitrospira*) zu Nitrat oxidiert (s. Gleichung 2.15).



Wird die autotrophe Verstoffwechslung von Kohlenstoffdioxid und die Bildung von Zellmasse mit einberechnet, ergibt sich anhand Gleichung 2.16 ein Sauerstoffverbrauch von 4,34 g/g  $\text{NH}_4^+$ -N [217]. Demgegenüber steht bei der aeroben, heterotrophen Umsetzung organischer Materie (OM) ein Sauerstoffverbrauch von nur 1,42 g/g OM [217].



Die Energieausbeute der Nitrifikation ist niedrig, so dass sich daraus niedrige Wachstumsraten und lange Generationszeiten ergeben. Für heterotrophe Bakterien kann eine mittlere Wachstumsrate von  $\mu = 0,3 \text{ h}^{-1}$  angenommen werden, während sie für die Autotrophen im Bereich von  $\mu = 0,08 \text{ h}^{-1}$  liegt [218]. Dies kann zu Problemen



bei der Etablierung der Nitrifikation in biologischen Anlagen führen. Die Einfahrphase von Bioreaktoren zur gleichzeitigen C- und N-Elimination kann in diesen Fällen deutlich erhöht sein [219]. Entsprechend besteht bei Störungen einer biologischen Anlage die Gefahr, dass die Nitrifikanten aus dem System ausgewaschen werden oder eine längerfristige Verringerung der Nitrifikationsleistung folgt [218], insbesondere bei Verwendung suspendierter Biomasse [220]. Das Optimum der Nitrifikation liegt im Bereich von pH-Werten von 7,5 bis 8,5, trotz der Sauerstoffabhängigkeit kann die Nitrifikation in Lösungen bis zu einer Sauerstoff-Konzentration von nur 0,5 mg/L beobachtet werden [93].

### 2.6.5 Phylogenie der Nitrifikanten

Die Ammonium-Oxidierer (AOB) gehören mit Ausnahme von *Nitrosococcus oceanus* ( $\gamma$ -Unterklasse) zu den  $\beta$ -Proteobakterien und sind obligat chemolithoautotroph. Dagegen sind manche Nitrit-Oxidierer mixotroph bzw. heterotroph [216, 221, 222]. Zu den als AOB beschriebenen Gattungen gehören *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* sowie *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus* [216], wobei die letzteren drei eine recht enge Verwandtschaft zueinander zeigen [223] und deswegen auch unter dem gemeinsamen Gattungsnamen *Nitrospira* zusammengefasst werden [224, 225, 226]. Zu den Nitrit-Oxidierern (NOB) gehören die Gattungen *Nitrobacter* ( $\alpha$ -Unterklasse), *Nitrococcus* ( $\gamma$ -Unterklasse) sowie *Nitrospina* ( $\delta$ -Unterklasse) und *Nitrospira* (eigene Klasse [177], mit gewisser Verbindung zur  $\delta$ -Unterklasse [216]) [190, 216]. *Nitrospira* war zwar lange Zeit als Nitrit-Oxidierer bekannt, insbesondere in Meerwasser, in Süßwasser und Abwassersystemen wurde deren Bedeutung jedoch lange unterschätzt. *Nitrospira moscoviensis* wurde als erster Süßwasser-Vertreter aus einem Heizrohrsystem isoliert [227]. Dabei wurde bereits die Einordnung als eigene Klasse innerhalb der *Bacteria* getroffen. In Abbildung 2.6 ist der Stammbaum der *Bacteria* unter besonderer Berücksichtigung der Nitrifikanten dargestellt.

Weitergehende Untersuchungen, die Vergleiche zwischen den Ergebnissen aus 16S-rRNA-Sequenzanalysen und der *amoA*-Sequenzanalyse miteinbezogen [187], ergaben teilweise sog. *mismatches* zwischen der Sonde Nso190 (s. Abbildung 2.6) und der Basensequenz mancher AOB. In der Praxis kann das heißen, dass die Stringenz bei der Hybridisierung herabgesetzt werden muss, um eine Bindung und damit einen Nachweis der AOB mit Nso190 zu erzielen [228]. Eine umfangreiche Evaluierung vieler AOB-spezifischer Sonden wurde von Utaker und Nes [225] durchgeführt. Im Falle der Sonde Nso190 wurde darauf hingewiesen, dass die Verringerung der Stringenz zwar zusätzlich den Nachweis von z.B. *Nitrosomonas ureae* erlaubt (3 *mismatches*), dabei gleichzeitig aber auch weitere Vertreter der  $\beta$ -Proteobakterien erfasst werden, die nicht zu den AOB gehören. Je nach untersuchtem biologischem System (Boden, Frischwasser) kann dies zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen, im Abwasserbereich, wie bei Persson et al. [228] gezeigt, aber auch sinnvoll sein. Nach [225] bindet

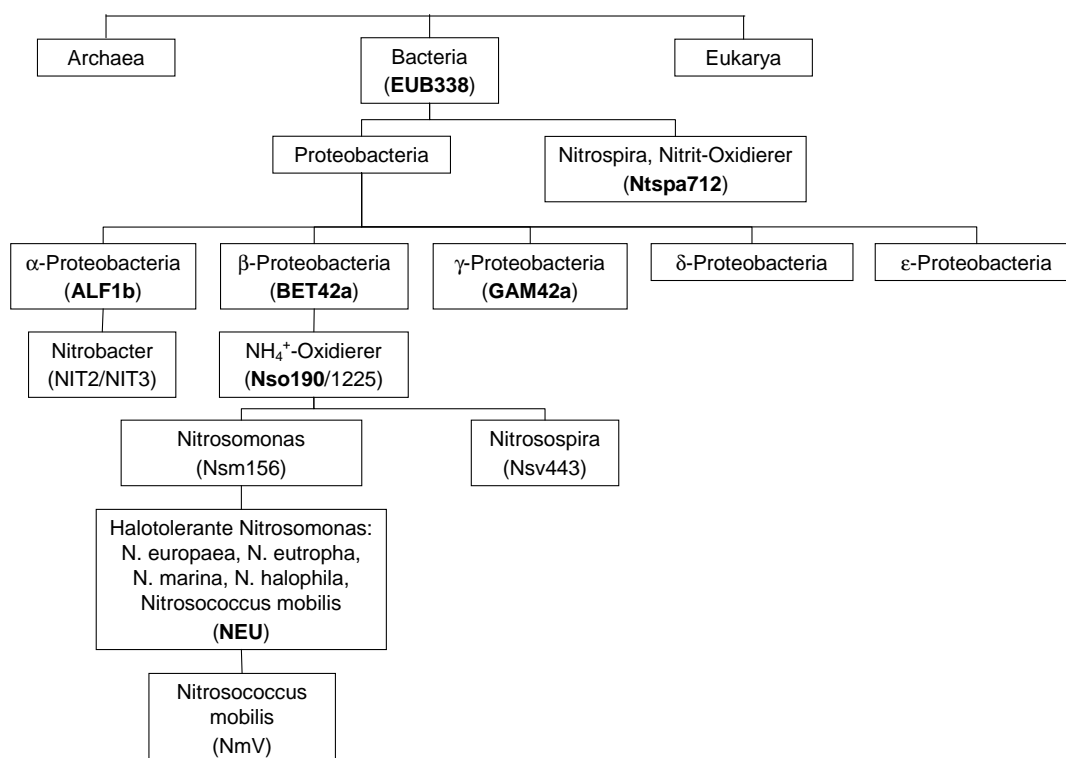


Abbildung 2.6: Stammbaum der *Bacteria* und der Nitrifikanten mit Angabe der Oligonukleotidsonden für FISH (fettgedruckt: in dieser Arbeit eingesetzt).

die Sonde Nsm156 (s. Abbildung 2.6) bei Einhaltung der Hybridisierungsbedingungen ausschließlich Vertreter von *Nitrosomonas* und grenzt sich dabei von der Probe Nsv443 ab, die spezifisch die Vertreter der *Nitrospira* nachweist. Die Sonde NEU bindet bei gleichzeitigem Einsatz einer Kompetitorsonde (cNEU) nur solche Spezies, die nicht mehr als 1 *mismatch* besitzen und ist somit ebenfalls sehr spezifisch für die Detektion der halotoleranten Arten von *Nitrosomonas* (s. auch Abbildung 2.6). Für *Nitrosococcus mobilis* zeigte sich, dass sich die Sonde NmV genügend von anderen Sequenzen unterscheidet und sich somit zum spezifischen Nachweis eignet. Da jedoch die Anzahl der bekannten 16S-rRNA-Gensequenzen stetig wächst, kann sich auch die hier beschriebene Spezifität der Gensonden ändern.

Im Falle der Sonde Ntspa712 zeigte sich, dass diese für den Nachweis der gesamten Gattung *Nitrospira* geeignet ist, also nicht nur für bestimmte Untergruppen dieser Gattung, wie dies bei früher entwickelten Sonden teilweise der Fall war [190].

## 2.6.6 Populationsanalysen der Nitrifikanten

In den letzten Jahren wurden intensive Bemühungen unternommen, das Auftreten und Verhalten der Nitrifikanten unter verschiedenen Umwelt- und Nährstoffbedingungen zu untersuchen. Zur Optimierung biologischer Anlagen hinsichtlich der Betriebsführung sowie der Nährstoffversorgung sind diese Kenntnisse hilfreich.

### 2.6.6.1 Populationsanalysen der AOB

Bei allen bisherigen Untersuchungen in Abwassersystemen zeigte sich eine hohe Diversität in der Populationszusammensetzung der AOB. Deswegen wurden häufig hierarchische Sonden-Sets eingesetzt, um die Aussagekraft der Ergebnisse zu verbessern. Es zeigte sich, dass in den meisten Abwassersystemen die Gattung *Nitrosomonas* vorherrschend war. Mobarry et al. [229] entwickelten das erste Gensonden-Set, mit dem sich eine gute Charakterisierung der AOB durchführen ließ: Nso190 und Nso1225, Nsm156, Nsv443 und NEU (s. auch Abbildung 2.6). Im dabei untersuchten Abwassersystem wurden keine AOB der Gattung *Nitrospira* (Nsv443) nachgewiesen, außerdem zeigte sich, dass eine Vielzahl der mit der AOB-spezifischen Sonde Nso190 nachgewiesenen Bakterien nicht mit der Sonde Nsm156 zu detektieren waren. Dies legte den Schluss nahe, dass es weitere, noch nicht mit den bisher bekannten Gensonden nachzuweisende AOB geben musste, die weder mit Nsm156 noch mit Nsv443 detektiert werden konnten. Eine weitere Spezifizierung der AOB und gleichzeitige Unterteilung der mit der Sonde NEU nachweisbaren Bakterien gelang mit der Sonde NmV, spezifisch für *Nitrosococcus mobilis* [223]. In Untersuchungen von Juretschko et al. [193] und Rowan et al. [230] war *Nitrosococcus mobilis* der dominierende Vertreter der AOB. Auch zeigte sich, dass eine geringe Anzahl von Bakterien nur mit NmV und nicht mit NEU nachgewiesen werden konnten, obwohl NEU für

eine übergeordnete Ebene der AOB steht, was wiederum für eine hohe, teilweise in ihrer DNA-Sequenz noch unbekanntem Diversität der AOB spricht. Mit der Sonde Nsv443 konnten bei Juretschko et al. [193] wiederum keine Bakterien nachgewiesen werden, ebenso bei [228, 231], woraus geschlossen werden kann, dass *Nitrospira* in Abwassersystemen nur eine untergeordnete Rolle spielt. Bakterien, die zwar mit der Sonde Nsm156, nicht jedoch mit der Sonde NEU nachgewiesen werden, können z.B. zur Art *Nitrosomonas ureae* gehören [232].

Die Amplifizierung der 16S-rRNA-Sequenzen konnte die Annahme unterstützen, dass die Diversität der AOB auch in einfachen Abwassersystemen sehr hoch sein kann [233]. De Beer und Schramm [234] fanden in nitrifizierenden Biofilmen eine Vielzahl von Vertretern der Gattung *Nitrosomonas*, in diesem Falle aber auch die Gattung *Nitrospira*. Aus diesen Ergebnissen resultierte die Frage, inwieweit sich aus dieser Diversität Konsequenzen für den Betrieb von nitrifizierenden Abwasseranlagen ergaben. Überraschenderweise zeigten auch Untersuchungen in anoxisch betriebenen Biofilmreaktoren die Anwesenheit von AOB mit Hilfe der Sonden Nso190, Nso1225 und NEU [149]. Grundlage dieser Untersuchungen war die Charakterisierung der anaeroben Ammonium-Oxidation (Anammox). Diese wurde auch für Vertreter der aeroben  $\text{NH}_4^+$ -Oxidation beschrieben, allerdings wiesen Bakterien der *Planctomycetales* deutlich höhere Anammox-Aktivitäten auf als die AOB [149, 235], so dass davon ausgegangen werden kann, dass hauptsächlich erstere für die anaerobe Ammonium-Oxidation verantwortlich sind. In einem Prozess mit AOB und Anammox-Bakterien kann somit eine komplett autotrophe Stickstoffentfernung aus einem Abwasser realisiert werden [153, 235]. Auch in aerob/anoxisch gefahrenen Reaktoren mit einer Sauerstoffkonzentration von unter 0,5 mg/L konnten hohe Ammonium-Oxidationsraten gefunden werden [185]. Die Zusammensetzung der AOB kann dabei variieren, z.B. wurden bei Park et al. [185] sowohl Vertreter von *Nitrosomonas* als auch von *Nitrospira* in sich ändernden Anteilen gefunden. Dabei schlossen die Autoren aus dem Vergleich mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen, dass *Nitrospira* besser an geringe Sauerstoffkonzentrationen adaptiert ist, da dies ein Kennzeichen für die Habitate (Sedimente, Boden) war, in denen *Nitrospira* bis dahin hauptsächlich nachgewiesen werden konnten. Dies bestätigte die Untersuchungen, in denen *Nitrospira* im Abwasserbereich nur selten gefunden wurde.

#### 2.6.6.2 Populationsanalysen der NOB

Bei den Nitrit-oxidierenden Bakterien stellte sich im Abwasserbereich heraus, dass in fast allen Untersuchungen Vertreter der *Nitrospira* die vorherrschende Gruppe darstellten [172, 190, 193, 232, 236, 237]. Entgegen der früheren Annahme, dass *Nitrobacter* der wichtigste Nitrit-Oxidierer ist, wurden Vertreter dieser Gruppe nur selten nachgewiesen [229, 231, 234, 238]. In diesen Fällen wurden jeweils sowohl *Nitrospira* als auch *Nitrobacter* gefunden, wobei vermutet werden kann, dass *Nitrobacter*

nur bei bestimmten Bedingungen wie hohen Salz- und Ammoniumkonzentrationen in mit FISH detektierbaren Konzentrationen vorliegt [172, 190]. Dies wäre eine Erklärung für die bevorzugte Isolierung von *Nitrobacter* in Anreicherungskulturen. Die Einteilung der Nitrit-Oxidierer kann somit auch in sog.  $r$ -Strategen (hohe Wachstumsrate  $r$  in  $\text{h}^{-1}$ , wie *Nitrobacter*) und  $K$ -Strategen (hohe Substrataffinität  $K$  in  $\text{g/L}$ , Wachstum bei geringen Konzentrationen, wie *Nitrospira*) erfolgen [190, 239]. Diese Einordnung ist an die von Monod vorgeschlagene Beschreibung des bakteriellen Wachstums angelehnt (Gleichung 2.17) [240].

$$r = r_{max} \frac{S}{S + K_S} \quad (2.17)$$

mit:

- $r_{max}$  = maximale Wachstumsrate in  $\text{h}^{-1}$
- $S$  = Substratkonzentration in  $\text{g/L}$
- $K_s$  = Substratsättigungskonstante in  $\text{g/L}$ , beschreibt die Affinität des Substrates zum Mikroorganismus

### 2.6.6.3 Einfluss äußerer Faktoren auf die Nitrifikanten

Zur Etablierung von Nitrifikanten in biologischen Systemen ist aufgrund der niedrigen Wachstumsraten immer eine gewisse Einfahrzeit erforderlich [219]. Für eine gleichzeitige Eliminierung des Ammoniumstickstoffs und organischer C-Quellen in Biofilmreaktoren erweist es sich als sinnvoll, das System zuerst ohne organische C-Quelle zur Etablierung einer autotrophen Bakterienpopulation zu betreiben. Danach kann dann auf ein Medium mit C-Quellen umgestellt werden [241]. Dieses Vorgehen kann insbesondere dann nötig sein, wenn durch etwaige Rückspülvorgänge ein Anwachsen der Nitrifikanten erschwert wird. Auch durch die Wahl einer geeigneten hydraulischen Retentionszeit (HRT) lässt sich eine gemischte Bakterienpopulation zur gleichzeitigen N- und C-Eliminierung verwirklichen. Beispielsweise kann in einem Suspensions-Biofilmreaktor die HRT so eingestellt werden, dass sich die heterotrophen Bakterien in Suspension befinden, die autotrophen Bakterien als Biofilm anwachsen [218]. Wachsen sowohl die heterotrophen Bakterien als auch die Nitrifikanten als Biofilm, so besiedeln die schnellwachsenden heterotrophen Bakterien die äußeren Schichten des Biofilms, während die Nitrifikanten in den tieferen Schichten des Biofilms zu finden sind [186, 241, 242, 243]. Daraus folgen Diffusionslimitierungen bestimmter Nährstoffe für die Nitrifikanten, insbesondere für die gelöste Sauerstoffkonzentration (*dissolved oxygen*, DO). Dies kann zu einer Beeinträchtigung der Nitrifikationsleistung führen [186, 243]. Demgegenüber wurde aber

auch festgestellt, dass die Nitrifikation bei gleichzeitiger C-Eliminierung nur unwesentlich gestört wird, was z.B. mit der Fähigkeit der Nitrifikanten begründet werden kann, auch bei sehr niedrigen DO-Konzentrationen aktiv zu sein [241, 242]. Durch eine geeignete Wahl der Parameter Beladung und hydraulische Retentionszeit sowie der Rückspülintervalle kann somit eine stabile Nitrifikationsleistung erzielt werden. Nitrifikanten, insbesondere die Ammoniumoxidierer, wachsen häufig als Mikrokolonien, bestehend aus ca. 3000 Einzelzellen, mit einem Durchmesser von 3-20  $\mu\text{m}$  und meist zwischen heterotrophen Bakterien eingebettet [175, 244]. Bei *Nitrospira* wurde auch netzartiges Wachstum beobachtet [186]. Die wichtigsten Auswirkungen äußerer Faktor auf die Nitrifikationsleistung und die Nitrifikanten sind in Tabelle 2.4 zusammengefasst.

Tabelle 2.4: Einfluss äußerer Faktoren wie Nährstoffversorgung, Zugabe von C-Quellen, pH-Wert, Temperatur und HRT auf die Nitrifikation sowie die Ammonium- und Nitrit-Oxidierer in biologischen Abwassersystemen. Angabe der untersuchten Systeme und der angewandten Nachweismethoden.

Quelle	System	Beobachtungen	Methode
[233]	synth. Raffinerieabwasser	hohe AOB-Diversität, <i>Nitrosomonas</i> > <i>Nitrosospira</i>	PCR, FISH
[230]	häusl. und industr. Abwasser	<i>N. mobilis</i> als Hauptvertreter (da halotolerant)	PCR
[185]	full-scale WWTP (häusl. Abwasser)	<i>Nitrosospira</i> bei geringen DO-Konz., niedrige T: mehr <i>N. europaea</i> , höhere T: mehr <i>Nitrosospira</i>	amoA-Analyse
[232]	BFR mit häusl. Abwasser, autotropher Rotating Disk Reactor	Wechsel von häuslichem auf synthetisches Abwasser bewirkt Verschiebung von <i>N. ureae</i> zu <i>N. europaea/eutropha</i> , C/N-Erhöhung verringert Nitrifikation, im älteren autotrophen Biofilm dominiert NEU, im häuslichen Nsm>NEU	PCR, FISH
[241]	Biological Aerated Filter	pH-Wert Änderung beeinträchtigt die Nitrifikation stärker als eine CSB-Erhöhung, Prozess der Biofilmbildung wichtig (Etablierung der AOB + NOB)	RNA-Extraktion
[245]	Sequencing Batch Reactor mit Stillstandszeiten	Hungerphasen beeinträchtigen AOB kaum, NOB stärker, heterotrophe am stärksten betroffen, FISH-Signalintensität auch nach Hungerzeit konstant, Parallelreaktoren mit unterschiedlicher Population und Reaktion unter Stress	FISH
[242]	Rotating Disk Reactor, Acetat-Zugabe	Bei Erhöhung von C/N Konkurrenz um O <sub>2</sub> , DO im Biofilm bis ca. 150-200 μm Tiefe vorhanden, Nitrifikation auch bei sehr geringen DO	FISH, Microelektr.
[186]	Biofilmreaktor, versch. HRT, geringe DO, CSB/N ca. 1,3	O <sub>2</sub> -Limitierung für Nitrifikanten, Erhöhung der HRT bewirkt keine Verbesserung des N- und C-Abbaus, keine <i>Nitrosospira</i> und <i>N. mobilis</i> , im Biofilm: AOB und NOB, in Suspension: Heterotrophe	FISH, amoA-Analyse
[203]	Denitr.-Nitrifikation-Bioreaktor, synth. Abwasser, versch. C/N	Erhöhung C/N von 2 auf 5 bewirkt Abnahme der Nitrifikation, Erniedrigung auf C/N = 2 vollst. Wiederherstellung, jedoch keine β-AOB mit FISH mehr detektierbar	FISH, DGGE
[246]	Fluidized Bed Reactor	Bei höheren NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Konz. und C-Zugabe erhöht sich NEU-Anteil an Nso	FISH
[190]	Biofilm-, Belebtschlammproben	<i>Nitrospira</i> kann Pyruvat aufnehmen (event. mixotropher Stoffwechsel, Vorteil in Abwassersystemen), Kanäle in Bakterienhaufen verbessern Stofftransport	FISH, MAR
[218]	Biol. Airlift Reactor	Anpassung der HRT: Heterotrophe in Suspension, Nitrifikanten im Biofilm	Mikroskopie
[247]	Laborreaktor	Einfluss NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Konz.: reversible Populationsverschiebungen, pH-Wert: irreversible Pop.-änderung, v.a. bei pH-Wert Erniedrigung	PCR





# Kapitel 3

## Experimentelle Angaben

### 3.1 Analytische Methoden

#### 3.1.1 Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)

Für die Messung des gelösten organischen Kohlenstoffs (*dissolved organic carbon*, DOC) wurden die Proben mit einem  $0,45 \mu\text{m}$  Membranfilter (Cellulosenitrat-Filter, Sartorius, Göttingen) filtriert. Die Proben wurden mit einem Shimadzu TOC-Analyzer 5000 gemessen. Dabei wurden die Proben nach Ansäuerung mit 2 N HCl (ca. 2 Tropfen auf 5 mL Probe) für 4 min mit Stickstoff ausgeblasen, um den anorganischen Kohlenstoffanteil zu entfernen. Der in der Lösung verbleibende organische Kohlenstoff wurde daraufhin an einem Platinkatalysator bei  $680 \text{ }^\circ\text{C}$  im Sauerstoffstrom zu  $\text{CO}_2$  oxidiert, welches nach der Passage einer Kühlfalle infrarotspektrometrisch (NDIR-Detektor, Nicht-dispersiver Infrarot-Gasanalysator) quantifiziert wurde. Die Kalibrierung des Messgerätes erfolgte mit einer Kaliumhydrogenphthalatlösung. Der Mittelwert aus drei Messungen wurde ermittelt. Die Proben wurden bei Bedarf mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Teilweise dienten auch die Bypass-Messungen aus der LC-DOC Untersuchung als DOC-Messwert (s. 3.1.2).

#### 3.1.2 LC-DOC Untersuchung

Zur näheren Charakterisierung der organischen Abwasserinhaltsstoffe wurde eine gelchromatographische Trennung mit on-line DOC-Detektion (*liquid chromatography*, LC-DOC) durchgeführt [248]. Hierbei wurde der DOC der Probe in einer Gelsäule nach dem Größenausschlussprinzip in Fraktionen aufgetrennt. Die Erfassung der Fraktionen erfolgte kontinuierlich durch UV-Absorption (PHD-601, Gat) und DOC-Detektion in einem Dünnfilmreaktor (Gräntzel, Karlsruhe, Oxidation des DOC zu  $\text{CO}_2$ ). Als Elutionsmittel diente Phosphatpuffer ( $1,25 \text{ g/L Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{ H}_2\text{O}$ ,  $2,5 \text{ g/L KH}_2\text{PO}_4$ , pH-Wert 6,6, isokratische Elution  $1 \text{ mL/min}$ ), als Trenngel wurde

TSK HW 40S (Porengröße: 5  $\mu\text{m}$ , 20 mm x 250 mm, Toso Haas, Stuttgart) verwendet. Die Bypassmessung diente der Bestimmung des Gesamt-DOC-Gehalts der Proben.

### 3.1.3 Chemischer Sauerstoffbedarf (CSB)

Der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) wurde mit Hilfe eines Küvettenschnelltests (Merck) gemessen. Der Messbereich lag bei 500 bis 10000 mg CSB/L bzw. 10 bis 150 mg CSB/L. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte in einem Photometer (Spectroquant Nova 60, WTW). Die Proben wurden bei Bedarf mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

### 3.1.4 Spektraler Absorptionskoeffizient (SAK)

Der spektrale Absorptionskoeffizient (SAK) wurde bei den Wellenlängen  $\lambda = 254$  nm (UV-Bereich, UV) und  $\lambda = 436$  nm (sichtbarer Bereich, Vis) gemessen. Es wurde eine Quarzglasküvette mit einer Schichtdicke von  $d = 1$  cm verwendet, als Photometer diente ein Milton Roy Spectronic 1201. Der Messwert wurde auf die Einheit des SAK [ $\text{m}^{-1}$ ] umgerechnet.

### 3.1.5 pH-Wert

Die Messung des pH-Wertes erfolgte mit Hilfe einer Einstabmesselektrode (Mettler Toledo InLab 419) und einem Messgerät (Schott pH-Meter CG 840) mit automatischer Temperaturkompensation. pH-Werte wurden mit Hilfe verdünnter HCl- bzw. NaOH-Lösungen eingestellt.

### 3.1.6 Ionenchromatographie (IC)

Die Bestimmung der Nitrit- und Nitrat-Konzentrationen erfolgte ionenchromatographisch mit einem Ionenchromatograph Metrohm IC 690. Dazu wurden die Proben in 2 mL Kunststoffgefäße überführt und bis zur Analyse bei  $-20$  °C gelagert. Als Trennsäule diente eine IC-Anionensäule Super-Sep (4,6 mm x 100 mm, Partikelgröße: 12  $\mu\text{m}$ , Metrohm, Herisau, Schweiz), als Eluent wurde 2,5 mM Phthalsäure mit 5 % Acetonitril mit einem pH-Wert von 4,2 verwendet. Die Elution erfolgte isokratisch bei einem Fluss von 1,25 mL/min, die Fraktionen wurden mit einem Leitfähigkeitsdetektor (IC 690) detektiert.

### 3.1.7 Hochauflösende Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Die Analytik für den Nachweis der optischen Aufheller wurde mit hochauflösender Flüssigkeitschromatographie (*high performance liquid chromatography*, HPLC, Hewlett-Packard HP 1090 mit Dioden Array-Detektor (DAD HP 1100) und Fluoreszenzdetektor (FLD HP 1046 A)) durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte unter den folgenden Bedingungen:

- Säule: ODS Hypersil (Agilent, HP), 4 mm x 125 mm, Partikelgröße: 5  $\mu\text{m}$ , alle Silanolgruppen mit C<sub>18</sub>-Gruppen modifiziert
- Eluent A: Acetonitril/Methanol (1:1)
- Eluent B: 0,1 M Ammoniumacetatpuffer bei pH-Wert = 6,5
- Injektionsvolumen: 50  $\mu\text{L}$
- Flussrate: 1 mL/min
- Temperatur: 35 °C
- Gradient: 20 min linearer Gradient von 10 % A / 90 % B zu 100 % A / 0 % B
- Detektionswellenlängen: DAD:  $\lambda = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda = 254 \text{ nm}$ ; FLD:  $\lambda_{exc} = 350 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 430 \text{ nm}$

### 3.1.8 LC-MS

Die Messung der Substanz Butyraldehyd erfolgte mit Hilfe eines HPLC Systems (HP 1100 Series, Agilent) gekoppelt mit einem Triple Quadrupol Massenspektrometer (MS) API 3000 (Applied Biosystems, Sciex, Canada) mit Electrospray Ionisierung (ESI, TurboIonspray<sup>TM</sup>, Sciex). Die Proben wurden zuvor derivatisiert. Dazu wurden zu 5 mL Probenlösung 100  $\mu\text{L}$  Derivatisierungsreagenz (1,3 g/L 2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH) in HCl : H<sub>2</sub>O: AcN = 2 : 5 : 1) zugesetzt und mindestens 4 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte eine Direktinjektion dieser Lösung ins LC-MS. Die Messbedingungen sind im folgenden aufgezeigt.

#### HPLC

- Trennsäule: XTerra<sup>TM</sup> MS C<sub>18</sub>, 2,1 x 150 mm, Partikelgröße: 5  $\mu\text{m}$ , Temperatur konstant 35 $\pm$ 2 °C
- Eluenten: A: 1 mM Ammoniumacetat in entionisiertem Wasser (Milli-Q), B: Acetonitril

- Gradientenprogramm: 70 % A, in 25 min linearer Gradient bis 0 % A, 5 min isokratisch bei 0 % A
- Flussrate: 0,3 mL/min
- Injektionsvolumen: 20  $\mu$ L

### ESI

- Nebulizer gas flow: 1,23 L/min
- Curtain gas flow: 1,73 L/min
- Dry gas flow: 6 L/min
- Dry gas temperature: 450 °C
- IS: -5000 V

### MS/MS

- Multiple reaction monitoring mode (MRM), Ionenübergänge: m/z 251,2  $\rightarrow$  m/z 163,2
- Collision gas thickness:  $2,29 \times 10^{17}$  cm<sup>-2</sup>, Kollisionsenergie: 16 eV

Es erfolgte eine 6-Punkt Kalibrierung des Systems von 2  $\mu$ g/L bis 200  $\mu$ g/L Butyraldehyd. Es wurde eine lineare Kalibrierfunktion erstellt ( $y = 5,43 \cdot 10^6 x + 12,8 \cdot 10^6$ ,  $R^2 = 0,993$ ), alle Proben wurden in Doppelbestimmung gemessen.

### 3.1.9 Gaschromatographie (GC-MS)

Mit der Gaschromatographie gekoppelt mit einem Massenspektrometer (GC-MS, Gaschromatograph GCQ, Finnigan MAT) wurden die Substanzen Butandiol und Propyldioxepe analysiert. Die Messbedingungen sind im folgenden aufgeführt:

- Säule: DB-5MS, Länge: 30 m, Innendurchmesser: 0,25 mm, Filmdicke: 0,25  $\mu$ m
- Trägergas: He 5.0
- Injektionsvolumen: 1  $\mu$ L
- Interner Standard: Hexandiol
- Temperaturprogramm: 60 °C mit 9 °C/min auf 110 °C, mit 25 °C/min auf 280 °C

- Injektor: splitless, Temperatur: 250 °C, Eingangsdruck: 9-13 psi
- MS: Fullscan
- Massenbereich: 30 bis 200 g/mol
- Temperatur der Ionenquelle: 200 °C
- Transferline: 250 °C
- Elektronenstroßionisation bei 70 eV

2 mL der Probe (bei Bedarf wurde die Probe mit demineralisiertem Wasser verdünnt) wurden mit 2 mL Ethylacetat, 0,5 mL NaCl-Lösung (100 g/L) und 100  $\mu$ L Hexandiol (2 g/L, interner Standard) in ein Schraubverschlussröhrchen gegeben und ca. 30 s lang ausgeschüttelt. Nachdem sich die beiden Phasen getrennt hatten, wurden ca. 1,5 mL des mit den beiden Stoffen angereicherten Ethylacetats abpipettiert, in ein Messröhrchen für die GC gegeben und fest verschlossen. Vor jeder Messreihe wurde eine Kalibriergerade für beide Substanzen aufgenommen. Die Messwerte wurden bezogen auf den internen Standard berechnet.

### 3.1.10 Wasserstoffperoxid-Bestimmung

Die Wasserstoffperoxid-Analyse wurde in Anlehnung an DIN 38409 Teil 15 durchgeführt. Dabei wurden 9 mL der Probe mit 1 mL eines Titanreagenz versetzt und das gebildete Peroxotitanylkatation photometrisch bei  $\lambda = 415$  nm bestimmt (UV-Spektrometer Cary 50, Varian).

### 3.1.11 Ammonium-Bestimmung

Die Bestimmung von Ammonium erfolgte mit einem Küvettenschnelltest (Merck, Messbereich 0,2 bis 8,0 mg/L  $\text{NH}_4^+$ -N und 4,0 bis 80,0 mg/L  $\text{NH}_4^+$ -N) oder in Anlehnung an DIN 38406 Teil 5. Bei der DIN-Messmethode wurde die Probe mit einer Salicylat-Citrat-Lösung (13 g Natriumsalicylat, 13 g Trinatriumcitrat-Dihydrat, 0,097 g 2-Nitroprussidnatrium-Dihydrat, ad 100 mL entionisiertes Wasser) sowie einer Natriumdichlorisocyanurat-Reagenzlösung (1,6 g Natriumhydroxid, 0,1 g Dichlorisocyanurat, ad 50 mL entionisiertes Wasser) versetzt und nach 90 min Inkubation bei  $25 \pm 1$  °C photometrisch bei  $\lambda = 655$  nm vermessen. Eine Kalibrierreihe wurde mit Hilfe von Ammoniumsulfat (getrocknet) erstellt. Der Messbereich lag bei 10 bis 1000  $\mu$ g/L. Bei Bedarf wurden die Proben mit demineralisiertem Wasser verdünnt.

## 3.2 Reaktorkonstruktion und -charakterisierung

### 3.2.1 Reaktorkonstruktion

Grundvoraussetzung bei der Konstruktion des Oxidationsreaktors war die Beständigkeit der eingesetzten Materialien gegenüber den Abwasserinhaltsstoffen und insbesondere gegenüber den verwendeten Reagenzien. Die korrosive Eigenschaft des Ozons erlaubte somit nur den Einsatz von Edelstahl, Glas und widerstandsfähiger Kunststoffe wie z.B. Teflon. Die gesamte Anlagenkonstruktion sollte zudem in ein begehrbares Labordigestorium integriert werden, um sicheres Arbeiten mit Ozon zu gewährleisten. Weitere Anforderungen waren: Flüssigkeitsvolumen ca. 2 L, Aufnahme der Reaktionsparameter pH-Wert und Temperatur, Berechnung des Ozoneintrags in die wässrige Phase über kontinuierliche Messung der Gasvolumenströme und der Ozonkonzentrationen im Reaktionsgas vor und nach Reaktorpassage mit Hilfe eines Rechnerprogramms, kontinuierliche Dosiermöglichkeit für Wasserstoffperoxid, Einsatzmöglichkeit verschiedener UV-Strahler sowie effektive Durchmischung und Vermeidung von Toträumen. Abbildung 3.1 zeigt die Konstruktionszeichnung des Reaktors mit den angrenzenden Geräten.

Der Oxidationsreaktor bestand aus zwei hintereinander geschalteten, aus Glas hergestellten Reaktionssäulen. Die erste Säule wurde als Begasungssäule konstruiert, die zweite Säule als Bestrahlungseinheit. Hier betrug die Schichtdicke des bestrahlten Ringraumes 1 cm. Der Gaseintrag in die Begasungssäule konnte variabel entweder im oberen Teil oder im unteren Teil der Säule vorgenommen werden. Im Laufe der Versuche zeigte sich, dass der Eintrag im oberen Bereich besser geeignet war, um eine gute Zerschlagung der Gasblasen zu erreichen. In die Begasungssäule integriert war eine Rührwelle, welche am Planflanschdeckel der Säule in einem gasdichten Wellenlager sowie am Boden der Säule mit einem Teflingleitring gelagert wurde. Beide Lager konnten schmiermittelfrei betrieben werden. An der Rührwelle waren drei Propellerrührblätter angebracht, welche die Durchmischung des Reaktors ohne zusätzliche Pumpe ermöglichte. Die Strömungsrichtung im Reaktor war gegen den Uhrzeigersinn gerichtet, was bedeutete, dass die im oberen Teil der Begasungssäule eingetragenen Gasblasen nach unten mitgezogen wurden und in der Bestrahlungseinheit nach oben in Fließrichtung mitgetragen wurden. An der Rührwelle wurde zusätzlich ein Blasenzerschläger angebracht, der größere Gasblasen, die sich an den Propellerrührblättern bilden konnten und gegen die Fließrichtung nach oben aufstiegen, zerteilte. Dadurch konnte ein effizienter Ozoneintrag in das wässrige Medium erzielt werden. Es resultierten daraus bei den meisten Oxidationsexperimenten mit Abwässern niedrige Ozonkonzentrationen im Reaktorabgas, sofern dies durch die Reaktionseigenschaften der Abwasserinhaltsstoffe auch gegeben war. Abbildung 3.2 zeigt verschiedene Ansichten des Reaktors.

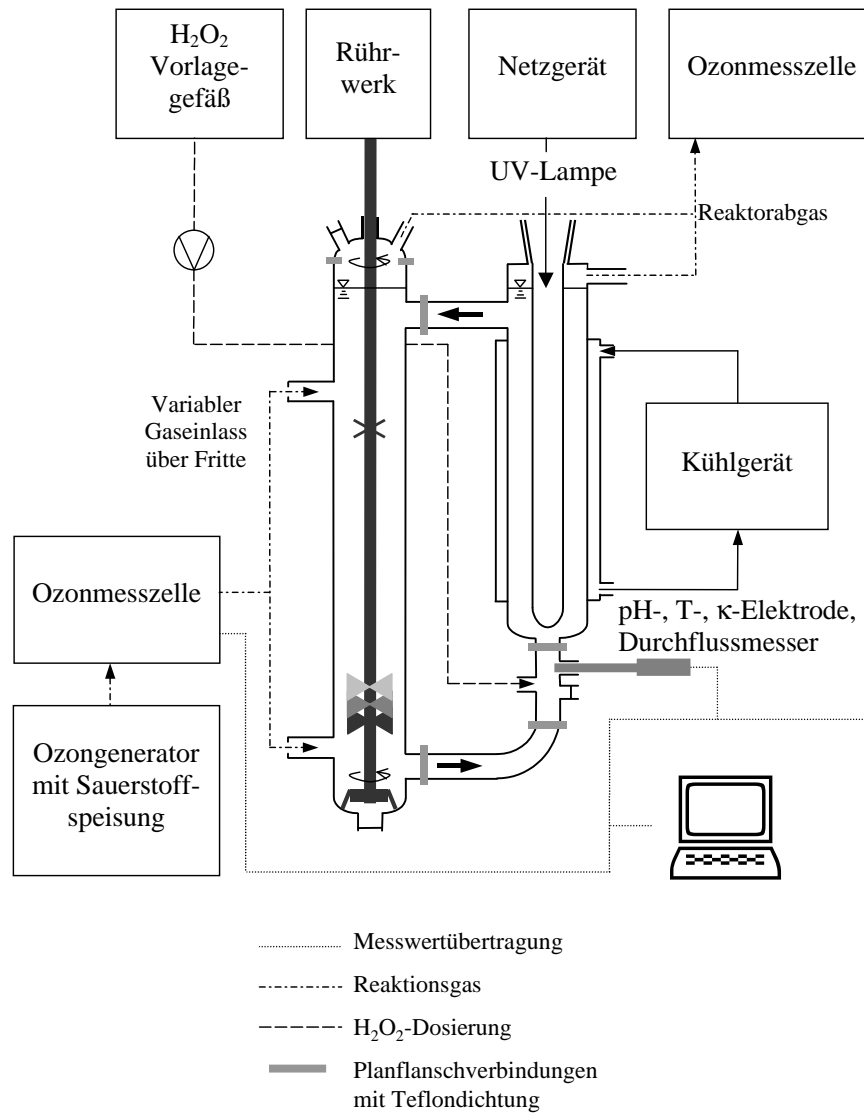


Abbildung 3.1: Oxidationsreaktor mit angeschlossenen Geräten und Datenübertragung.

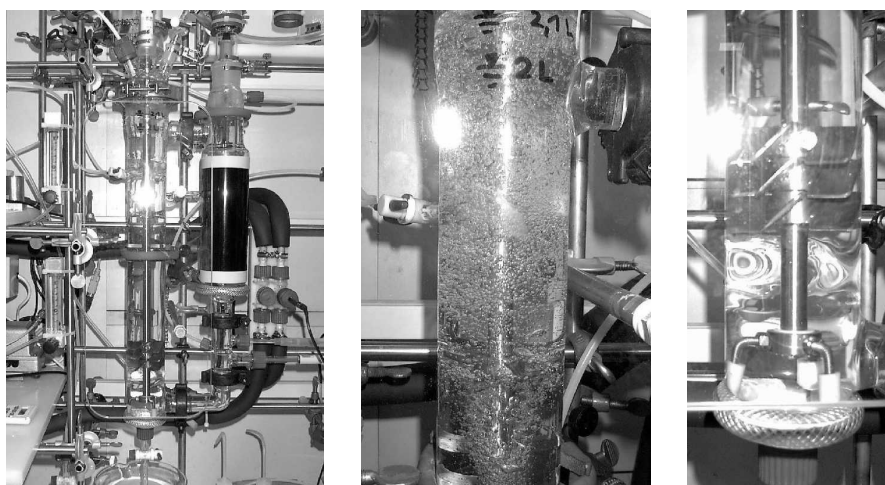


Abbildung 3.2: Detailaufnahmen des Oxidationsreaktors. Links: Reaktoreinheit, mitte: Blasensäule, rechts: Rührwelle mit Lagerung.

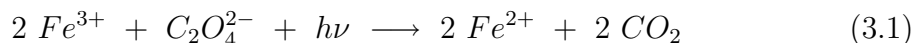
### 3.2.2 Reaktorcharakterisierung

Die Ozonproduktion erfolgte aus Sauerstoff (für medizinische Zwecke) mit Hilfe eines Ozongenerators (Anseros, Ozomat COM). Es ergab sich eine maximale Ozonproduktion von ca. 55 mg/L für den bei den Experimenten eingestellten Gasvolumenstrom von  $Q = 40 \text{ L/h}$  (s. Anhang, Abbildung B.1). Somit konnte für ein Abwasservolumen von 2 L eine Ozondosis von ca.  $1 \text{ gL}^{-1}\text{h}^{-1}$  erreicht werden.

Um konstante Temperaturen während der Oxidationsexperimente unter Einsatz von UV-Bestrahlung zu gewährleisten, wurde ein Wärmetauscher in Form eines mit Wasser betriebenen Kühlmantels um die Bestrahlungseinheit angebracht. Es standen zwei UV-Strahler zur Verfügung: ein 15 W Quecksilber-Niederdruck Strahler (15 W ND, Heraeus TNN 15/32) und ein 150 W Quecksilber-Mitteldruck Strahler (150 W MD, Heraeus TQ 150) (Spektren s. Anhang, Abbildung B.2). Im Falle des Mitteldruck-Strahlers musste am Kühlaggregat eine Solltemperatur von  $5 \text{ }^\circ\text{C}$  eingestellt werden, um eine Reaktionstemperatur von  $20 \text{ }^\circ\text{C}$  im Reaktor aufrecht zu erhalten, während der 15 W ND Strahler nur einen unwesentlichen Einfluss auf die Reaktionstemperatur besaß. Um die Augen zusätzlich vor Strahlung zu schützen, wurde um die Bestrahlungseinheit eine getönte Sichtschutzfolie geklebt.

Zur Bestimmung des Photonенflusses des 15 W ND Strahlers wurde eine Aktinometrie in Anlehnung an [249] durchgeführt. Als chemisches Aktinometer wurde Eisenoxalat eingesetzt, welches bei UV-Bestrahlung nach Gleichung 3.1 reagiert. Die Quantenausbeute ( $\Phi$ ) bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$  beträgt für diese Reaktion  $\Phi = 1,25$ .





Eine 20 mM Eisen(III)oxalat-Lösung (Eisen(III)chlorid und Kaliumoxalat, mit Schwefelsäure versetzt) wurde unter den üblichen Reaktionsbedingungen (20 °C, Rührerdrehzahl 350  $\text{m}^{-1}$ ) bestrahlt. Jede 20 s wurde 1 mL Probe genommen, mit 2 mL Phenanthrolin-Lösung (0,2 %) und 0,5 mL Natriumacetat-Lösung (0,6 M) versetzt und mit entionisiertem Wasser auf 10 mL aufgefüllt. Nach 1 h Reaktionszeit im Dunkeln wurde die Absorption bei  $\lambda = 510 \text{ nm}$  bestimmt. Aus der Zunahme des  $\text{Fe}^{2+}$ /Phenanthrolinkomplexes ( $\varepsilon = 11100 \text{ L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) pro Zeiteinheit wurde der Photonenfluss sowie die abgegebene Leistung (P) bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$  bestimmt (s. Gleichung 3.2, s. auch Anhang A, Symbole).

$$P = \dot{n} \cdot h \cdot \nu \cdot N_a \quad \text{in } (W) \quad (3.2)$$

Es ergab sich ein Photonenfluss von  $6,26 \cdot 10^{-6}$  Einstein/s und somit eine Strahlerleistung von 2,93 W bei  $\lambda = 254 \text{ nm}$ . Mit dem 150 W MD Strahler wurde keine Aktinometrie durchgeführt und auf die Angaben des Herstellers zurückgegriffen (Heraeus). Demnach erreichte der Strahler im UV-C Bereich ( $200 \text{ nm} \leq \lambda \leq 280 \text{ nm}$ ) einen Strahlungsfluss von 6,2 W.

Zur Ermittlung sinnvoller Reaktionsbedingungen wurde der Reaktor hinsichtlich der Durchströmungsgeschwindigkeit und seines Durchmischungsverhaltens charakterisiert. In den Reaktor wurde unterhalb der Bestrahlungseinheit ein Flügelradmessaufnehmer (Kobold KFC 1325) mit Hilfe zweier Anschlussflansche integriert. Bei einer Rührerdrehzahl von  $350 \text{ min}^{-1}$  ergab sich ein Volumenstrom von ca. 1,6 L/min. Die Durchmischungszeit wurde mit Hilfe einer KCl-Lösung ermittelt, die in den Reaktor injiziert wurde und durch die elektrische Leitfähigkeit detektiert wurde. Die Zeit bis zur Einstellung eines konstanten Wertes wurde ermittelt und in Abhängigkeit von der Rührerdrehzahl aufgetragen (s. Abbildung B.3 im Anhang). Die Durchmischungszeit bei einer Rührerdrehzahl von  $350 \text{ min}^{-1}$  betrug ca. 30 s. Dies war bei den Oxidationsexperimenten, welche teilweise über mehrere Stunden durchgeführt wurden, ausreichend, um von einer vollständigen Durchmischung auszugehen.

Die Messung des  $K_L a$ -Wertes (s. Abschnitt 2.2.5) bei diesen Reaktionsbedingungen wurde in Anlehnung an [89] sowohl in demineralisiertem Wasser (pH 2) als auch in einer Natriumsulfat-Lösung (23,67 g/L, I = 0,5 M, pH 2) durchgeführt. Letztere Messung sollte dazu dienen, den  $K_L a$ -Wert bei kleinen Gasblasen zu bestimmen, wie sie auch in den Oxidationsexperimenten mit Abwasser auftraten. Gleichzeitig sollte jedoch eine Reaktion des Ozons mit Wasserinhaltsstoffen vermieden werden, um einen  $K_L a$ -Wert unabhängig vom Abwasser und den Reaktionen des Ozons mit den verschiedenen Abwasserinhaltsstoffen zu erhalten. In 30 s-Abständen wurden 10 bzw. 5 mL Probe ( $V_1$ ) entnommen und sofort mit 10 mL einer Kaliumindigo-trisulfonat-Lösung (77 mg/L) versetzt. Es wurde auf 100 mL mit entionisiertem

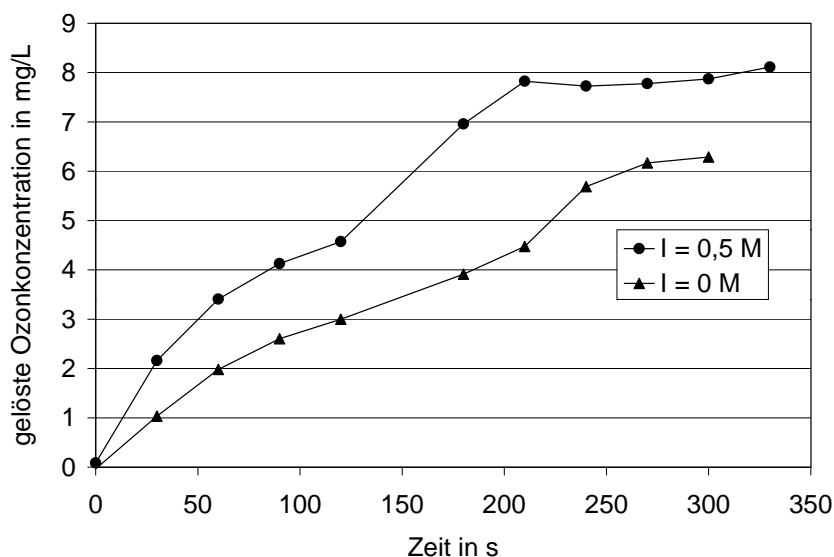


Abbildung 3.3: Bestimmung des  $K_{La}$ -Wertes. Messung des Ozoneintrages in demineralisiertes Wasser mit der Ionenstärke 0 mol/L und eine Natriumsulfatlösung mit der Ionenstärke 0,5 mol/L.

Wasser verdünnt und die Absorption bei  $\lambda = 600$  nm bestimmt. Der Ozongehalt  $\rho_{O_3}$  in mg/L errechnete sich nach Gleichung 3.3 (DIN 38408 - G 3-3):

$$\rho_{O_3} = (Absorption(Blindprobe) - Absorption(Probe)) \cdot \frac{240}{V_1} \quad (3.3)$$

Abbildung 3.3 zeigt den Verlauf der Ozonkonzentration in demineralisiertem Wasser und in Natriumsulfat-Lösung. Die Erniedrigung der Blasengröße bewirkte offensichtlich eine Verbesserung des Ozoneintrags.

Der  $K_{La}$ -Wert wurde mit  $3,9 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  entspr.  $14 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{H}_2\text{O}_{demin}$ ) bzw. mit  $4,4 \cdot 10^{-3} \text{ s}^{-1}$  entspr.  $15,8 \text{ h}^{-1}$  ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ -Lösung) bestimmt. Er lag damit im oberen Bereich der für Rührreaktoren typischen Werte [89]. Die Berechnung erfolgte anhand der Gleichungen 3.4 und 3.5 (s. auch Anhang A, Symbole):

$$K_{La} = \frac{1}{t - t_0} \ln \frac{c_{L^*} - c_{L_0}}{c_{L^*} - c_L} \quad (3.4)$$

mit:

$$c_{L^*} = \frac{c_{L_e^*} - c_{L_a^*}}{\ln \frac{c_{L_e^*} - c_L}{c_{L_a^*} - c_L}} \quad (3.5)$$

Die Gleichgewichtskonzentrationen von Ozon in der Flüssigphase am Reaktorein- und -ausgang  $c_{L_e^*}$  und  $c_{L_a^*}$  wurden über den Henry-Koeffizienten  $H$  bestimmt. Im Falle von demineralisiertem Wasser wurde die Korrelation von Kosak-Channing und Helz [250] (Gleichung 3.6) verwendet:

$$\ln H = 12,19 - \frac{2297}{T} + \left(2,659 - \frac{688}{T}\right) \cdot I \quad \text{in} \quad \left(\frac{\text{atm} \cdot \text{L}}{\text{mol}}\right) \quad (3.6)$$

Für die Natriumsulfatlösung wurde die Korrelation von Sotelo et al. [251] (Gleichung 3.7) angewandt:

$$H = 1,76 \cdot 10^6 e^{(0,033 \cdot I)} \cdot c_{OH^-}^{-0,062} \quad \text{in} \quad (\text{kPa} \cdot \text{mol} \cdot \text{fr}^{-1}) \quad (3.7)$$

Um bei den Oxidationsexperimenten den Ozoneintrag ins Abwasser zu berechnen, wurden die Daten der Ozonmesszellen am Reaktoreingang und am Reaktorausgang an einen Rechner übertragen und über die Versuchszeit nach Gleichung 3.8 integriert (Programm Labtech, Spectra):

$$\text{Ozoneintrag} = Q \int_0^t (c(O_3)_e(t) - c(O_3)_a(t)) \cdot dt \quad \text{in} \quad (\text{mg}) \quad (3.8)$$

Im Falle des Einsatzes von Wasserstoffperoxid wurde dieses als wässrige Lösung mit Hilfe einer Dosierpumpe (KNF Flodos, Stepdos 08 RC) kontinuierlich über die Versuchsdauer zudosiert. Da die Wassersäule im Reaktor einen Gegendruck auf die Pumpe ausübte, wurde die Förderleistung, die laut Hersteller mit 0,08 bis 80 mL/min angegeben war, unter realen Einsatzbedingungen gravimetrisch bestimmt. In Abbildung B.4 im Anhang ist die Förderleistung in Abhängigkeit von der Pumpenleistung aufgetragen.

Die Konzentration der Wasserstoffperoxidlösung wurde auf 3,5 % eingestellt. Das zudosierte Volumen betrug bei den Oxidationsreaktionen unter 100 mL, was einem Anteil am Gesamtvolumen des behandelten Abwassers von unter 5 % entsprach. Der pH-Wert wurde während der Oxidationsexperimente mit Hilfe einer pH-Wert-Regelung konstant gehalten. Die Messwertaufnahme erfolgte dabei mit einer Einstabmesselektrode (PHEPT 112 VE, ProMinent). Ein Regelgerät (Dulcometer D1Ca, ProMinent) steuerte die Zudosierung verdünnter HCl- bzw. NaOH-Lösung über zwei Dosierpumpen (Beta 4a, ProMinent). Bei ungepufferten oder verdünnten Abwässern wurde diese Regelung zeitweise nur manuell zugeschaltet, um Überdosierungen zu vermeiden.

### 3.3 Biologische Untersuchungsmethoden

#### 3.3.1 Toxizitätstest

Die Messung der Toxizität wurde mit Hilfe des Leuchtbakterienhemmtests nach DIN 38412 L34/341 (Organismus *Vibrio fischeri* NRRL B-11177, Dr. Lange) ermittelt. Dafür musste die Probe auf 2 % NaCl aufgesalzen und der pH-Wert auf  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt werden. Die Probe wurde mit 2 %iger NaCl-Lösung (pH-Wert  $7,0 \pm 0,2$ ) in 1:2 Verdünnungsschritten (doppelter Ansatz) verdünnt und auf  $15\text{ °C}$  temperiert. Nach Reaktivierung einer flüssiggetrockneten Leuchtbakteriengefrierkultur (hergestellt nach DIN 38412 L341) wurde diese für 25 min bei  $15\text{ °C}$  in den Teströhrchen in einem Thermoblock (mit Kühlaggregat Haake K20) inkubiert. Danach wurde in 30 s-Abständen die Ausgangsleuchtintensität jedes Teströhrchens in einem Lumat (LB 9501, Berthold) gemessen, die entsprechende Probe zugegeben (Volumenverhältnis 1:1) und 30 min bei  $15\text{ °C}$  inkubiert. Die Leuchtintensität der Bakterien wurde nach der 30-minütigen Kontaktzeit wieder in der gleichen Reihenfolge in 30 s-Abständen gemessen. Die Änderung der Leuchtintensität im Vergleich zu einem Kontrollansatz (2 %ige NaCl-Lösung, Ermittlung des Korrekturfaktors  $f_K$ , s. Gleichung 3.9) ergab die Lumineszenzhemmung in %. Die Auswertung erfolgte dabei mit Hilfe des Gamma-Wertes ( $\Gamma$ ) (Gleichung 3.10).

$$f_K = \frac{I_{K30}}{I_{K0}} \quad (3.9)$$

mit:

- $I_{K30}$  = Leuchtintensität des Kontrollansatzes nach 30-minütiger Kontaktzeit
- $I_{K0}$  = Leuchtintensität des Kontrollansatzes vor Zugabe der 2%igen NaCl-Lösung

Der Test war gültig, wenn der Korrekturfaktor im Bereich zwischen 0,6 und 1,3 lag.

$$\Gamma = \frac{I_{ct} - I_t}{I_t} \quad (3.10)$$

mit:

- $I_{ct}$  = Leuchtintensität vor Zugabe des Testguts, korrigiert mit dem Korrekturfaktor  $f_K$
- $I_t$  = Leuchtintensität nach 30-minütiger Kontaktzeit

In doppellogarithmischer Auftragung ( $\Gamma$  über der Probenkonzentration in %) wurde die meist sigmoid verlaufende Hemmkurve linearisiert und mit Hilfe einer Regression der  $G_L$ -Wert (entspricht der Verdünnungsstufe  $G$ , bei der die Hemmung der Leuchtintensität  $L < 20\%$  beträgt) und der  $EC_{50}$  (*effective concentration*, Konzentration mit 50 % Lumineszenzhemmung) bestimmt. Zur Auswertung wurden nur Werte im Bereich zwischen 5 % und 90 %-Lumineszenzhemmung verwendet.

### 3.3.2 Biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB)

Die Messung der biologischen Abbaubarkeit erfolgte in Anlehnung an DIN EN ISO 29408. Dabei wurde in einem Respirometer (Sapromat D, Voith) der biologische Sauerstoffbedarf über einen Zeitraum von meist 28 d gemessen ( $BSB_{28}$ ). Die Abwasserproben ( $V = 250$  mL) wurden teilweise in verschiedenen Verdünnungen gemessen, um den Effekt einer Verdünnung toxischer Substanzen auf die biologische Abbaubarkeit des Abwassers zu untersuchen. Die Abwasserproben wurden mit folgenden Mineralsalz- und Spurenelementlösungen versetzt:

- Lösung A: 8,5 g/L  $KH_2PO_4$ , 21,75 g/L  $K_2HPO_4$ , 33,4 g/L  $Na_2HPO_4 \cdot 2 H_2O$ , 0,5 g/L  $NH_4Cl$  (Zugabe von 2,5 mL pro 250 mL Probe)
  - Lösung B: 22,5 g/L  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$
  - Lösung C: 36,4 g/L  $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$
  - Lösung D: 0,25 g/L  $FeCl_3 \cdot 6 H_2O$ , versetzt mit einem Tropfen  $HCl_{konz}$
- (Zugabe der Lösungen B, C und D jeweils 0,25 mL pro 250 mL Probe)

Der pH-Wert wurde für die Experimente auf  $7,0 \pm 0,2$  eingestellt. Für die biologische Behandlung größerer Volumina wurde ein Titrationssystem (TitroWiCo, Wittenfeld Cornelius) verwendet, wobei der pH-Wert auf  $7,0 \pm 0,1$  geregelt wurde, es erfolgte keine Aufzeichnung der Sauerstoffverbrauchskurve. Als Inokulum für alle Abbauversuche in den Batchsystemen wurde gewaschener und in 0,85 %iger NaCl-Lösung resuspendierter Belebtschlamm aus der kommunalen Kläranlage Karlsruhe-Neureut verwendet.

### 3.3.3 Kontinuierlich betriebene Festbettbiofilmreaktoren (BFR)

Für kontinuierliche Messungen der biologischen Abbaubarkeit wurden am Institut entwickelte, miniaturisierte Festbettbiofilmreaktoren (kurz: Biofilmreaktoren, BFR) verwendet [8]. In Abbildung 3.4 ist der Aufbau der Biofilmreaktoren dargestellt.

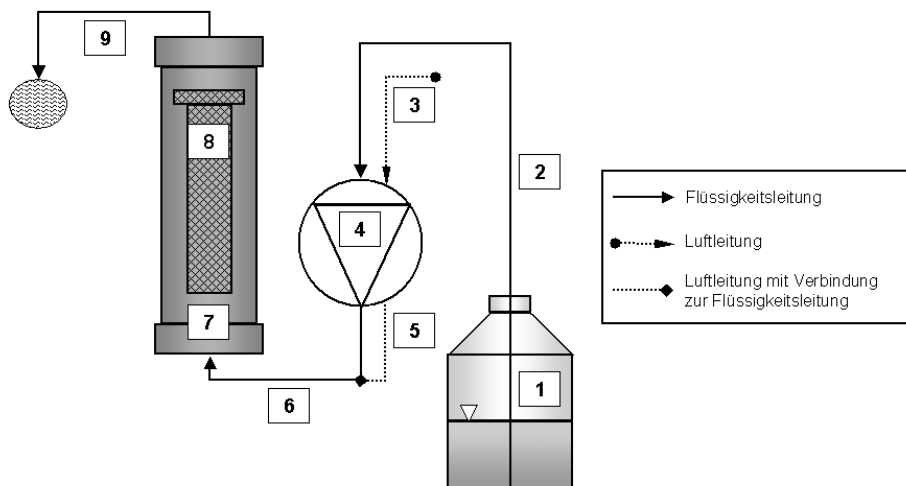


Abbildung 3.4: Aufbau der Biofilmreaktoren. 1 Vorlagegefäß, 2 Zuleitung, 3 Luftzufuhr, 4 Pumpe, 5 Luftzufuhr mit Kopplung an Zuleitung, 6 Zuleitung Medium/Luft zum Biofilmreaktor, 7 Biofilmreaktor (Metallzylinder), 8 herausnehmbarer Siebeinsatz, gefüllt mit Bimsstein, 9 Ablauf.

Als Aufwuchsmaterial für den Biofilm wurde gekörnter Bimsstein (Korngrößenverteilung 0,8 bis 3 mm) verwendet, der in die Siebeinsätze der Reaktoren eingefüllt wurde (ca. 4-5 g, aktives Flüssigkeitsvolumen ca. 2,7 mL). Die Biofilmreaktoren wurden jeweils über Pumpen (Ismatec IPC 16) mit Nährlösung bzw. Abwasserproben aus einem gläsernen Vorlagegefäß versorgt. Zur Sauerstoffversorgung wurde mit der gleichen Pumpleistung Luft zugepumpt (Flussrate 14 mL/h). Die Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit wurde mit Hilfe der DOC-Abnahme gemessen, indem die Konzentration im Vorlagebehälter und am Auslauf des jeweiligen Reaktors gemessen wurde. Der biologisch eliminierbare DOC (BDOC) wurde nach Gleichung 3.11 berechnet. Hierbei wurde zunächst nicht zwischen an der Biomasse adsorbierten und biologisch abgebauten Verbindungen unterschieden.

$$BDOC = \left( \frac{DOC_{zu} - DOC_{ab}}{DOC_{zu}} \right) \cdot 100 \% \quad (3.11)$$

Bei der Untersuchung des Ammonium-Abbaus bei Zugabe eines Industrieabwassers (s. Abschnitt 3.5.4.2) wurden neben den miniaturisierten BFR zusätzlich größere Säulenreaktoren eingesetzt. Diese besaßen ein Volumen von 140 mL (BFR 7) bzw. 184 mL (BFR 8) und waren ebenfalls mit Bimsstein (76 g bzw. 58 g, aktives Flüssigkeitsvolumen ca. 86 mL bzw. 113 mL) gefüllt. Die Flussrate betrug jeweils

Tabelle 3.1: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers (SAW) in Anlehnung an DIN 38412-L24, hergestellt mit Karlsruher Leitungswasser (DOC-Gehalt 0,92 mg/L, Jahresmittelwert 1999).

Chemikalie	Konzentration in mg/L
Pepton aus Casein	16,0
Fleischextrakt	11,0
Harnstoff	3,0
NaCl	3,5
CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	2,0
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	1,0
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0,67

44 mL/h (Pumpe Ismatec Reglo Dig MS-4/8 V1.13).

### 3.3.3.1 Medienzusammensetzung für die Biofilmreaktoren

**Synthetisches Abwasser** Das synthetische Abwasser (SAW) wurde in Anlehnung an DIN 38412-L24 angesetzt (s. Tabelle 3.1).

**Nitrifikationsmedium** Das Nitrifikationsnährmedium setzte sich aus einem Basismedium und einer Spurenelementlösung zusammen (s. Tabelle 3.2). Letztere wurde getrennt als 1000faches Konzentrat hergestellt und dem Basismedium zugegeben. Der pH-Wert wurde auf  $7,2 \pm 0,2$  eingestellt .

**Zusätzliche C-Quellen** Als zusätzliche C-Quellen wurden dem SAW bzw. dem Nitrifikationsmedium ein mit Ozon vorbehandeltes Industrieabwasser (AbWa5 nach Ozonung bei einem pH-Wert von 9, s. Abschnitt 3.5.2) sowie das Originalabwasser (AbWa5, s. Abschnitt 3.5.1) zugesetzt. Weiterhin wurden bei der Untersuchung der Nitrifikation Acetat und Pyruvat als zusätzliche C-Quellen eingesetzt. Von diesen Substanzen wurden Konzentrate hergestellt (Acetat: 3,6 g/L, Pyruvat: 4,12 g/L), und entsprechend der gewünschten Endkonzentration dem Nitrifikationsmedium zugesetzt.

Tabelle 3.2: Zusammensetzung des Nitrifikationsmediums, Basismedium: oberer Teil; Spurenelementlösung: unterer Teil (Angabe der Endkonzentration); Endvolumen je zur Hälfte mit Karlsruher Leitungswasser und demineralisiertem Wasser.

Chemikalie	Konzentration in mg/L
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	142,0
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1000,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	5289,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,056
$\text{H}_3\text{BO}_3$	0,049
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,043
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0,037
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,973
$\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,019

## 3.4 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

### 3.4.1 Lösungen und Materialien für FISH

#### 3.4.1.1 Hybridisierungspuffer

Das im Hybridisierungspuffer enthaltene Formamid diene zur Stabilisierung der Bindung der Sonde an die ribosomale RNA. Der Formamidanteil im Hybridisierungspuffer ist maßgeblich für die Stringenz der Bindung. Ein hoher Formamidanteil und damit eine hohe Stringenz bedingt eine der jeweiligen Sequenz der rRNA angepasste hohe spezifische Bindung. Zur Bestimmung der optimalen Stringenz wurden verschiedene Hybridisierungspuffer mit 30 %, 35 %, 40 %, 50 % und 55 % Formamid hergestellt (Tabelle 3.3). Von 100 mL Hybridisierungspuffer wurden jeweils 50 mL auf 2 mL Kunststoffgefäße (Safe Lock Tubes 2,0 mL, Eppendorf, Hamburg) verteilt, die restlichen 50 mL in ein steriles 50 ml Kunststoffschraubgefäß (Greiner) überführt und bis zur Verwendung bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.

#### 3.4.1.2 Waschpuffer

Entsprechend der Formamid-Konzentration im Hybridisierungspuffer musste die Stringenz im Waschpuffer durch Zugabe von 5 M NaCl eingestellt werden (s. Tabelle 3.4). 250 mL Waschpuffer wurde auf 50 mL Kunststoffgefäße verteilt bei  $-20\text{ }^\circ\text{C}$  gelagert.



Tabelle 3.3: Zusammensetzung des Hybridisierungspuffers. Formamidvolumen variabel, Endvolumen 100 mL (entionisiertes Wasser).

Lösung	Volumen in mL	Endkonzentration
5 M NaCl	18	0,9 mM
1 M Tris/HCl (pH 7,2)	2	0,02 mM
Formamid	30, 35, 40, 50, 55	30%, 35%, 40%, 50%, 55%
SDS (10%)	0,1	0,01%

Tabelle 3.4: Zusammensetzung des Waschpuffers. Volumen 5 M NaCl variabel (nach [168]), Endvolumen 250 mL (entionisiertes Wasser).

Lösung	Volumen in mL	Endkonzentration
1 M Tris/HCl (pH 7,2)	5,0	0,02 mM
0,5 M EDTA	2,5	0,01%
SDS (10%)	0,1	0,01%
5 M NaCl	5,1; 3,5; 2,3; 0,9; 0,5	0,1 M; 0,07 M; 0,046 M; 0,018 M; 0,01 M

### 3.4.1.3 Phosphatpuffer

Es wurden zwei verschiedene Phosphatpuffer (Phosphat Buffered Saline (PBS)) - 1\*PBS und 3\*PBS - hergestellt, die für die Fixierung der Biofilmproben benötigt wurden (s. Tabelle 3.5).

### 3.4.1.4 Paraformaldehyd-Fixierlösung

Zur Herstellung der Fixierlösung für die Biofilmproben wurden 165 mL entionisiertes Wasser im Wasserbad auf 60 °C erwärmt und mit 10 g Paraformaldehyd unter Rühren versetzt. Anschließend wurden der Lösung nach Entnahme aus dem Wasserbad 3-4 Tropfen  $\text{NaOH}_{konz}$  bis zum Aufklaren zugegeben. Es erfolgte die Zugabe von 85 mL 3\*PBS. Nachdem die Lösung abgekühlt war, wurde der pH-Wert mit verdünnter HCl-Lösung auf  $7,2 \pm 0,2$  eingestellt. In der Sterilbank wurde die Lösung danach über eine sterile Filtrationsanlage ( $0,45 \mu\text{m}$ ) filtriert und in sterile 50 mL Kunststoffschraubdeckelgefäße (Greiner) überführt und bei -20 °C aufbewahrt.

Tabelle 3.5: Zusammensetzung der Phosphatpuffer (PBS), pH-Wert  $7,0 \pm 0,1$ , in entionisiertem Wasser.

Chemikalie	1*PBS	3*PBS
	Konzentration in g/L	
KCl	0,2	0,6
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	1,81	5,42
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,23	0,69
NaCl	8,0	24,0

#### 3.4.1.5 DAPI-Lösung

Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl wurde eine Zellfärbung mit 4'6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI) durchgeführt. DAPI bindet unspezifisch an Nucleinsäuren und fluoresziert bei entsprechender Anregung mit Licht hellblau. Eine Kombination mit Fluorochromen anderer Emissionswellenlänge ermöglicht eine simultane Detektion, daher war diese Methode einerseits mit FISH koppelbar (s. Abschnitt 3.4.5), andererseits mit der CTC-Färbung (s. Abschnitt 3.4.3). Es wurde eine 10fach konzentrierte DAPI-Stammlösung ( $10 \mu\text{g DAPI/mL}$  in 1\*PBS) angesetzt und bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  aufbewahrt. Vor Gebrauch wurde die Stammlösung auf eine Endkonzentration von  $1 \mu\text{g/mL}$  mit 1\*PBS verdünnt.

#### 3.4.1.6 CTC-Lösung

Für die Bestimmung der Stoffwechselaktivität wurde vor Gebrauch eine frische CTC-Lösung (CTC, 5-Cyano-2,3-di-4-tolyl-tetrazoliumchlorid, Polyscience,  $0,5 \text{ mM}$  in entionisiertem Wasser) angesetzt.

#### 3.4.1.7 Gelatinebeschichtete Objektträger

Die Objektträger (teflonbeschichtet, 8 Felder, Roth L202, Roth, Karlsruhe) wurden mit Gelatine beschichtet, um die Anhaftung der Biofilmpollen auf dem Objektträger zu verbessern. Zur Herstellung der Gelatine-Lösung wurden  $0,5 \text{ L}$  entionisiertes Wasser im Wasserbad auf  $60 \text{ }^\circ\text{C}$  erwärmt und unter Rühren mit  $0,5 \text{ g}$  Gelatine und  $0,05 \text{ g}$  Kaliumchromsulfat versetzt. Um eine saubere und fettfreie Oberfläche der Objektträger zu gewährleisten, wurde eine vorherige Reinigung der Objektträger mit Aceton durchgeführt. Diese wurden daraufhin in die abgekühlte Gelatine-Lösung getaucht und in der Sterilbank getrocknet.

Tabelle 3.6: Fluoreszenzfarbstoffe zur Markierung der Gensonden. Die Sonden wurden bereits mit dem Farbstoff gekoppelt geliefert.

Fluoreszenzfarbstoff	Absorptionsmaximum in nm	Emissionsmaximum in nm
Fluorescein (FLUOS)	494	518
Cy3	554	570
Cy5	650	667

Tabelle 3.7: Oligonukleotidsonden für System 1.

Sonde (Quelle)	Sequenz	Spezifität	Zielregion (16S-rRNA-Position, <i>E.coli</i> )
EUB338 ([158])	GCT-GCC-TCC-CGT-AGG-AGT	Bacteria	16S-rRNA (338-355)
ALF1b ([198])	CGT-TCG-(C/T)TC-TGA-GCC-AG	$\alpha$ -Proteobacteria	16S-rRNA (19-35)
BET42a ([198])	GCC-TTC-CCA-CTT-CGT-TT	$\beta$ -Proteobacteria	23S-rRNA (1027-1043)
GAM42a ([198])	GCC-TTC-CCA-CAT-CGT-TT	$\gamma$ -Proteobacteria	16S-rRNA (1027-1043)

### 3.4.2 Sonden und Fluoreszenzfarbstoffe

Es wurden zwei verschiedene Abwassersysteme untersucht, die unter Abschnitt 3.5.4 näher beschrieben werden. Je nach System wurden unterschiedliche Sonden zum Einsatz gebracht. Alle Sonden wurden von der Firma MWG Biotech, Ebersberg, synthetisiert und waren bereits mit dem entsprechenden Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt. Die Konzentration der Sonden wurde im jeweiligen Hybridisierungspuffer auf 50 ng/ $\mu$ L verdünnt. Die Fluoreszenzfarbstoffe für beide Systeme sind in Tabelle 3.6 aufgeführt.

Für System 1 (Populationsanalyse bei Dosierung des ozonten Abwassers 5 und SAW, s. Abschnitt 3.5.4.1) wurden die in Tabelle 3.7 aufgeführten rRNA-Oligonukleotidsonden eingesetzt, die gegen verschiedene Untergruppen der Proteobakterien gerichtet waren. Voruntersuchungen mit verschiedenen Hybridisierungspuffern ergaben, dass für alle Sonden eine Konzentration von 35 % Formamid gute Resultate lieferte.

Tabelle 3.8: Oligonukleotidsonden für System 2.

Sonde (Quelle)	Sequenz	Spezifität	Zielregion (16S-rRNA-Position, <i>E. coli</i> )
BET42a ([198])	GCC-TTC-CCA-CTT-CGT-TT	$\beta$ -Proteobacteria	23S-rRNA (1027-1043)
Nso190 ([229])	CGA-TCC-CCT-GCT-TTT-CTC-C	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -Oxidierer	16S-rRNA (190-208)
NEU ([244])	CCC-CTC-TGC-TGC-ACT-CTA	halophile/-tolerante Nitrosomonas	16S-rRNA (653-670)
CNEU ([244])	TTC-CAT-CCC-CCT-CTG-CCG	Kompetitorsonde für NEU	16S-rRNA (653-670)
Ntspa712 ([190])	CGC-CTT-CGC-CAC-CGG-CCT-TCC	Nitrospira spec.	16S-rRNA (712-732)
CNtspa712 ([190])	CGC-CTT-CGC-CAC-CGG-TGT-TCC	Kompetitorsonde für Ntspa712	16S-rRNA (712-732)

Für System 2 (Populationsanalyse zur Nitrifikation bei Dosierung von Abwasser 5 vor und nach Ozonung, s. Abschnitt 3.5.4.2) wurden Sonden eingesetzt, die gegen verschiedene Gruppen der Nitrifikanten gerichtet waren (Tabelle 3.8). Hier zeigte sich, dass bei einer Konzentration von 40 % Formamid im Hybridisierungspuffer mit allen Sonden gute Ergebnisse erzielt werden konnten.

Dabei war zu beachten, dass bei Verwendung der  $\beta$ - bzw. der  $\gamma$ -Sonde die jeweilige andere unmarkierte Kompetitorsonde (C) eingesetzt werden musste (BET42a + CGAM42a, GAM42a + CBET42a), damit Fehlbindungen der markierten Sonde verhindert wurden. Ebenso mussten für die Sonden NEU und Ntspa712 die dazugehörigen Kompetitorsonden eingesetzt werden (NEU + CNEU, Ntspa712 + CNtspa712).

### 3.4.3 Durchführung der CTC/DAPI-Färbung

Die CTC-Färbung konnte nicht mit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung gekoppelt werden. Daher erfolgte die Messung der Stoffwechselaktivität getrennt auf Membranfiltern. Zu 1 mL Biofilmprobe wurden 100  $\mu$ L frische CTC-Lösung gegeben und gut vermischt. Bei einer hohen Bakterienkonzentration in der Probe wurde diese entsprechend verdünnt. Anschließend wurde bei Raumtemperatur (RT) für 3 h im Dunkeln inkubiert, die Probe über einen Membranfilter (0,2  $\mu$ m GTBP, schwarz, Isopore) fil-

triert und mit entionisiertem Wasser gewaschen. Für die gekoppelte DAPI-Färbung wurde der Filter mit 1 mL DAPI-Lösung ( $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  in 1\*PBS) überschichtet und 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert und anschließend mit entionisiertem Wasser gewaschen. Der Filter wurde auf einen Objektträger (Super Frost Plus, Menzel Gläser) gelegt und an der Luft getrocknet. Zum Mikroskopieren wurde der Filter in Citi-fluor AF1 gebettet. Die Aufnahme und Auswertung der Bilder erfolgte nach dem gleichen Prinzip wie bei der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (s. Abschnitt 3.4.6). Die gleichzeitige Auswertung der DAPI- und CTC-Aufnahmen lässt eine quantitative Aussage über den Anteil stoffwechselaktiver Zellen in der Probe zu [252].

### 3.4.4 Biofilmprobenentnahme und Fixierung

**Probenentnahme** Zur Biofilmprobenentnahme wurde der Siebeinsatz der Biofilmreaktoren entnommen, die Bimssteine vollständig aus dem Siebeinsatz entfernt und durchmischt. Ca. 0,5 - 1 g der Bimssteine, entsprechend etwa 12 - 25 % der Füllmenge des Siebeinsatzes, wurden in sterile 15 mL Kunststoffschraubgefäße (Roth, Karlsruhe) in 4 mL 1\*PBS aufgenommen. Anschließend wurde eine der Probenmenge äquivalente Menge frischer Bimssteine mit den übrigen Bimssteinen vermischt und wieder in den Siebeinsatz eingefüllt. Zunächst wurde versucht, den Biofilm durch intensives Schütteln vom Bimsstein zu lösen. Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde stattdessen eine Ultraschallbehandlung der Proben durchgeführt. Dazu wurden die Proben für 7 min in einem Ultraschallbad (Bandelin Sonorex RK 100H) behandelt.

**Fixierung** 1 mL Biofilmprobe (nach Ultraschallbehandlung, Entnahme des Überstandes) wurden in 3 mL 4 %ige PFA-PBS-Lösung überführt, intensiv geschüttelt und 2 h bei 4 °C inkubiert. Die Probe wurde dann auf 2 mL Kunststoffgefäße verteilt und bei 6000 UpM für 5 min zentrifugiert (Heraeus Biofuge pico, Heraeus Sepatech, Fellbach). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 1\*PBS resuspendiert und erneut zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmals verworfen und das Pellet mit 200  $\mu\text{L}$  1\*PBS in Suspension gebracht. Es folgte eine Zugabe des gleichen Volumens (200  $\mu\text{L}$ ) 100 % Ethanol und nachfolgendes intensives Schütteln. In diesem Zustand wurden die fixierten Zellen bei -20 °C bis zur Untersuchung gelagert.

**Immobilisierung der Probe** Nach intensivem Schütteln wurden 3  $\mu\text{L}$  der fixierten Biofilmprobe auf jedes Feld des Objektträgers pipettiert. Die auf dem Objektträger fixierte Probe wurde im Inkubator (ICE500, Memmert, Schwabach) bei 46 °C für ca. 10 min getrocknet. Der Objektträger wurde zur Entwässerung des Präparates in einer aufsteigenden Ethanolreihe (50 %, 80 % und 100 % Ethanol) für jeweils 3 min behandelt. Die Trocknung erfolgte bei Raumtemperatur.

### 3.4.5 Durchführung der *in-situ* Hybridisierung

**Hybridisierung** Zur Vorbereitung der Hybridisierungskammer wurde in ein 50 mL Kunststoffschraubdeckelgefäß doppellagiger Zellstoff eingelegt. 2 mL Hybridisierungspuffer pro Objektträger wurden der Raumtemperatur angeglichen. Pro Feld des Objektträgers wurden 8  $\mu\text{L}$  Hybridisierungspuffer und 2  $\mu\text{L}$  der Sondenlösung aufgetragen und vorsichtig mit der Pipettenspitze vermischt. Anschließend wurde der restliche Hybridisierungspuffer auf den Zellstoff im Kunststoffschraubdeckelgefäß gegeben, der Objektträger in das Gefäß eingeführt und das Gefäß verschlossen, um eine feuchte Hybridisierungskammer (Dampfraum mit Hybridisierungspuffer gesättigt) zu schaffen. Im Inkubator erfolgte die Hybridisierung der Probe mit den Sonden bei 46 °C über 3 h.

**Waschschritt** Während der Hybridisierung wurden 50 mL Waschpuffer im Wasserbad auf 48 °C erwärmt. Nach Ablauf der Hybridisierungsdauer wurde der Objektträger aus der Hybridisierungskammer entnommen und vorsichtig mit etwas Waschpuffer abgespült. Anschließend wurde der Objektträger im Waschpuffer 15 min bei 48 °C im Wasserbad gewaschen. Nach sorgfältigem Abspülen des Waschpuffers mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  wurde der Objektträger in der Sterilbank getrocknet.

**DAPI-Färbung** Pro Objektträger-Feld wurden 20  $\mu\text{L}$  der DAPI-Arbeitslösung aufgetragen und das Präparat bei 4 °C im Kühlschrank 15 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die DAPI-Lösung mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  vorsichtig entfernt und der Objektträger wiederum in der Sterilbank getrocknet.

### 3.4.6 Mikroskopie und Bildverarbeitung

Zur mikroskopischen Untersuchung der fluoreszenzmarkierten Präparate sowie zur Auswertung der CTC- und DAPI-Färbung stand ein Epifluoreszenzmikroskop (Leitz Laborlux S, Leitz, Wetzlar), welches nach dem Auflicht-Prinzip mit einer Quecksilber-Höchstdrucklampe arbeitet, zur Verfügung. Die Aufnahmen erfolgten mit einer digitalen Schwarz-Weiß-Kamera (Kappa CF8/1DX). Dabei wurde ein Objektiv mit der Maßstabszahl 63 (Immersionsobjektiv) verwendet (s. auch Abbildung F.1 im Anhang). Das Mikroskop war mit Filterwürfeln mit Bandpassfilter ausgestattet (s. Tabelle 3.9).

Zur Vermeidung von Ausbleicheffekten wurde das Präparat in je einem Tropfen Citifluor AF1 (Citifluor Ltd., London, UK) pro Feld unter einem Deckglas (Roth, Karlsruhe) eingebettet. Zwischen Objektiv und Deckglas wurde ein Tropfen Immersionsöl (Leica Immersionsöl, ohne Eigenfluoreszenz) aufgetragen. Die einzelnen Felder wurden je nach verwendeter Sonde mit dem entsprechenden Filterblock

Tabelle 3.9: Filter (Leica) für die Fluoreszenzmikroskopie. BP = Bandpassfilter.

Filterbezeichnung	Anregungsfilter in nm	Farbteiler in nm	Emissionsfilter (Sperrfilter) in nm	Fluoreszenzfarbstoff
A4	BP 360/40	400	BP 470/40	DAPI
N3	BP 546/12	565	BP 600/40	Cy3, CTC
L5	BP 480/40	505	BP 527/30	FLUOS
Y5	BP 620/60	660	BP 700/75	Cy5

mikroskopiert. Dabei wurde zunächst im Phasenkontrastbild ein geeigneter Bildausschnitt gesucht und dann mit der Aufnahmesequenz begonnen. Dazu wurde die Signalintensität über die Steuerungssoftware der Kamera optimiert. Für die Aufnahme der DAPI-Bilder musste der Lichtdurchlass am Mikroskop sowie die Signalverstärkung mittels der Software im Vergleich zu den anderen Fluoreszenzfarbstoffen reduziert werden, um detaillierte Strukturen erkennen zu können. Die erhaltenen Signale wurden mit einer Bildverarbeitungssoftware (Leica Qfluoro V1.1, Leica Fluorescence Imaging Solutions, Cambridge, UK) in den den Sonden entsprechenden Farben dargestellt und mit den digitalen Bildverarbeitungswerkzeugen des Programms aufbereitet.

Es wurden pro Feld bis zu 10 verschiedene Bildausschnitte aufgenommen, welche nach optischer Kontrolle des gesamten Feldes als repräsentativ für die Probe angesehen wurden. Für eine Bestimmung der Zellzahl war die Mikroskopvergrößerung sowie die Auflösung der Optik nicht ausreichend, so dass nur über eine Bestimmung der verschiedenen gefärbten Flächen eine Quantifizierung möglich wäre. Auf eine rechnerunterstützte quantitative Auswertung der Bildausschnitte wurde verzichtet, da bei dickeren Präparaten keine einheitliche optische Ebene gefunden werden konnte. So konnten Fluoreszenzsignale des DNA-Farbstoffes DAPI, die aus verschiedenen Tiefen des Präparates stammten, nicht voneinander getrennt werden, während die schwächeren Signale der fluoreszenzmarkierten Gensonden nur in der eingestellten optischen Ebene zu erkennen waren. Somit war die zweidimensionale Betrachtung zur rechnergestützten Quantifizierung nicht sinnvoll. Die Auswertung erfolgte semi-quantitativ nach subjektiver optischer Auswertung der aufgenommenen Bildausschnitte.

Tabelle 3.10: Daten für das Abwasser 1, Synthese von Oxazolamid, Arbeitslösung (1:10).

CSB in mg/L	DOC in mg/L	SAK <sub>436</sub> in m <sup>-1</sup>	SAK <sub>254</sub> in m <sup>-1</sup>	G <sub>L</sub> -Wert	pH-Wert	BSB/CSB
7225	3000	26,7	10360	64	4,3	0,22

## 3.5 Versuchsdurchführung

### 3.5.1 Abwässer

Die verwendeten Abwässer stammten aus der Vitaminherstellung (Hoffmann-La Roche, Grenzach) sowie aus der Produktion optischer Aufheller (Ciba Spezialitätenchemie, Grenzach). Alle Abwässer wurden firmenintern einer gesonderten Behandlung zugeführt. Die Abwässer aus der Produktion optischer Aufheller wurden nach Aufkonzentrierung einer Hochdruck-Nassoxidation unterzogen. Die Abwässer aus der Vitaminherstellung wurden in einer Niederdruck-Nassoxidationsanlage behandelt (s. Abschnitt 2.2).

**Abwasser 1** Abwasser 1 (AbWa1) stammte aus der Produktion von Vitamin B6. Es fiel beim Teilschritt der Synthese des Oxazolamids an und enthielt nach Entfernung von Ethanol in einer Stripkolonne ein Gemisch aus Heterozyklen, die als Nebenprodukte der Oxazolamidherstellung angefallen waren (Abbildung C.1 im Anhang). Für die Versuche wurde eine 1:10-Verdünnung des Originalabwassers verwendet. Eine Charakterisierung dieser Arbeitslösung anhand von Summenparametern ist in Tabelle 3.10 aufgeführt.

**Abwasser 2** Abwasser 2 (AbWa2) fiel bei der Synthese der 4,4-Dinitrostilben-2,2-disulfonsäure (DNS) an, der Ausgangssubstanz für die Produktion optischer Aufheller (s. Abbildung C.2 im Anhang). Das Originalabwasser wurde als Arbeitslösung 1:10 verdünnt (s. Tabelle 3.11).

**Abwasser 3** Abwasser 3 (AbWa3) stammte aus der Herstellung des optischen Aufhellers 4,4-Bis[(4-anilino-6-bis (2-hydroxyethyl) amino-1,3,5-triazin-2-yl)amino] stilben-2,2-disulfonat (Tinopal UP, s. Abbildungen C.3 und C.5 im Anhang). Mögliche Inhaltsstoffe waren neben dem Tinopal UP sowohl die Edukte der Synthese wie auch Reaktionsnebenprodukte. In Tabelle 3.12 sind die Daten der Arbeitslösung (1:5-Verdünnung) des Abwassers dargestellt.



Tabelle 3.11: Daten für das Abwasser 2, Synthese von DNS, Arbeitslösung (1:10).

CSB in mg/L	DOC in mg/L	SAK <sub>436</sub> in m <sup>-1</sup>	SAK <sub>254</sub> in m <sup>-1</sup>	G <sub>L</sub> -Wert	pH-Wert	BSB/CSB
2840	990	558	5680	14	8,5	0,05

Tabelle 3.12: Daten für das Abwasser 3, Synthese von Tinopal UP, Arbeitslösung (1:5).

CSB in mg/L	DOC in mg/L	SAK <sub>436</sub> in m <sup>-1</sup>	SAK <sub>254</sub> in m <sup>-1</sup>	G <sub>L</sub> -Wert	pH-Wert	BSB/CSB
1980	490	50	2400	1	5,1	0,52

**Abwasser 4** Abwasser 4 (AbWa4) stammte aus dem entsprechenden Syntheseschritt des optischen Aufhellers 4,4-Bis[(4-anilino-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)amino]stilben-2,2-disulfonat (Tinopal DMS, s. Abbildungen C.4 und C.5 im Anhang). Von AbWa4 wurden zwei Arbeitslösungen hergestellt, da für Ozonungsversuche die Konzentration herabgesetzt werden musste, um eine zu starke Schaumbildung zu vermeiden. Die Daten für beide Arbeitslösungen sind in Tabelle 3.13 aufgeführt.

Bei AbWa4 stellten sich die Messungen des DOC und des CSB als schwierig heraus, da das Abwasser sehr viele Trübstoffe enthielt. Insbesondere bei pH-Wert Änderungen kam es zur Bildung von Niederschlägen, die eine genaue Analyse erschwerten.

Tabelle 3.13: Daten für das Abwasser 4, Synthese von Tinopal DMS, Arbeitslösungen (1:2, obere Datenreihe; 1:25, untere Datenreihe).

CSB in mg/L	DOC in mg/L	SAK <sub>436</sub> in m <sup>-1</sup>	SAK <sub>254</sub> in m <sup>-1</sup>	G <sub>L</sub> -Wert	pH-Wert	BSB/CSB
2946	568	15	8180	3	9,9	0,12
250	33	1,7	350	n.t.	8,5	0,11

**Abwasser 5** Abwasser 5 (AbWa5) stammte aus dem ersten Produktionsschritt des Vitamin B6, der Synthese des Propyldioxepens aus Butendiol und Butyraldehyd (s. Abbildung C.6 im Anhang). Diese Stoffe lagen auch als organische Verunreinigung im Abwasser vor. Ihre durchschnittlichen Anteile (Angaben Hoffmann-La Roche) sowie die Charakterisierung des Abwassers (Arbeitslösung 1:40) mit Hilfe von Summenparametern sind in Tabelle 3.14 gezeigt.

Tabelle 3.14: Daten für das Abwasser 5, Synthese von Propyldioxepen, Arbeitslösung (1:40, obere Datenreihe), sowie Angaben Hoffmann-La Roche (untere Datenreihe).

CSB in mg/L	DOC in mg/L	SAK <sub>436</sub> in m <sup>-1</sup>	SAK <sub>254</sub> in m <sup>-1</sup>	G <sub>L</sub> -Wert	pH-Wert	BSB/CSB
7760	1900	0	9,7	24	3,0	0,18
Butendiol ca. 7 %		Butyraldehyd ca. 5 %		Propyldioxepen ca. 1 %		

### 3.5.2 Oxidationsexperimente

In Tabelle 3.15 sind die wichtigsten Daten zu den Oxidationsexperimenten aufgeführt, die mit den einzelnen Abwässern durchgeführt wurden. Angegeben sind die Verhältnisse, in denen die Oxidationsmittel in Bezug auf den DOC-Gehalt der Arbeitslösungen eingesetzt wurden.

Für Abwasser 5 wurden weiterhin Oxidationsversuche mit den drei Substanzen Butendiol, Butyraldehyd sowie Propyldioxepen durchgeführt. Dafür wurden getrennte Lösungen mit je  $\rho = 1$  g/L der Einzelsubstanzen hergestellt und mit den in Tabelle 3.16 angegebenen Oxidationsmittelmengen behandelt.

### 3.5.3 Biologische Untersuchungen

Die nach Oxidation erhaltenen Abwasserproben wurden sowohl mit Hilfe von Summenparametern (DOC, CSB, SAK, s. Abschnitte 3.1.1, 3.1.3, 3.1.4) als auch mit verschiedenen biologischen Methoden charakterisiert. Wichtigster Bestandteil dabei waren die biologischen Abbauprobeversuche (BSB-Messungen, s. Abschnitt 3.3.2, kontinuierliche Abbauprobeversuche in Festbettbiofilmreaktoren, s. Abschnitt 3.3.3). Hiermit sollte eine Beschreibung des kombiniert chemisch-biologischen Behandlungsverfahrens erfolgen. Der BSB wurde ins Verhältnis zum CSB gesetzt (BSB/CSB), um die biologische Abbaubarkeit der oxidierten Abwasserproben zu beurteilen. Die zusätzliche Messung der Toxizität (Leuchtbakterienhemmtest, s. Abschnitt 3.3.1), die Analytik verschiedener Einzelsubstanzen (s. Abschnitte 3.1.7, 3.1.8, 3.1.9) und eine de-

Tabelle 3.15: Oxidationsexperimente mit den verschiedenen Abwässern, Angabe der molaren Verhältnisse DOC:Oxidationsmittel und der pH-Werte. Peroxon: Einsatz unterschiedlicher Verhältnisse, Photo-Fenton: teilweise mit zusätzlicher Ozondosierung.

Prozess	DOC	Ozon	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	pH-Wert
AbWa1				
Ozonung	1	0,125	-	4,3
Peroxon	1	0,125	0,065	4,3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	1	-	0,125	4,3
AbWa2				
Ozonung	1	0,5	-	3,0 bzw. 9,0
Peroxon	1	0,5 bzw. 1	0,167 bzw. 0,33	8,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	1	-	1	7,0
Photo-Fenton	1	(0,3)	1	3,0
AbWa3				
Ozonung	1	0,5	-	9,0
Peroxon	1	0,5 bzw. 1	0,167 bzw. 0,33	8,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	1	-	1	7,0
Photo-Fenton	1	(0,3)	1	3,0
AbWa4				
Ozonung	1	1	-	9,0
Peroxon	1	1	0,33	8,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	1	-	1	7,0
Photo-Fenton	1	1	1	3,0
AbWa5				
Ozonung	1	0,25	-	8,5-9,5
Peroxon	1	0,25	0,083	7,0-8,5
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV	1	-	0,25	6,0-8,0

Tabelle 3.16: Oxidationsexperimente mit den drei Einzelsubstanzen von AbWa5, BD = Butendiol, BA = Butyraldehyd, PD = Propyldioxepen, Index 1: Ozonung, Index 2: Peroxon-Verfahren, Angabe der molaren Verhältnisse DOC:Oxidationsmittel und der pH-Werte.

Prozess	DOC	Ozon	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	pH-Wert
BD1	1	0,25	-	3,0
BD2	1	0,25	0,083	8,5
BA1	1	0,25	-	3,0
BA2	1	0,25	0,083	8,5
PD1	1	0,25	-	3,0
PD2	1	0,25	0,083	8,5

taillierte Untersuchung des DOC mit Hilfe der LC-DOC (s. Abschnitt 3.1.2) sollten zur weiteren Klärung beitragen. Weiterhin wurden mit der Abwasserprobe AbWa5 (nach Ozonung, pH-Wert 9,0, s. Abschnitt 3.15) zwei Abwassersysteme näher untersucht. Dabei sollten die Effekte eines Industrieabwassers auf die Biozönose in kontinuierlich betriebenen Festbettbiofilmreaktoren untersucht werden (s. Abschnitt 3.5.4).

### 3.5.4 Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung

Zur Untersuchung der bakteriellen Zusammensetzung in Abwasserbiofilmen wurden die miniaturisierten Festbettbiofilmreaktoren (BFR, s. Abschnitt 3.3.3) eingesetzt. Die BFR wurden dabei mit unterschiedlichen Abwässern gefüttert, das Abbauverhalten (BDOC, Nitrifikation) wurde mit den erhaltenen Ergebnissen der Populationsanalyse mit FISH verglichen.

#### 3.5.4.1 Populationsanalyse System 1

Im System 1 wurde ausgehend von der Fütterung der Biofilmreaktoren mit synthetischem Abwasser (SAW, Vorlaufphase: 3 Monate) die Änderung in der Populationszusammensetzung der Bakterien bei Zugabe eines mit Ozon vorbehandelten Industrieabwassers untersucht. Hierfür wurde AbWa5 nach Ozonung bei einem pH-Wert von 9,0 verwendet (s. Tabelle 3.15). Dieses wurde zum einen dem SAW zugesetzt (BFR 3 und 4, s. Tabelle 3.17), zum anderen ersetzte es das SAW (BFR 5

Tabelle 3.17: Medienzusammensetzung für das Abwassersystem 1. Als Kontrollversuch wurde zeitlich versetzt neben dem ozonten AbWa5 auch das Originalabwasser AbWa5 als zusätzliche C-Quelle untersucht, jedoch ohne FISH-Analyse. DOC-Konzentrationen sind ungefähre Werte, die je nach Ansatz leicht variabel waren.

Reaktorbezeichnung	Medium	Zusatz	Gesamt- $\rho$ (DOC) in mg/L
BFR 1, BFR 2	SAW	-	10
BFR 3, BFR 4	SAW	AbWa5, ozont	48
BFR 5, BFR 6	-	AbWa5, ozont	38
BFR 1, BFR 2	SAW	-	10
BFR 3, BFR 4	SAW	AbWa5	44
BFR 5, BFR 6	-	AbWa5	34

und 6, s. Tabelle 3.17). Das ozonte Abwasser wurde für diese Versuche im Verhältnis 1:50 mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{demin}}$  verdünnt ( $\rho(\text{DOC}) = 38 \text{ mg/L}$ ). Um Verdünnungseffekte auszuschließen, wurde das SAW als 1000fach-Konzentrat dem Industrieabwasser zugegeben. Zusätzlich wurde zu jeder FISH-Analyse eine CTC/DAPI-Färbung zur Bestimmung der Aktivität der Mikroorganismen durchgeführt (s. Abschnitt 3.4.3). Die Versuchsdauer betrug 28 d, es wurden zu verschiedenen Zeiten DOC-Proben (sofortige  $0,45 \mu\text{m}$ -Filtration) aus Reaktorzu- und -ablauf (Berechnung des BDOC, s. Gleichung 3.11) sowie Biofilmproben aus den Reaktoren genommen (s. Abschnitt 3.4.4). Für die FISH-Analyse wurden die in Tabelle 3.7 aufgelisteten gruppenspezifischen Oligonukleotidsonden verwendet.

#### 3.5.4.2 Populationsanalyse System 2

Im System 2 wurden Populationsveränderungen innerhalb der Nitrifikanten untersucht. Ausgehend vom Betrieb der Biofilmreaktoren mit einem Nitrifikationsmedium (Vorlaufphase: 2 Monate) wurde der Einfluss verschiedener C-Quellen untersucht. Da die Nitrifikanten als aerobe autotrophe Mikroorganismen (Nutzung von anorganischen C-Quellen) in Konkurrenz zu den aeroben heterotrophen Mikroorganismen (Nutzung von organischen C-Quellen) stehen, waren sowohl Einschränkungen der Nitrifikationsleistung als auch eine Verdrängung der autotrophen Mikroorganismen denkbar. Als biologisch leicht abbaubare organische C-Quellen wurden Acetat und Pyruvat eingesetzt, biologisch schwer abbaubare Substanzen wurden durch das AbWa5 simuliert. Dieses wurde sowohl im Original eingesetzt als auch nach Ozonung

Tabelle 3.18: Medienzusammensetzung für das Abwassersystem 2 der beiden Versuchsphasen 1 und 2. Grundmedium für alle Reaktoren war das Nitrifikationsmedium, s. Tabelle 3.2.

Reaktorbezeichnung	Zusatz	Gesamt- $\rho$ (DOC) in mg/L
Phase 1 (73 d)		
BFR 1, BFR 7	-	< 1
BFR 2	Acetat	10,32
BFR 3	Acetat + Pyruvat	11,82 (5,16 + 6,66)
BFR 4, BFR 8	AbWa5, ozont	10,12
BFR 5	AbWa5, ozont	5,06
BFR 6	AbWa5	8,14
Phase 2 (37 d)		
BFR 1, BFR 7	-	< 1
BFR 2	Acetat	41,28
BFR 3	Acetat + Pyruvat	47,28 (20,64 + 26,64)
BFR 4, BFR 8	AbWa5, ozont	40,48
BFR 5	AbWa5, ozont	20,24
BFR 6	AbWa5	32,56

bei einem pH-Wert von 9,0 (s. Tabelle 3.15). Die gesamte Versuchsdauer belief sich auf 110 Tage. Dabei wurden in Phase 1 des Versuchs (73 d) die organischen C-Quellen im Massekonzentrationsverhältnis von  $\text{CSB:N-NH}_4^+ = 1:1$  zugesetzt. In der zweiten Phase des Versuchs (37 d) betrug das  $\text{CSB:N-NH}_4^+$ -Verhältnis 4:1. In Tabelle 3.18 sind die Medienzusammensetzungen für die Biofilmreaktoren in den verschiedenen Versuchsphasen aufgeführt. Neben dem Abbau des Ammoniums (s. Abschnitt 3.1.11) wurde die Bildung von Nitrit und Nitrat (s. Abschnitt 3.1.6, sofortige Sterilfiltration nach Probenahme (0,22  $\mu\text{m}$ , Millex-GS, Millipore)) sowie der BDOC (s. Gleichung 3.11) gemessen. Zu verschiedenen Zeiten des Versuchs wurden Biofilmproben zur FISH-Analyse genommen (s. Abschnitt 3.4.4). Dafür wurden die in Tabelle 3.8 aufgeführten Gensonden verwendet. Zusätzlich zu den auch in System 1 verwendeten Biofilmreaktoren wurden größere Festbettbiofilmreaktoren eingesetzt (BFR 7 und BFR 8, s. Abschnitt 3.3.3).

# Kapitel 4

## Ergebnisse und Diskussion

### 4.1 Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 1

Abwasser 1 fällt bei der Synthese des Oxazolamids an, welches ein Zwischenprodukt bei der Produktion von Vitamin B6 ist. Inhaltsstoffe sind hauptsächlich Heterozyklen, welche als Nebenprodukte bei der Synthese entstehen (s. Abschnitt 3.5.1). Für das Abwasser 1 (AbWa1) wurden relativ einfache Oxidationsexperimente ausgewählt. Dies bedeutete, dass keine pH-Wert-Regelung während des Oxidationsschrittes erfolgte. Weiterhin wurden nur relativ geringe Mengen an Oxidationsmitteln eingesetzt (s. Tabelle 3.15). Es wurden die Verfahren Ozonung, Peroxon sowie die  $\text{H}_2\text{O}_2$ /UV-Oxidation bei einem Start-pH-Wert von jeweils 4,3 durchgeführt. Dieser sank während der Oxidation auf pH-Werte zwischen 2 und 3. Anschließend erfolgte die Messung der biologischen Abbaubarkeit mit Hilfe des biochemischen Sauerstoffbedarfs ( $\text{BSB}_{28}$ ). Die Proben wurden zur  $\text{BSB}_{28}$ -Messung 1:10 verdünnt und der pH-Wert auf 7 eingestellt.

#### 4.1.1 Oxidation von Abwasser 1

Das Verhältnis von  $\text{BSB}/\text{CSB}$  des unbehandelten AbWa1 betrug 0,22, somit konnte dieses Abwasser als nur gering biologisch abbaubar eingestuft werden. Ziel der chemischen Oxidation war somit, im Abwasserstrom (1) eine Verringerung der Fracht und (2) eine Verbesserung der biologischen Abbaubarkeit zu erreichen. Die Effektivität der untersuchten Oxidationsverfahren kombiniert mit biologischem Abbau ist zusammenfassend in Tabelle 4.1 dargestellt. Es zeigte sich, dass die Verfahren Ozonung und Peroxon einen deutlichen Abbau der CSB- und DOC-Belastung erzielten, weiterhin wurde das Abwasser zu einem großen Teil entfärbt. Bemerkenswert dabei war, dass ein molares Verhältnis von Ozon zu DOC-Gehalt des Abwassers von nur 0,125

Tabelle 4.1: Oxidation von Abwasser 1. Ausbeutekoeffizient  $K_A$  als  $\Sigma$  Oxidationsmittelmenge/ $\Delta$  CSB in  $g/g$  (s. 2.2.5) sowie erzielt BSB/CSB-Verhältnis nach Oxidation. Erzielter Gesamtabbau der Fracht anhand der Summenparameter CSB, DOC und SAK sowie der Toxizität ( $G_L$ -Wert), angegeben als Verhältnis  $\rho/\rho_0$  des Endwertes ( $\rho$ ) nach chemisch-biologischer Behandlung zum Ausgangswert ( $\rho_0$ ) des unbehandelten Abwassers.

Verfahren	$K_A$	BSB/CSB	CSB	DOC	SAK <sub>436</sub>	SAK <sub>254</sub>	$G_L$
Ozonung	2,13	0,56	0,31	0,27	0,19	0,17	0
Peroxon	3,18	0,48	0,31	0,29	0,19	0,18	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (150 W)	11,22	0,26	0,83	0,82	1,12	0,81	0,28

eingesetzt wurde. Dies reichte aus, um einen CSB-Gesamtelimination von ca. 70% zu erzielen. Der zusätzliche Einsatz von Wasserstoffperoxid im Peroxon-Verfahren konnte nicht gerechtfertigt werden, da sich der Ausbeutekoeffizient verschlechterte und der Gesamtabbau der Fracht im Vergleich zur Ozonung nicht verbesserte. In Abbildung 4.1 ist die Verringerung des CSB mit Hilfe der verschiedenen Oxidationsverfahren gezeigt. Deutlich ist zu erkennen, dass die Oxidation mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV (150 W) keinen Effekt auf das Abwasser besaß, d.h. der CSB wurde kaum verringert (keine Oxidationswirkung) und der biologische Abbau war ähnlich dem des unbehandelten Abwassers. Somit waren auch keine strukturellen Veränderungen der Abwasserinhaltsstoffe zu vermuten. Der Grund hierfür lag in der hohen Eigenabsorption von AbWa1 im Wellenlängenbereich der UV-Strahlung, so dass keine Spaltung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zu OH-Radikalen erfolgen konnte, womit keine Oxidationswirkung eintrat. Somit wäre dieses Verfahren nur bei Verwendung speziell konstruierter Bestrahlungsreaktoren, wie Dünnfilmreaktoren, für AbWa1 einsetzbar. Betrachtet man den Verlauf der Toxizität im Leuchtbakterienhemmtest, so zeigt sich, dass durch die Ozonung nur eine geringe Erhöhung der Toxizität erfolgte, wohingegen der Anstieg beim Peroxon-Verfahren deutlicher war (Abbildung 4.2).

Neben möglichen Restkonzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> könnten toxische Reaktionsprodukte für diesen Anstieg verantwortlich gewesen sein. Da die mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV (150 W) behandelte Probe trotz wahrscheinlicher Restkonzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kaum eine erhöhte Toxizität aufwies, ist diese Folgerung naheliegend. Da jedoch restliches H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in diesen Proben nicht analysiert wurde, kann diese Frage nicht endgültig beantwortet werden. Die erhöhte Toxizität der mit Peroxon behandelten Probe ergab auch eine verlängerte Adaptationsphase bei der Messung des BSB<sub>28</sub> (s. Abbildung



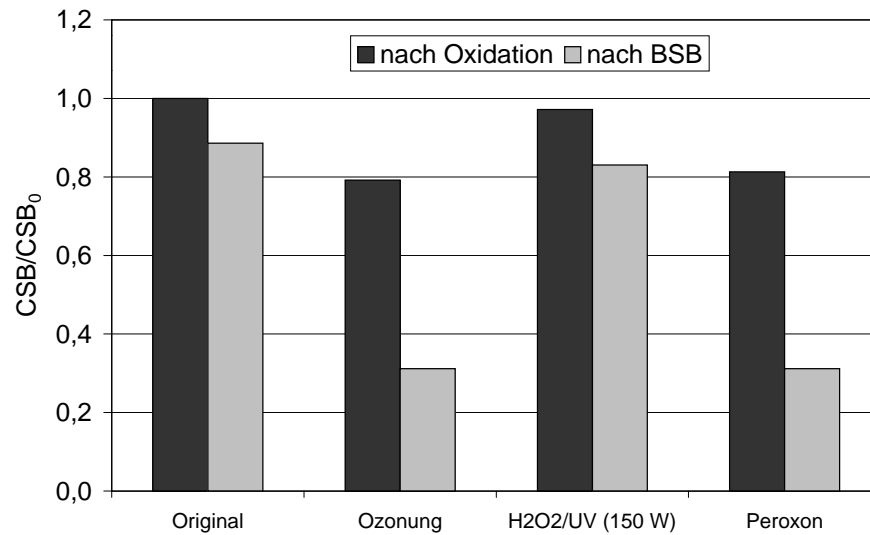


Abbildung 4.1: Verringerung des CSB bei Abwasser 1 nach chemischer Oxidation und biologischem Abbau (BSB).

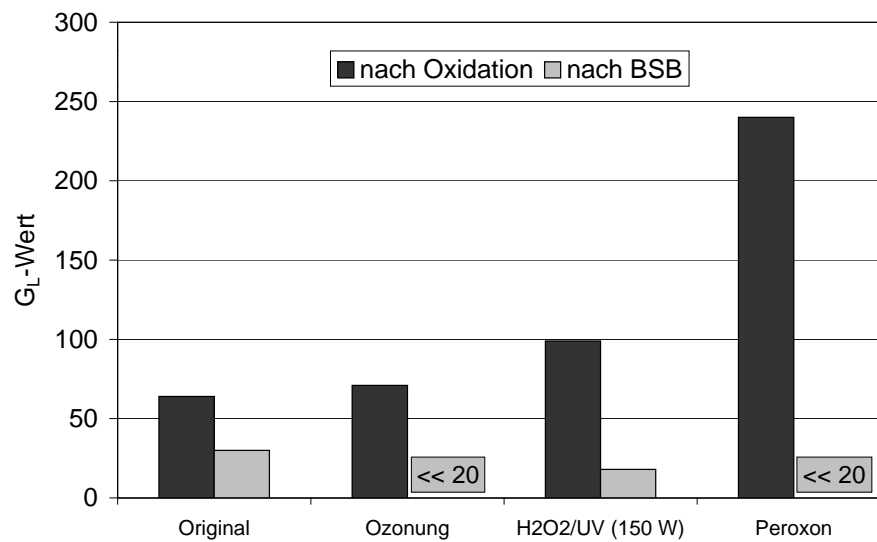


Abbildung 4.2: Änderung der Toxizität von Abwasser 1 nach chemischer Oxidation und biologischem Abbau (BSB).

4.3). Während die ozonte Probe bereits nach 2 Tagen einen Sauerstoffverbrauch anzeigte, dauerte es bei der Peroxon-Probe 4 Tage. Die Endwerte des  $BSB_{28}$  waren bei der Ozonung und beim Peroxon-Verfahren im gleichen Größenbereich, während die mit  $H_2O_2/UV$  (150 W) behandelte Probe einen ähnlichen Verlauf wie die unbehandelte Probe aufwies. Das erreichte  $BSB/CSB$ -Verhältnis bei der Ozonung von 0,56 bedeutete eine relativ gute biologische Abbaubarkeit des so behandelten Abwassers und seine deutliche Verbesserung im Vergleich zur unbehandelten Probe.

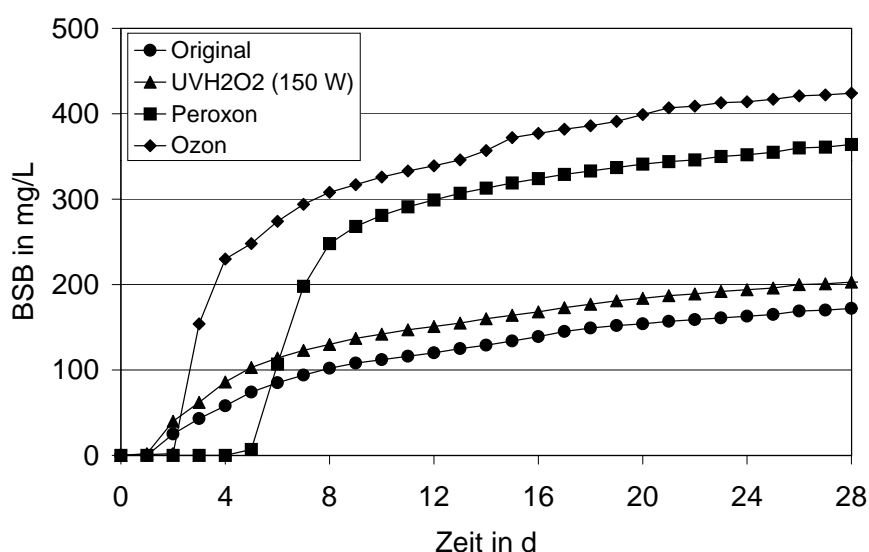


Abbildung 4.3: Sauerstoffverbrauchskurven bei der  $BSB_{28}$ -Messung von Abwasser 1. Alle Proben wurden vor der Messung 1:10 verdünnt.

Die Ozon- und Peroxon-Proben wurden während der biologischen Behandlung detoxifiziert. Die Reaktionsprodukte der chemischen Oxidation verhinderten also im Falle des Peroxon-Verfahrens nicht einen effektiven Bioabbau. Eine nähere Charakterisierung der Oxidationsprodukte erfolgte mit Hilfe der gelchromatographischen Auftrennung des DOC (LC-DOC). Die Auftrennung des DOC in den Proben verläuft dabei nach dem Größenausschlussprinzip sowie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen (WW) mit dem Trennsäulenmaterial. Die Permeationsgrenze der verwendeten Säule (TSK HW 40) lag bei ca. 50 min [253]. Die Fraktionen des AbWa1 permeierten jedoch teilweise erst deutlich später, so dass bei den Inhaltsstoffen von AbWa1 von starken WW mit dem Säulenmaterial auszugehen war, was ihre Zuordnung hinsichtlich der Größe bzw. des Molekulargewichts erschwerte (s. Abbildung

4.4). Es lassen sich jedoch qualitative Aussagen treffen, inwieweit die chemische Oxidation die Charakteristik der Inhaltstoffe veränderte und inwieweit bestimmte Fraktionen durch biologischen Abbau entfernt werden konnten. Die Chromatogramme der ozonten und der mit Peroxon behandelten Probe waren sehr ähnlich, so dass angenommen werden kann, dass sich die Reaktionsprodukte in ihrer Struktur nur unwesentlich unterschieden. Deutlich ist zu sehen, dass die Reaktionsprodukte hauptsächlich innerhalb der Permeationsgrenze eluierten, woraus zu schließen ist, dass hydrophobe WW nur noch eine untergeordnete Rolle spielten, d.h. die Reaktionsprodukte waren hydrophiler als die Ausgangssubstanzen. Ebenso ist der teilweise biologische Abbau vieler Fraktionen zu erkennen. Die mit  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  (150 W) behandelte Probe zeigte nur geringe Veränderungen in ihrer Verteilung im Chromatogramm. Der biologische Abbau beschränkte sich auf die Fraktion bei  $t = 65$  min im Bereich nach der Permeationsgrenze, in dem z.B. Methanol eluiert [8].

#### 4.1.2 Zusammenfassung: Behandlung Abwasser 1

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Ozonung ein sinnvolles Oxidationsverfahren für die Behandlung von Abwasser 1 darstellte. Hierbei könnte eine Erhöhung der Oxidationsmittelmenge und eine Regelung des pH-Wertes zu einer weiteren Verbesserung des Gesamtabbaus der organischen Inhaltsstoffe führen. Der Ausbeutekoeffizient  $K_A$  für Ozon war mit ca. 2 g/g in einem Bereich, wie er bei der Abwasseroxidation typisch ist [74]. Toxische Oxidationsprodukte entstanden nicht, so dass der biologische Abbau nicht gehemmt wurde. Eine detaillierte Untersuchung der Abwasserinhaltsstoffe gestaltete sich jedoch schwierig, da eine unbekannte Menge an Nebenprodukten bei der Synthese des Oxazolamids im Abwasser anfiel. Daher war die Charakterisierung mit Hilfe der LC-DOC ein geeignetes Instrument zur Verfolgung der Oxidations- und Abbauvorgänge im Abwasser. Die zusätzliche Information über die toxischen Eigenschaften des Abwassers diente einer weitergehenden Beurteilung der chemisch-biologischen Abwasserbehandlung.

## 4.2 Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 2

Abwasser 2 (AbWa2) entstand bei der Synthese von 4,4-Dinitrostilben-2,2-disulfonsäure (DNS), der Vorläufersubstanz für optische Aufheller (s. Abschnitt 3.5.1). Inhaltsstoffe waren wiederum Nebenprodukte des Syntheseschrittes, die nicht näher charakterisiert waren. Die Oxidation von AbWa2 erfolgte unter Regelung des pH-Wertes. Neben den Verfahren Ozonung, Peroxon und  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ -Oxidation wurde die Ozonung mit zusätzlicher UV-Strahlung sowie die Photo-Fenton-Reaktion (P.F.

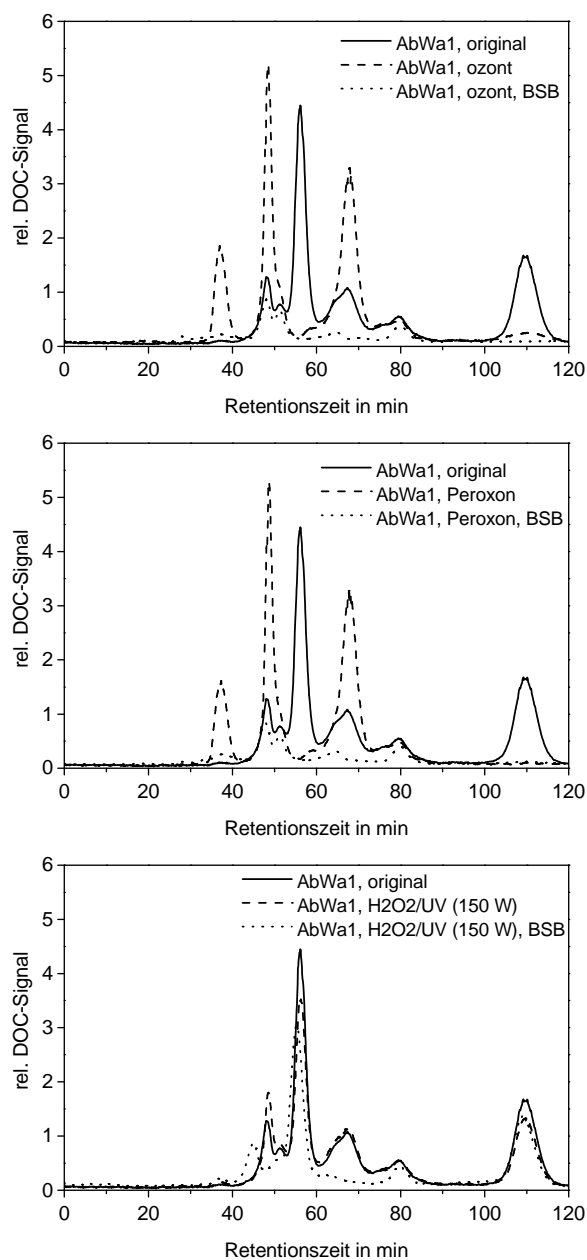


Abbildung 4.4: Gelchromatographische Auftrennung (LC-DOC, TSK HW 40S) der chemisch-biologisch behandelten AbWa1-Proben. Oben: Ozonung, mitte: Peroxon, unten: H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV (150 W).

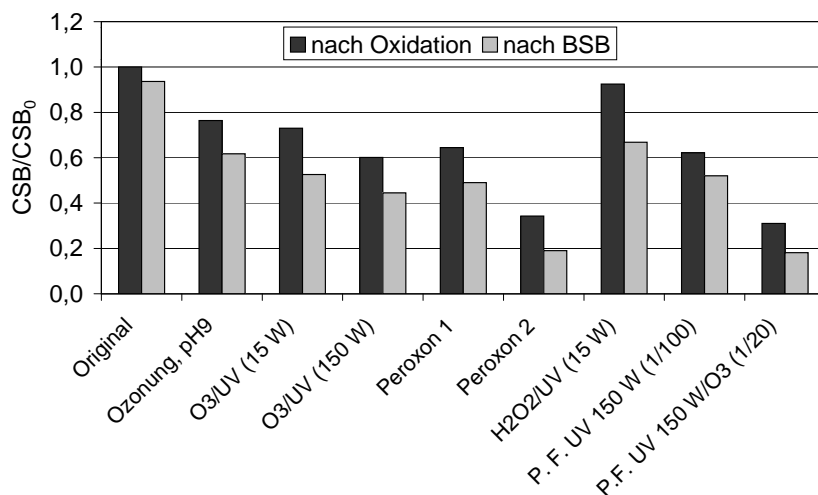


Abbildung 4.5: Verringerung des CSB bei Abwasser 2 nach chemischer Oxidation und biologischem Abbau (BSB, 1:5).

UV) mit und ohne zusätzliche Ozondosierung eingesetzt (s. Tabelle 3.15). Die Zugabe an  $\text{Fe}^{2+}$  erfolgte in einem molaren  $\text{Fe}^{2+}/\text{DOC}$ -Verhältnis von 1/100 bzw. 1/20 bei zusätzlicher Ozondosierung. Das Peroxon-Verfahren wurde sowohl mit einem molaren  $\text{O}_3/\text{DOC}$ -Verhältnis von 0,5 (Peroxon 1) als auch von 1 (Peroxon 2) durchgeführt. Der  $\text{BSB}_{28}$  wurde unverdünnt und nach 1:5 Verdünnung der Proben gemessen.

#### 4.2.1 Oxidation von Abwasser 2

Die rein biologische Behandlung von AbWa2 zeigte, dass dieses Abwasser als nicht biologisch abbaubar einzustufen war. Das  $\text{BSB}/\text{CSB}$ -Verhältnis betrug nur 0,05, so dass hier ein zusätzlicher Behandlungsschritt unumgänglich war. Die eingesetzten Oxidationsmittelmengen wurden dementsprechend gegenüber AbWa1 erhöht (s. Tabelle 3.15). Die damit erzielte Verringerung der Fracht ist in Tabelle 4.2 zusammengefasst dargestellt.

Anhand der CSB-Verringerung lässt sich die Oxidationsleistung der einzelnen Verfahren zeigen (s. Abbildung 4.5). Auffallend im Vergleich zu AbWa1 war hier, dass der Abbau der organischen Inhaltsstoffe hauptsächlich durch den chemischen Oxidationsschritt und nicht durch die biologische Behandlung erfolgte. Durch den zusätzlichen Einsatz von UV-Strahlung bei der Ozonung konnte die Verringerung des

Tabelle 4.2: Oxidation von Abwasser 2. Ausbeutekoeffizient  $K_A$  als  $\Sigma$  Oxidationsmittelmenge/ $\Delta$  CSB in  $g/g$  sowie erzieltes BSB/CSB-Verhältnis nach Oxidation. Erzielter Gesamtabbau der Fracht anhand der Summenparameter CSB, DOC, SAK und AOX sowie der Toxizität ( $G_L$ -Wert), angegeben als Verhältnis  $\rho/\rho_0$  des Endwertes ( $\rho$ ) nach chemisch-biologischer Behandlung zum Ausgangswert ( $\rho_0$ ) des unbehandelten Abwassers, bei AOX: Verhältnis nach Oxidation zum Ausgangswert. n.b. = nicht bestimmt; fehlende Werte: keine BSB-Bestimmung durchgeführt.

Verfahren	$K_A$	BSB/CSB	CSB	DOC	SAK <sub>436</sub>	SAK <sub>254</sub>	AOX	$G_L$
Ozonung, pH 3	3,01						0,71	
Ozonung, pH 9	3,31	0,14	0,62	0,65	0,08	0,58	0,67	0
O <sub>3</sub> /UV (15 W), pH 9	2,39	0,10	0,53	0,64	0,03	0,65	0,51	0
O <sub>3</sub> /UV (150 W), pH 9	1,69	0,13	0,45	0,60	0,09	0,54	0,53	n.b.
Peroxon 1, pH 8,5	2,47	0,06	0,49	0,63	0,06	0,49	0,41	0
Peroxon 2, pH 8,5	2,65	0,34	0,19	0,28	0,03	0,15	0,44	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (15 W), pH 7	12,87	0,06	0,67	0,76	0,76	0,89	0,92	0
P.F. UV 150 W (1/100), pH 3	2,61	0,06	0,52	0,63	0,43	0,55	0,88	n.b.
P.F. UV 150 W/O <sub>3</sub> (1/20), pH 3	2,10	0,49	0,18	0,25	0,12	0,23	n.b.	n.b.

CSB verbessert werden. Bei Verwendung des 150 W-Strahlers lagen die Ergebnisse im Bereich von Peroxon 1. In der Praxis ist damit jedoch das Peroxon-Verfahren zu bevorzugen, da die Dosierung von Wasserstoffperoxid einfacher zu gestalten ist als die Konstruktion einer Bestrahlungseinheit. Die Photo-Fenton-Reaktion bewirkte

eine ähnliche Verringerung des CSB. Dagegen war die Effektivität der Bestrahlung beim  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  (15 W)-Verfahren aufgrund des *inner filter effects* des Abwassers im Zusammenspiel mit dem geringen molaren Absorptionskoeffizienten von  $\text{H}_2\text{O}_2$  verringert. Da die mit dem molaren Ozon/DOC-Verhältnis von 0,5 erzielten Eliminationsraten für den CSB nur bei ca. 50-55% lagen, wurde das Peroxon-Verfahren mit der doppelten Ozon- und  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Menge durchgeführt (Peroxon 2), weiterhin die Photo-Fenton-Reaktion mit zusätzlicher Ozondosierung. Bei diesen Verfahren wurden sowohl die höchsten BSB/CSB-Verhältnisse (0,34 bzw. 0,49) erreicht wie auch die beste Gesamtelimination an CSB (über 80%). Am Beispiel des Peroxon-Verfahrens zeigte sich, dass für AbWa2 wesentlich höhere Oxidationsmittelmengen nötig waren, um (1) eine effektive Oxidationsleistung zu erzielen und (2) eine Verbesserung des biologischen Abbaus zu bewirken. Die Verfahren mit Beteiligung von Ozon erwiesen sich als besonders geeignet zur Entfärbung des Abwassers, der Verringerung des  $\text{SAK}_{436}$ , da Ozon selektiv Aromaten und Olefine angreift. Zwar konnte auch mit dem  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  (15 W)-Verfahren der  $\text{SAK}_{436}$  auf 76% des Ausgangswertes verringert werden, dies konnte jedoch nur auf den biologischen Schritt zurückgeführt werden. Nach der Oxidation hatte sich der  $\text{SAK}_{436}$  leicht erhöht (s. Anhang Tabelle D.2), was auf die Bildung von Polymerisationsprodukten schließen ließ. Diese können bei zu niedrigen Sauerstoffkonzentrationen in der bestrahlten Schicht entstehen ([42], s. Abschnitt 2.2.2). Die Abbauraten für den DOC lagen für alle Verfahren etwas niedriger als die CSB-Verringerung, was auf eine Anoxidation der Inhaltsstoffe und eine unvollständige Mineralisierung schließen lässt.

Betrachtet man den Verlauf der Toxizität im Leuchtbakterienhemmtest für AbWa2, so konnte mit allen Verfahren nach biologischem Abbau eine vollständige Detoxifizierung des Abwassers erzielt werden (s. Abbildung 4.6). Die erhöhten Toxizitätswerte nach  $\text{O}_3/\text{UV}$ -Oxidation, Photo-Fenton und Peroxon 1-Behandlung könnten ein Grund für den schlechteren biologischen Abbau im Vergleich zur Peroxon 2-Probe sein, jedoch konnte auch hier eine Detoxifizierung erreicht werden. Die Toxizität wurde nicht durch restliches  $\text{H}_2\text{O}_2$  beeinflusst, da dieses bei allen Oxidationsverfahren vollständig abreagiert war.

#### 4.2.2 AOX-Abbau bei Abwasser 2

Der Abbau des AOX war beim  $\text{O}_3/\text{UV}$ - und beim Peroxon-Verfahren mit 50-60% am höchsten (s. Abbildung 4.7). Die Erhöhung des Eintrags an Ozon bzw.  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Peroxon 2-Prozess bewirkte dabei keine weitere Verbesserung. Bei den Ozon- und P.F.-Verfahren betrug der Abbau nur ca. 12%. Der geringste AOX-Abbau war bei den  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$  (15 W)-Verfahren zu beobachten. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der Großteil (ca. 60%) der chlorierten Wasserinhaltsstoffe effektiv durch Prozesse mit dominierenden OH-Radikalreaktionen abgebaut werden kann. Demgegenüber werden die restlichen ca. 40% durch andere Reaktionsmechanismen zerstört,

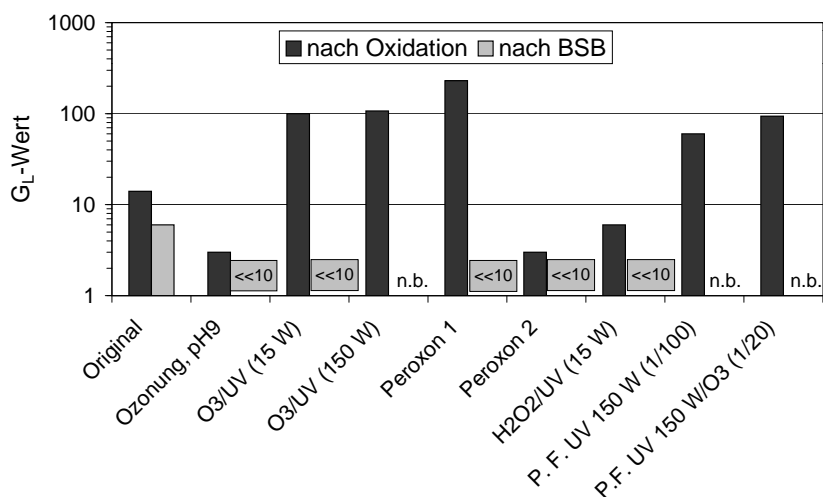


Abbildung 4.6: Änderung der Toxizität von Abwasser 2 nach chemischer Oxidation und biologischem Abbau (BSB, 1:5). n.b. = nicht bestimmt.

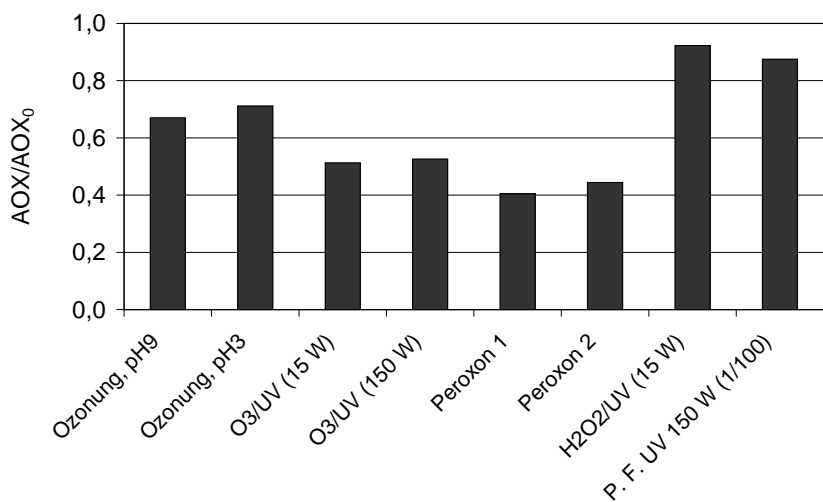


Abbildung 4.7: Abbau des AOX bei Abwasser 2 durch chemische Oxidation.

beispielsweise durch Angriff des O<sub>3</sub>-Moleküls. Diese Vermutung konnte durch eine Ozonung bei pH 3,0 bestärkt werden, bei der die Reaktion des O<sub>3</sub>-Moleküls mit den



Wasserinhaltsstoffen dominierend ist. Durch dieses Verfahren konnten nur ca. 30% des AOX abgebaut werden (s. Tabelle 4.2).

### 4.2.3 Inhaltsstoffe von Abwasser 2

Die Bestimmung von Einzelsubstanzen mit Hilfe der HPLC gelang nicht. Die unvollständige Trennung der Substanzen zeigte, dass es sich um ein Gemisch zahlreicher Substanzen handelte, die auch anhand der Peakanalyse über Absorptionsspektren nicht identifiziert werden konnten (s. Abbildung 4.8), da keine ausreichende Trennung des Substanzgemisches erfolgt war. Am Beispiel des Peroxon 1-Verfahrens ist dargestellt, dass Fraktionen von AbWa2 durch Oxidation teilweise verschwanden (Retentionszeiten 6,230 und 7,515) oder stark abgebaut wurden (Retentionszeiten 1,401, 2,872 und 3,723). Dabei ist deutlich zu sehen, dass die Reaktionsprodukte der chemischen Oxidation hydrophile Substanzen darstellten, die bei niedrigen Retentionszeiten eluierten (geringe WW mit dem Säulenmaterial).

### 4.2.4 Zusammenfassung: Behandlung Abwasser 2

Die Oxidation von AbWa2 lässt folgende Schlussfolgerungen zu:

- das Peroxon-Verfahren stellte eine geeignete Methode zur Oxidation von AbWa2 dar, wobei
- wesentlich höhere Oxidationsmittelmengen als bei AbWa1 nötig waren, um einen effektiven Abbau der Inhaltsstoffe, eine Erhöhung des BSB/CSB-Verhältnisses und die Vermeidung der Entstehung toxischer Reaktionsprodukte zu erreichen; der Ausbeutekoeffizient im Peroxon 2-Verfahren war mit einem Wert von 2,65 g/g etwas schlechter als für die Ozonung von AbWa1,
- die komplexe Zusammensetzung eine detaillierte Analyse der Wasserinhaltsstoffe erschwerte, so dass die Charakterisierung anhand von Summenparametern erfolgen musste.

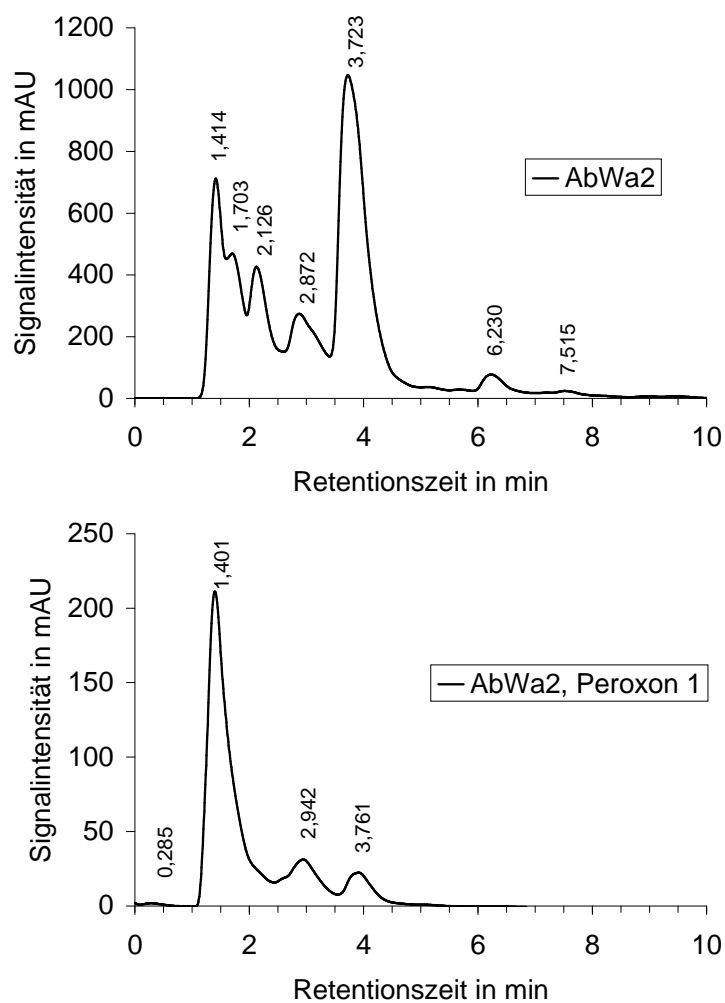


Abbildung 4.8: *High performance liquid chromatography* (HPLC, ODS Hypersil) von AbWa2 vor und nach Peroxon-Oxidation. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achse. Detektion DAD350.

## 4.3 Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 3

Abwasser 3 (AbWa3) stammte aus der Herstellung des optischen Aufhellers 4,4-Bis[(4-anilino-6-bis(2-hydroxyethyl)amino-1,3,5-triazin-2-yl) amino]stilben-2,2-disulfonat (Tinopal UP, s. Abschnitt 3.5.1). Mögliche Inhaltsstoffe in AbWa3 waren neben Tinopal UP sowohl die Edukte wie auch Nebenprodukte der Synthese. Es wurden die entsprechenden Oxidationsverfahren wie für AbWa2 eingesetzt, der BSB<sub>28</sub> wurde unverdünnt sowie nach 1:5-Verdünnung gemessen.

### 4.3.1 Oxidation von Abwasser 3

Abwasser 3 unterschied sich von den Abwässern 1 und 2 dadurch, dass es bereits zu einem relativ großen Teil biologisch abbaubar war, das Verhältnis BSB/CSB betrug 0,52. Somit bestand hier die Frage, inwieweit eine chemische Voroxidation die biologische Abbaubarkeit beeinflusste, da möglicherweise biologisch abbaubare Substanzen durch die Oxidation entfernt werden würden.

Diese Vermutung bestätigte sich, wie in Tabelle 4.3 gezeigt ist. Zwar zeigten die Werte auf den ersten Blick relativ gute Abbauergebnisse an, insbesondere bei der CSB-Verringerung und beim BSB/CSB-Verhältnis, doch im Vergleich mit dem rein biologischen Abbau von AbWa3 konnte eine chemische Oxidationsstufe in dieser Form nicht gerechtfertigt werden (s. Abbildung 4.9). Es ist zu vermuten, dass durch die chemische Oxidation die biologisch verwertbaren Substanzen entfernt wurden, während der refraktäre Anteil stabil blieb.

Wurde der BSB unverdünnt gemessen, fiel die Bilanz der meisten Oxidationsverfahren schlechter aus als bei rein biologischer Behandlung. Nur in der 1:5-Verdünnung konnten im Falle des Peroxon 2- und des P.F.-Verfahrens etwas bessere Abbauergebnisse erzielt werden (s. Abbildung 4.9).

Das unbehandelte Abwasser 3 zeigte keine Hemmung im Leuchtbakterienhemmtest, wohingegen die Oxidationsverfahren teilweise eine deutliche Erhöhung der Toxizität bewirkten (s. Abbildung 4.10). Die toxischen Substanzen konnten auch durch die biologische Behandlung nicht immer vollständig eliminiert werden. Die Proben nach H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV-Oxidation besaßen aufgrund hoher Restkonzentrationen an Wasserstoffperoxid die höchsten Toxizitätswerte. Dass diese nur auf das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zurückzuführen waren, zeigte sich dadurch, dass nach Zugabe von MnO<sub>2</sub> (Zerstörung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) nur sehr geringe Hemmwirkungen messbar waren. Die allgemeine Erhöhung der Toxizität könnte also auch ein Grund für die schlechte biologische Abbaubarkeit sein. Jedoch zeigte auch die Peroxon 2-Probe trotz Detoxifizierung beim biologischen Abbau nur einen unwesentlich besseren biologischen Abbau als die Probe nach Ozonung.

Tabelle 4.3: Oxidation von Abwasser 3. Ausbeutekoeffizient  $K_A$  als  $\Sigma$  Oxidationsmittelmenge/ $\Delta$  CSB in  $g/g$  sowie erzielttes BSB/CSB-Verhältnis nach Oxidation. Erzielter Gesamtabbau der Fracht anhand der Summenparameter CSB, DOC, SAK<sub>254</sub> sowie der Toxizität ( $G_L$ -Wert), angegeben als Verhältnis  $\rho/\rho_0$  des Endwertes ( $\rho$ ) nach chemisch-biologischer Behandlung zum Ausgangswert ( $\rho_0$ ) des unbehandelten Abwassers. n.b. = nicht bestimmt.

Verfahren	$K_A$	BSB/CSB	CSB	DOC	SAK <sub>254</sub>	$G_L$
Ozonung, pH 9	4,00	0,40	0,37	0,47	0,56	26
O <sub>3</sub> /UV (15 W), pH 9	2,29	0,37	0,58	0,7	0,45	3
O <sub>3</sub> /UV (150 W), pH 9	2,13	0,34	0,42	0,70	0,38	3
Peroxon 1, pH 8,5	2,02	0,20	0,54	0,70	0,43	n.b.
Peroxon 2, pH 8,5	2,86	0,52	0,27	0,31	0,10	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (15 W), pH 7	5,46	0,30	0,51	0,53	0,92	1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (150 W), pH 7	4,30	0,50	0,34	0,30	0,84	1
P.F. UV 150 W/O <sub>3</sub> (1/20), pH 3	3,72	0,52	0,19	0,29	0,20	n.b.

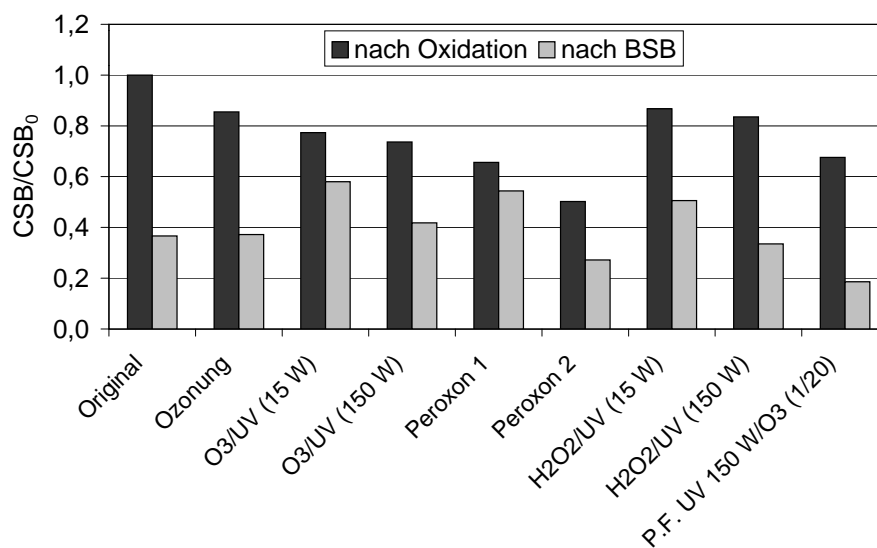


Abbildung 4.9: Verringerung des CSB bei Abwasser 3 nach chemischer Oxidation und biologischem Abbau (BSB, 1:5).

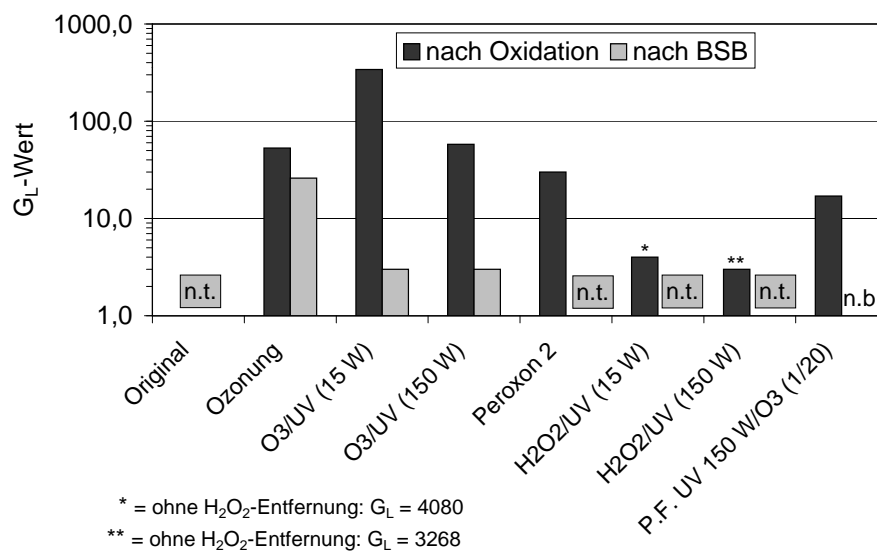


Abbildung 4.10: Änderung der Toxizität von Abwasser 3 nach chemischer Oxidation und biologischem Abbau (BSB, 1:5). n.b. = nicht bestimmt, n.t. = nicht toxisch.

### 4.3.2 Inhaltsstoffe von Abwasser 3

Ähnlich zu AbWa2 gelang auch bei AbWa3 keine Identifizierung von Einzelsubstanzen mit Hilfe der HPLC und anschließender Detektion über Absorptions- oder Fluoreszenzmessung (s. Abbildung 4.11). In den Chromatogrammen war zu erkennen, dass ein Großteil der Inhaltsstoffe bei Oxidation um- bzw. abgebaut wurden und sich die Retentionszeiten verkürzten, woraus auf die Bildung hydrophiler Oxidationsprodukte geschlossen werden kann. In Abbildung 4.11 ist am Beispiel der beiden Peroxon-Verfahren dargestellt, wie der erhöhte Oxidationsmitteleintrag zu einem vermehrten Abbau der Wasserinhaltsstoffe führte.

### 4.3.3 Veränderte Verfahrensführung für Abwasser 3 und Schlussfolgerung

Aufgrund der erhaltenen Ergebnisse ließ sich folgern, dass für AbWa3 ein chemischer Oxidationsschritt erst nach vorangehender biologischer Behandlung sinnvoll war, um die Oxidation auf die Restkonzentrationen an refraktären Substanzen zu beschränken. Um dies zu überprüfen, wurde das AbWa3 zuerst in einem Batch-Experiment ( $V = 2,4$  L, Titrationssystem TitroWiCo) biologisch behandelt. Nach 28 d waren ca. 60% des CSB und 55% des DOC abgebaut. Nach  $0,45 \mu\text{m}$ -Filtration wurde die Abwasserprobe mit dem Peroxon 2-Verfahren behandelt (molares Verhältnis Ozon:DOC:H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = 1:1: $\frac{1}{3}$ ). Die anschließende biologische Stufe (BSB<sub>28</sub>) führte zu einer Gesamtelimination von 84% des CSB und 71% des DOC (s. Abbildung 4.12). Verglichen mit dem chemisch-biologischen Prozess mit Peroxon 2 ohne vorherigen biologischen Abbau wurde die CSB-Verringerung um 11% verbessert. Aufgrund des niedrigeren DOC-Gehaltes nach der ersten biologischen Behandlung (55% DOC-Abbau) waren jedoch deutlich geringere Mengen an Oxidationsmittel nötig. Deswegen wäre hier eine weitere Erhöhung der Oxidationsmittelmenge gerechtfertigt, wobei bei ausreichender Eliminierung der organischen Belastung ein Verzicht auf die zweite biologische Stufe denkbar wäre. Bei der hier eingesetzten Peroxon-Behandlung wurde ein Ausbeutekoeffizient ( $\Sigma$  Oxidationsmittelmenge/ $\Delta$  CSB) von 2,45 g/g erreicht, was im gleichen Bereich wie bei der entsprechenden Oxidation der Abwässer 1 und 2 lag.

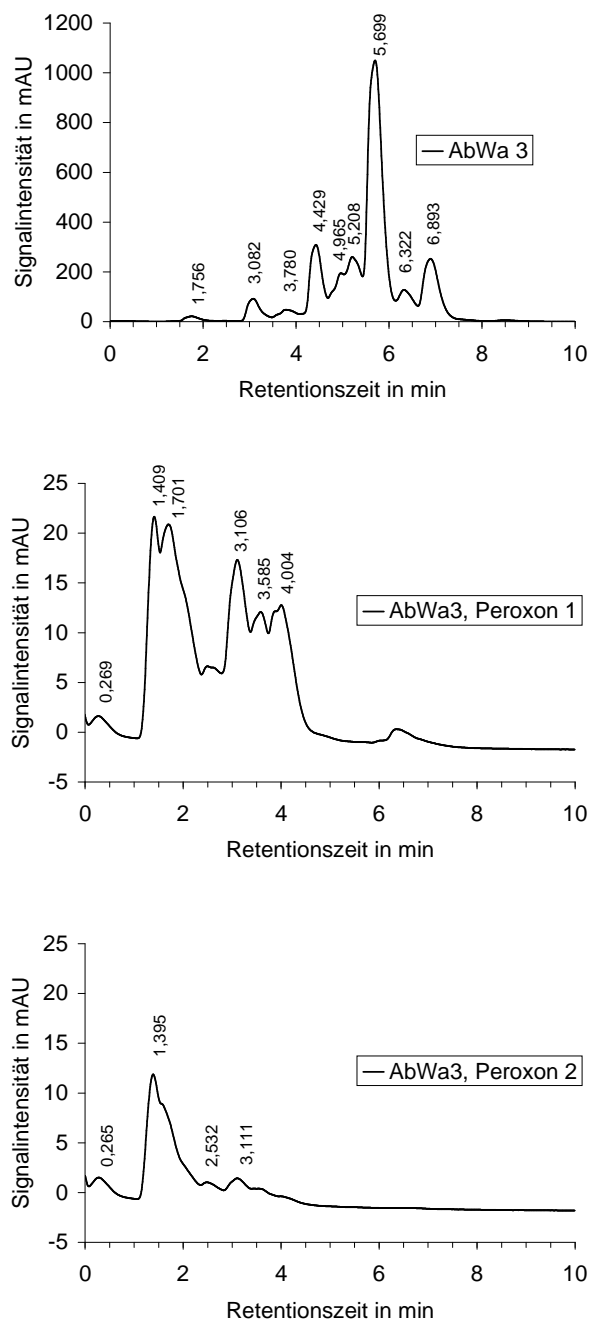


Abbildung 4.11: *High performance liquid chromatography* (HPLC, ODS Hypersil) von AbWa3 vor und nach Peroxon 1 und 2-Oxidation. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen. Detektion DAD350.

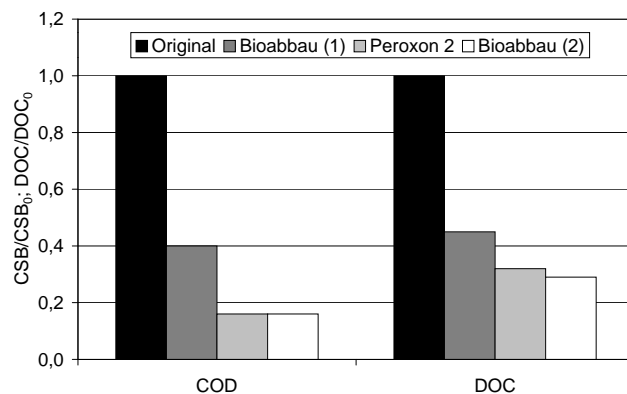


Abbildung 4.12: Verringerung des CSB und des DOC von AbWa3 bei veränderter Verfahrensführung: biologischer Abbau (1), Oxidation mit Peroxon 2, biologischer Abbau (2).

## 4.4 Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 4

Abwasser 4 (AbWa4) stammte aus dem AbWa3 entsprechenden Syntheseschritt des optischen Aufhellers 4,4-Bis[(4-anilino-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)amino]stilben-2,2-disulfonat (Tinopal DMS, s. Abschnitt 3.5.1). In ersten Versuchen mit AbWa4 zeigte sich, dass der Einsatz von Ozon zu intensiver Schaumbildung führte, weshalb nur stark verdünnte Proben mit Ozon behandelt werden konnten. Für diese Experimente wurde das Abwasser 1:25 verdünnt, weiterhin wurde der Gasvolumenstrom in der Begasungseinheit auf 20 L/h reduziert. Für die Verfahren ohne Begasung betrug die Verdünnung 1:2 (s. auch Abschnitt 3.5.1). Weitere Schwierigkeiten bei AbWa4 entstanden bei pH-Wert-Verschiebungen, da dabei Ausfällungen auftraten, die insbesondere die DOC-Messung sowie die Durchführung von Oxidationsexperimenten bei niedrigen pH-Werten erschwerten. Ebenso zeigte die spektrale Absorption eine starke pH-Wert-Abhängigkeit.

### 4.4.1 Oxidation von Abwasser 4

Das Abwasser 4 war nur zu einem geringen Teil biologisch abbaubar ( $BSB/CSB = 0,12$  (1:2) bzw.  $0,11$  (1:25)). Bei den Oxidationsexperimenten zeigte sich, dass die  $H_2O_2/UV$ -Prozesse nur eine unzureichende Oxidationswirkung besaßen. Weiterhin war zu beobachten, dass das Peroxon-Verfahren einen weitaus höheren Abbau der organischen Abwasserinhaltsstoffe bewirkte als die Ozonung mit ( $O_3/UV$ ) und oh-



Tabelle 4.4: Oxidation von Abwasser 4. Ausbeutekoeffizient  $K_A$  als  $\Sigma$  Oxidationsmittelmenge/ $\Delta$  CSB in  $g/g$  sowie erzielt BSB/CSB-Verhältnis nach Oxidation. Erzielter Gesamtabbau der Fracht anhand des Summenparameters CSB, angegeben als Verhältnis  $\rho/\rho_0$  des Endwertes ( $\rho$ ) nach chemisch-biologischer Behandlung zum Ausgangswert ( $\rho_0$ ) des unbehandelten Abwassers, fehlende Werte: keine BSB-Bestimmung durchgeführt.

Verfahren	$K_A$	BSB/CSB	CSB
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (15 W), pH 7 (1:2)	2,54	0,12	0,61
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (150 W), pH 7 (1:2)	1,23	0,12	0,51
O <sub>3</sub> /UV (150 W), pH 9 (1:25)	3,03	0,39	0,49
Peroxon 2, pH 8,5 (1:25)	1,16	0,52	0,30
P.F. UV 150 W/O <sub>3</sub> (1/20), pH 3 (1:25)	1,62	0,63	0,15
Ozonung 2, pH 9 (1:25)	4,19		

ne zusätzliche UV-Bestrahlung (Ozonung 2, molares Verhältnis Ozon:DOC = 1:1). Sowohl Peroxon 2 als auch der P.F./O<sub>3</sub>-Prozess erreichten eine CSB-Verringerung von ca. 70%, im letzten Fall nach Bioabbau von ca. 85% (s. Tabelle 4.4 und Abbildung 4.13). Vergleicht man die Daten aus Tabelle 4.4 und Abbildung 4.13, so ergeben sich deutliche Differenzen zwischen den gemessenen CSB-Werten nach Oxidation bzw. Bioabbau und den BSB/CSB-Verhältnissen (v.a. bei Peroxon 2). Dies deutete darauf hin, dass auch die CSB-Bestimmung bei Abwa4 fehleranfällig war (Probleme durch Ausfällungen). Es zeigte sich dennoch, dass die Verfahren Peroxon und Photo-Fenton mit zusätzlicher Ozondosierung vielversprechende Oxidationsverfahren für AbWa4 waren.

Bei der Messung der Toxizität fiel auf, dass bei den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV-Prozessen, ähnlich wie bei AbWa3, hohe Restkonzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erhöhte Toxizitätswerte lieferten, die nach Entfernung des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit Mn<sup>2+</sup> auf Werte des unbehandelten Abwassers sanken. Während nach O<sub>3</sub>/UV-Behandlung die Toxizität deutlich erhöht war, konnte mit Peroxon 2 eine teilweise und mit dem P.F./O<sub>3</sub>-Verfahren eine vollständige Detoxifizierung erreicht werden (s. Abbildung 4.14).

#### 4.4.2 Absorptionsverhalten und Einzelstoffanalytik

Anhand der Absorptionsspektren konnte festgestellt werden, dass das Absorptionsverhalten von AbWa4 im UV-Bereich stark vom pH-Wert abhing (s. Abbildung 4.15). Vergleicht man die Absorptionsspektren zu Beginn der Oxidationsexperimen-

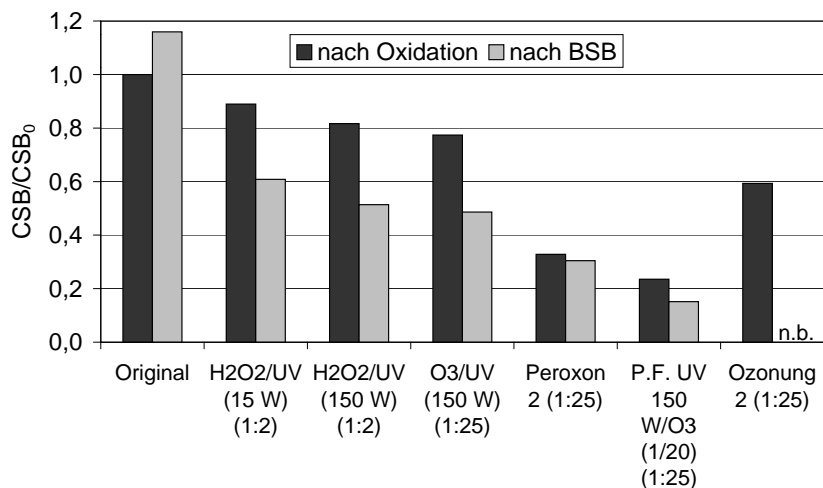


Abbildung 4.13: Verringerung des CSB bei Abwasser 4 nach chemischer Oxidation und biologischem Abbau (BSB, 1:5 für  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ -Prozesse, sonst unverdünnt). n.b. = nicht bestimmt.

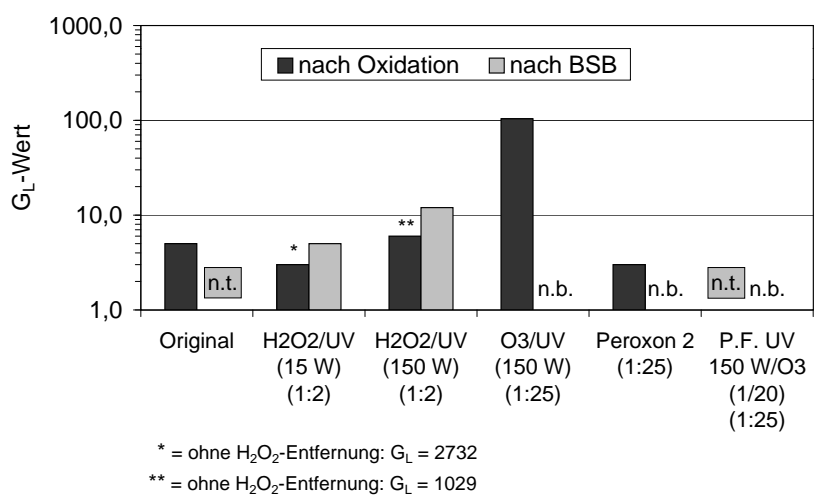


Abbildung 4.14: Änderung der Toxizität von Abwasser 4 nach chemischer Oxidation und biologischem Abbau (BSB, 1:5 für  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{UV}$ -Prozesse). n.b. = nicht bestimmt, n.t. = nicht toxisch.

te von Peroxon 2 bei einem pH-Wert von 8,5 mit dem Photo-Fenton-Prozess bei einem pH-Wert von 3, so fällt auf, dass die Absorptionsbande bei  $\lambda_{max} = 345$  nm zu  $\lambda_{max} = 370$  nm verschoben wurde. Weiterhin verschwand die Absorptionsbande bei  $\lambda_{max} = 230$  nm fast vollständig. Dies deutete auf das unterschiedliche Absorptionsverhalten der protonierten und deprotonierten Form von optischen Aufhellern auf Stilbenbasis hin [85]. Vergleicht man das Absorptionsspektrum von AbWa4 mit dem des optischen Aufhellers Tinopal DMS (s. Abbildung 4.15), so kann das Absorptionsverhalten des Abwassers fast vollständig dem optischen Aufheller zugeschrieben werden. Im Verlaufe der Oxidationen bei pH 8,5 und 9 (am Beispiel von Peroxon 2 in Abbildung 4.15, entsprechend bei Ozonung 2) verschob sich die Absorptionsbande von  $\lambda_{max} = 345$  nm zu niedrigeren Wellenlängen. Dieser Effekt trat auch bei der Oxidation des optischen Aufhellers auf. Dies wurde vermutlich durch die Isomerisierung und den Abbau der Stilbengruppen verursacht [82, 84, 86].

Während das Absorptionsverhalten von AbWa4 dem Syntheseprodukt Tinopal DMS zugeschrieben werden konnte, zeigte sich bei der Einzelstoffanalyse mit Hilfe der HPLC, dass der optische Aufheller zwar identifiziert werden konnte (Retentionszeit AbWa4, unbehandelt: 8,189 min), jedoch noch eine Vielzahl weiterer Substanzen im Abwasser vorlagen (s. Abbildungen 4.16). Somit war anzunehmen, dass die Hauptinhaltsstoffe aufgrund des Absorptionsverhaltens des Abwassers Stilben-ähnliche Verbindungen waren, die jedoch im Vergleich zum optischen Aufheller eine unterschiedliche Polarität besaßen. Dies konnte dadurch bestätigt werden, dass bei der Fluoreszenzanalyse der HPLC-Peaks keine Fluoreszenz-aktive Fraktion neben Tinopal DMS gefunden werden konnte. Neben dem optischen Aufheller konnten auch bestimmte Oxidationsprodukte in den Abwasserproben gefunden werden (Retentionszeiten Tinopal DMS, Peroxon 1: 7,704 min, 3,964 min, 1,368 min, s. Abbildung 4.17). Bei der Peakanalyse der weiteren Fraktionen zeigte sich, dass hier Überlagerungen mehrerer Substanzen keine eindeutige Zuordnung zuließen.

### 4.4.3 Zusammenfassung: Behandlung Abwasser 4

Als Konsequenz für die oxidative Behandlung von AbWa4 lässt sich ableiten, dass diese problematisch war, da der Einsatz von Ozon aufgrund der Schaumbildung begrenzt war, eine Verdünnung des Abwassers für industrielle Anwendungen aber nicht sinnvoll ist. Alternativ könnten Reaktoren eingesetzt werden, die Ozon z.B. mit Hilfe von Keramik-Membranen [90] ins Abwasser eintragen. Ungeachtet der Problematik der fehlerbehafteten Analyse der Summenparameter konnte wiederum der Peroxon-Prozess als effektives Oxidationsverfahren angesehen werden, der Aus-

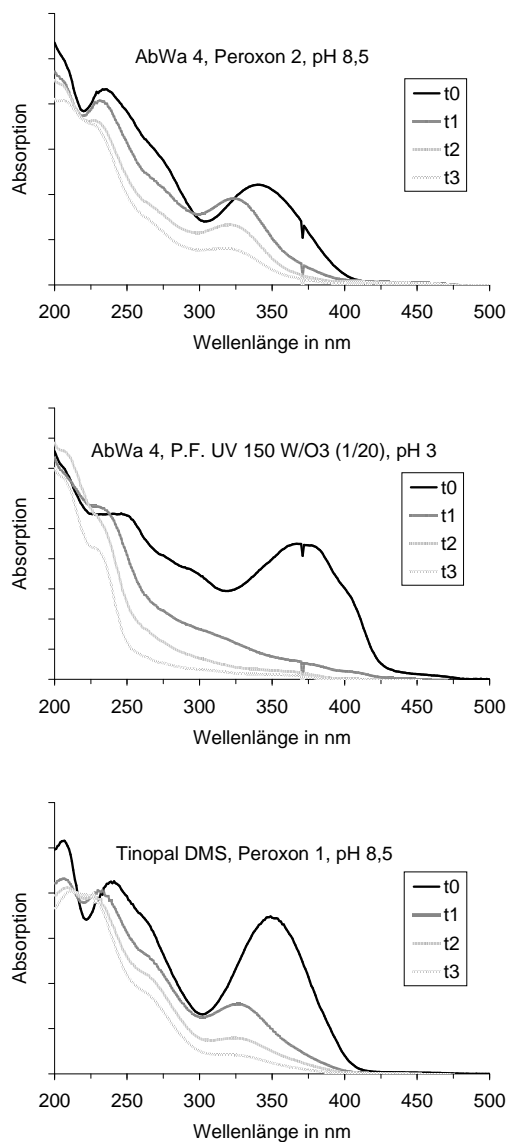


Abbildung 4.15: Absorptionsspektren für Abwasser 4 bei verschiedenen pH-Werten sowie im Verlauf der chemischen Oxidation, Vergleich mit der Reinsubstanz Tinopal DMS,  $t_0$ - $t_3$  stehen für verschiedene Probenahmezeitpunkte während des Oxidationsprozesses.

beutekoeffizient war mit 1,16 g/g verglichen mit der entsprechenden Oxidation der Abwässer 1, 2 und 3 verbessert. Zwar wurde der optische Aufheller Tinopal DMS

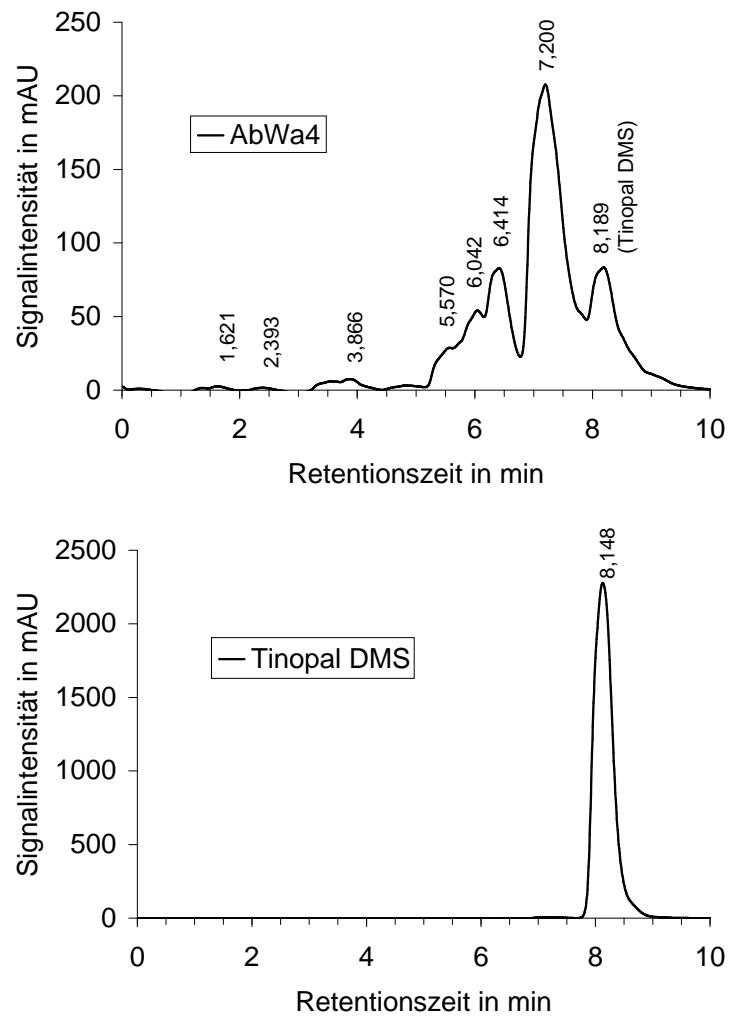


Abbildung 4.16: *High performance liquid chromatography* (HPLC, ODS Hypersil) von AbWa4 und Tinopal DMS vor Oxidation. Detektion DAD350.

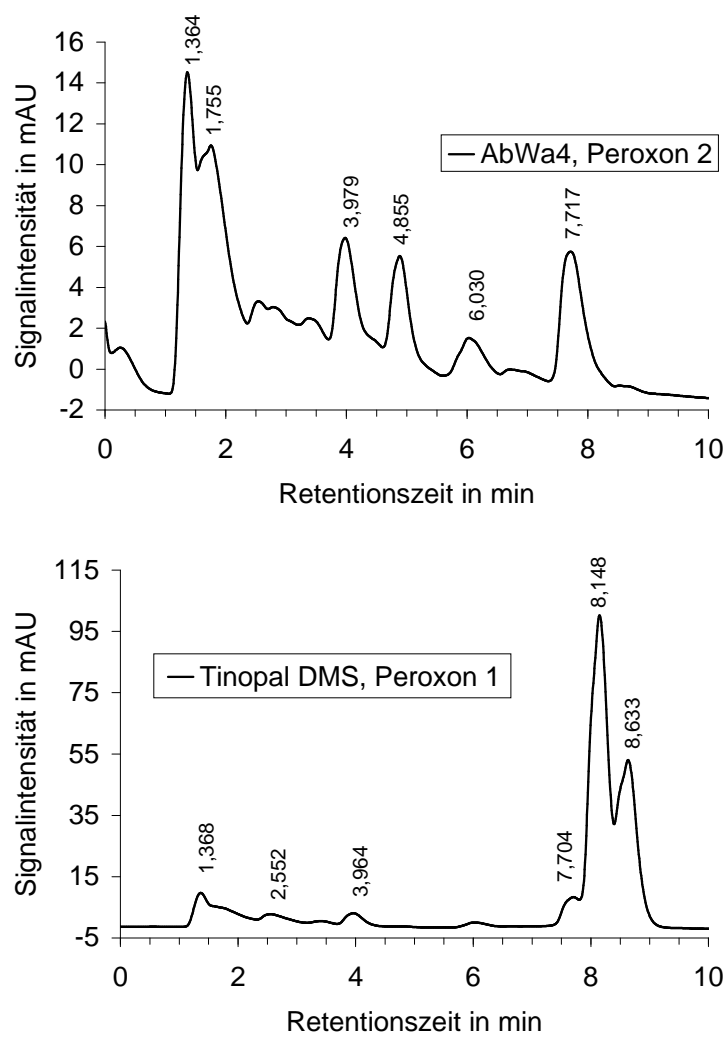


Abbildung 4.17: *High performance liquid chromatography* (HPLC, ODS Hyper-sil) von AbWa4 nach Peroxon 2-Oxidation und Tinopal DMS nach Peroxon 1-Oxidation. Detektion DAD350.

als ein Inhaltsstoff von AbWa4 identifiziert, eine detaillierte Verfolgung der Abbauvorgänge war aber durch die Abwassermatrix erschwert. Somit zeigte sich, dass eine gezielte Verfolgung einer einzelnen Substanz im Mischabwasser nur dann sinnvoll ist, wenn diese von besonderem Interesse (hohe Konzentration, hohe Toxizität, refraktärer Charakter) ist und sich vom Rest der Inhaltsstoffe in diesen Eigenschaften unterscheidet.

## 4.5 Chemisch-biologische Behandlung von Abwasser 5

Abwasser 5 (AbWa5) stammte aus dem ersten Produktionsschritt des Vitamin B6, der Synthese des Propyldioxepens aus Butendiol und Butyraldehyd (s. Abschnitt 3.5.1). Es unterschied sich von den anderen bisher betrachteten Abwässern darin, dass die Zusammensetzung weniger komplex war. Neben den Oxidationsversuchen mit der Abwasserprobe (Ozonung, Peroxon,  $\text{H}_2\text{O}_2$ /UV-Oxidation) wurden deswegen auch Vergleichsexperimente mit den Einzelsubstanzen Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepen (PD) durchgeführt (s. Tabelle 3.16). Der BSB der Proben (unverdünnt und nach 1:10-Verdünnung) wurde teilweise über einen Zeitraum von 47 Tagen (Erreichen der Plateauphase) und teilweise über einen Zeitraum von 28 Tagen gemessen. Weiterhin diente AbWa5 in unbehandeltem Zustand sowie nach Ozonung (AbWa5 ozont) als Modellabwasser für umfangreiche Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit in kontinuierlich betriebenen Festbettreaktoren. Neben der Betrachtung des Abbaus der Substanzen wurden die Effekte des Abwassers auf die bakterielle Biozönose, d.h. deren Populationszusammensetzung und Aktivität im Festbettreaktor, untersucht (s. Abschnitte 4.7 und 4.9).

### 4.5.1 Oxidation von Abwasser 5

Das unbehandelte Abwasser 5 besaß eine niedrige biologische Abbaubarkeit mit einem Verhältnis von  $\text{BSB}_{47}/\text{CSB}$  von 0,18 (1:10-Verdünnung). Die Toxizität des Abwassers war mit einem  $G_L$ -Wert von 24 relativ niedrig und verschwand nach der biologischen Behandlung. Demgegenüber wurden durch alle Oxidationsverfahren höhere Toxizitätswerte erzeugt und das  $\text{BSB}/\text{CSB}$ -Verhältnis verschlechterte sich weiter (s. Tabelle 4.5).

Die Extinktion von AbWa5 im UV-Bereich war mit einem  $\text{SAK}_{254}$  von  $9,7 \text{ m}^{-1}$  relativ gering. Sie stieg nach Oxidation an (s. auch Anhang, Tabelle D.6), was teilweise auf nicht abreagiertes oder im Falle der  $\text{O}_3/\text{UV}$  (15 W)-Oxidation während des Prozesses entstandenes  $\text{H}_2\text{O}_2$  zurückgeführt werden konnte. Da der  $\text{SAK}_{254}$  jedoch auch nach biologischer Behandlung gegenüber dem Originalabwasser erhöht war (s. Tabelle 4.5), war zusätzlich von der Bildung UV-absorbierender Substanzen bei der

Tabelle 4.5: Oxidation von Abwasser 5. Ausbeutekoeffizient  $K_A$  als  $\Sigma$  Oxidationsmittelmenge/ $\Delta$  CSB in  $g/g$  sowie erzieltes BSB/CSB-Verhältnis nach Oxidation. Erzielter Gesamtabbau der Fracht anhand der Summenparameter CSB, DOC, SAK<sub>254</sub> sowie der Toxizität ( $G_L$ -Wert), angegeben als Verhältnis  $\rho/\rho_0$  des Endwertes ( $\rho$ ) nach chemisch-biologischer Behandlung zum Ausgangswert ( $\rho_0$ ) des unbehandelten Abwassers. n.b. = nicht bestimmt.

Verfahren	$K_A$	BSB/CSB	CSB	DOC	SAK <sub>254</sub>	$G_L$
Ozonung, pH 9	1,82	0,05 (47 d)	0,65	1,07	1,86	3,2
O <sub>3</sub> /UV (15 W), pH 9	1,15	0,02 (28 d)	0,66	0,98	4,15	79
O <sub>3</sub> /UV (150 W), pH 9	0,72	0,10 (28 d)	0,58	0,76	3,71	1,9
Peroxon, pH 8,5	1,74	0,04 (28 d)	0,68	0,93	4,76	89
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (15 W), pH 7	4,71	0,07 (47 d)	0,86	n.b.	5,77	>5,3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (150 W), pH 7	2,04	0,04 (47 d)	0,84	n.b.	7,42	>5,3

biologischen Stufe auszugehen. In Frage kommen dabei extrazelluläre Biopolymere, die von Mikroorganismen abgegeben werden, oder Zellbruchstücke, die durch das Inokulum oder die Lysis von Zellen in das Abwasser gelangen [254]. Im Falle der O<sub>3</sub>/UV (150 W)- und der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV (150 W)-Oxidation waren zusätzlich im Oxidationsprozess UV-absorbierende Substanzen entstanden, denn der Anstieg im SAK<sub>254</sub> konnte nicht allein durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> erklärt werden.

In Abbildung 4.18 ist der Verlauf der CSB-Verringerung sowie der Toxizität nach Oxidation und biologischem Abbau dargestellt. Das O<sub>3</sub>/UV (150 W)-Verfahren ergab sowohl die höchste Gesamtelimination an CSB als auch die niedrigste Erhöhung der Toxizität. Gegenüber der reinen Ozonung war der Unterschied jedoch gering, so dass für die weiteren Untersuchungen der Schwerpunkt auf die ozonten Abwasserproben gelegt wurde.

#### 4.5.2 Einzelstoffanalytik bei Abwasser 5

Die Analytik der Einzelsubstanzen lieferte ein ähnliches Bild der Oxidationsleistung der einzelnen Prozesse. Ein vollständiger Abbau von Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepen (PD) wurde mit der Ozonung sowie der O<sub>3</sub>/UV (150 W)-Oxidation erreicht (s. Abbildung 4.19). In allen anderen Fällen wurde BA in Restkonzentrationen zwischen ca. 10 und 60% gefunden. Beim H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV (15 W)-Verfahren war zudem ein ungenügender Abbau der anderen Substanzen mit Rest-



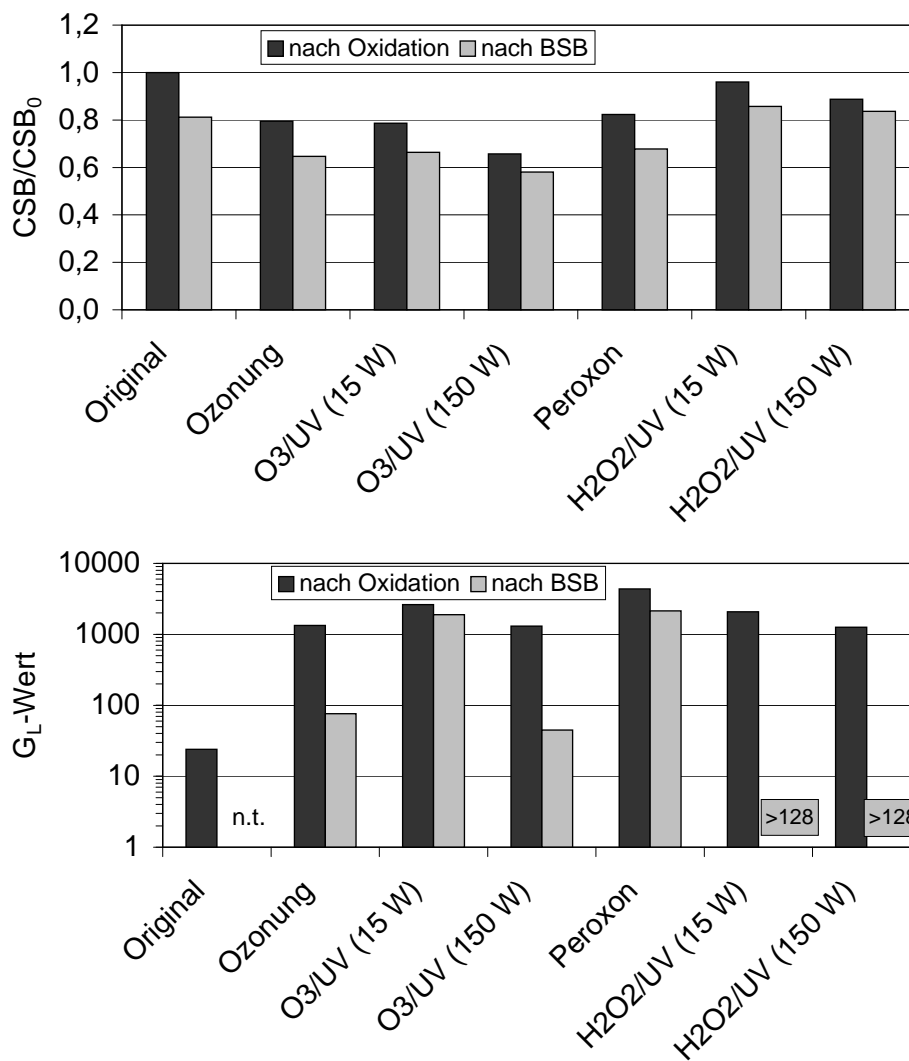


Abbildung 4.18: Verringerung des CSB und Änderung der Toxizität bei Abwasser 5 nach chemischer Oxidation und biologischem Abbau (BSB 1:10).

konzentrationen an BD von ca. 30% und PD von ca. 75% zu verzeichnen.

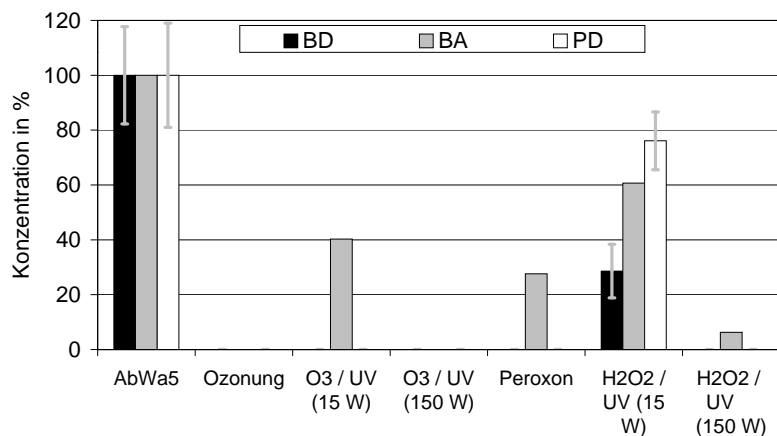


Abbildung 4.19: Abbau der Einzelsubstanzen Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepen (PD) bei der Oxidation von Abwasser 5. Fehlerbalken aus Doppelbestimmung, siehe Tabelle D.7 im Anhang.

### 4.5.3 Oxidation der Einzelsubstanzen

Vergleicht man die Ergebnisse der Oxidation von AbWa5 mit der Oxidation der Einzelsubstanzen, so ist auch hier zu erkennen, dass Butyraldehyd sowohl bei der Ozonung bei einem pH-Wert von 3,0 als auch im Peroxonverfahren (pH 8,5) nur langsam abgebaut wurde. Während die Substanzen Butendiol und Propyldioxepen schon nach einem Oxidationsmitteleintrag von 25 bis 50 % vollständig abgebaut waren (entsprechend einem molaren Ozon:DOC-Verhältnis von 0,06 bis 0,13), trat dies bei BA im Falle des Peroxon-Verfahrens erst bei 100% Oxidationsmitteleintrag ein (s. Abbildung 4.20). Werden diese Ergebnisse mit dem Abbau des DOC verglichen, so zeigt sich, dass BA zwar langsamer abgebaut, dafür aber zu einem größeren Teil mineralisiert wurde. Betrachtet man die Restkonzentrationen des DOC nach BSB<sub>28</sub>, so erkennt man, dass BA zu knapp 50% abgebaut wurde, die Oxidationsprodukte jedoch nur eine geringe biologische Abbaubarkeit aufwiesen, so dass der Rest-DOC-Gehalt nur unwesentlich niedriger als bei rein biologischer Behandlung war. Entsprechend verhielten sich die Substanzen BD und PD, nur war der Gesamtabbau geringer. Diese Substanzen waren also biologisch schlechter abbaubar, chemisch leicht zu oxidieren, jedoch schwer zu mineralisieren. Auch die Oxidationsprodukte sind als biologisch schlecht abbaubar einzustufen.

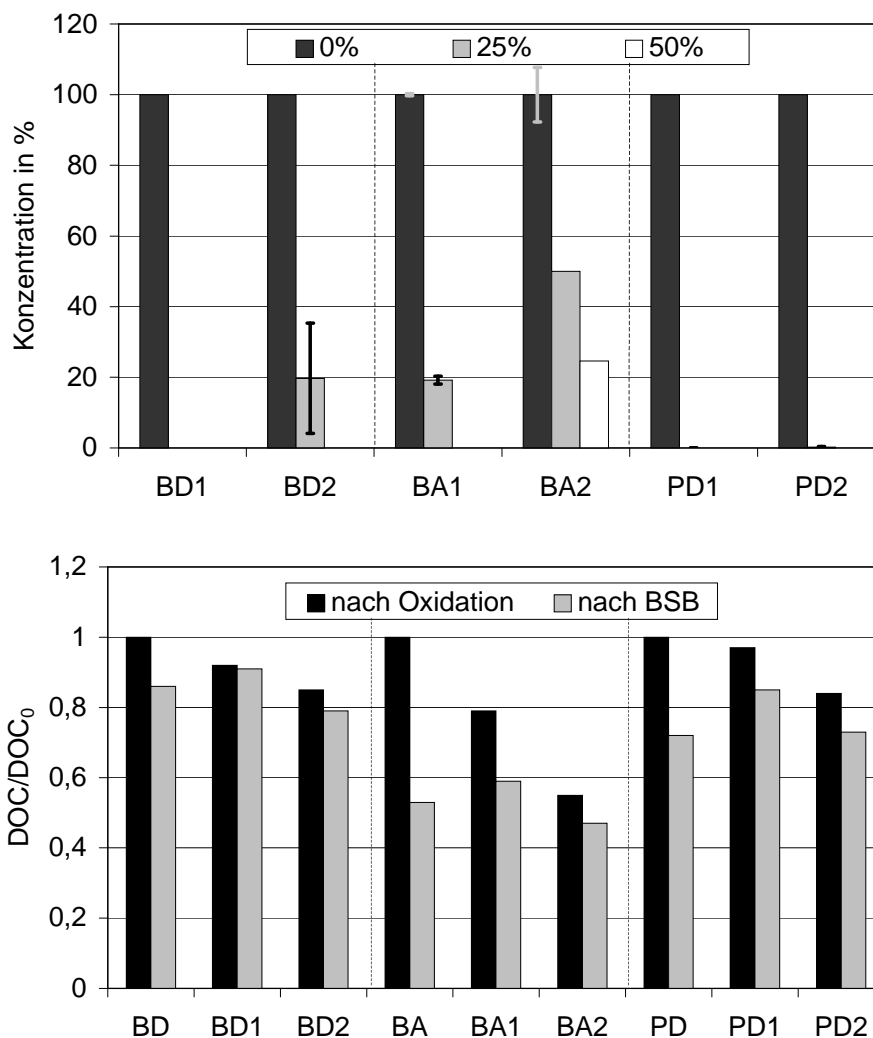


Abbildung 4.20: Oben: Abbau der Einzelsubstanzen Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepin (PD) durch Ozonung bei pH 3,0 (Index1) und durch Peroxon-Oxidation bei pH 8,5 (Index2) bei verschiedenem Oxidationsmitteleintrag. Bei 100 % Eintrag vollständiger Abbau aller drei Substanzen. Unten: DOC-Abbau nach Oxidation der Einzelsubstanzen sowie nach BSB<sub>28</sub>, ohne Index: nur biologischer Abbau. Fehlerbalken aus Doppelbestimmung, s. Tabelle D.8 im Anhang.

#### 4.5.3.1 Toxizitätsverhalten

Ein Grund für die mangelnde biologische Abbaubarkeit der Oxidationsprodukte aller drei Einzelsubstanzen war vermutlich die gestiegene Toxizität nach Oxidation der Substanzen. Während Butendiol in der eingesetzten Ausgangskonzentration (1 g/L) keine Hemmung im Leuchtbakterienhemmtest hervorrief, wiesen die Oxidationsprodukte einen  $G_L$ -Wert von 36 (BD1) bzw. 26 (BD2) auf (s. Abbildung 4.21). Die Restkonzentration an  $H_2O_2$  belief sich in diesen Proben auf 176 mg/L bzw. 198 mg/L und wurde vor der Toxizitätsmessung entfernt. Auch bei PD wurde restliches  $H_2O_2$  (166 mg/L bei PD1, 107 mg/L bei PD2) entfernt. Die Oxidationsprodukte zeigten ebenfalls eine deutlich erhöhte Toxizität, die jedoch zu einem großen Teil durch die biologische Stufe entfernt werden konnte. Bei BA wurden die Restkonzentration an  $H_2O_2$  nicht entfernt, sie lag bei 30,9 mg/L (BA1) und 15,9 mg/L (BA2). Im Toxizitätstest mit  $H_2O_2$  zeigte sich jedoch, dass bereits eine  $H_2O_2$ -Konzentration von 1 mg/L eine 20 %-ige Hemmung verursachte. Somit müssten die  $G_L$ -Werte (Verdünnungsstufe mit Hemmung  $< 20$  %) ohne  $H_2O_2$ -Entfernung durch die Konzentration an  $H_2O_2$  (in mg/L) dividiert werden, um den  $G_L$ -Wert der Oxidationsprodukte zu erhalten. In diesem Fall ergab sich für BA1 ein  $G_L$ -Wert von 70 und für BA2 von 3. Somit bestätigte sich, dass BA bzw. dessen Oxidationsprodukte nur in geringem Umfang zur Toxizität der Abwasserprobe beitrug. Für diese Rechnung wird jedoch angenommen, dass keine kumulativen toxischen Effekte auftreten.

#### 4.5.4 Gelchromatographische Untersuchungen

Zusätzlich zur Analytik der Ausgangssubstanzen Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepen (PD) wurden gelchromatographische Untersuchungen (LC-DOC) der Reaktionsprodukte und von Abwasser 5 durchgeführt. Einerseits, da keine Identifizierung der Oxidationsprodukte erfolgte, andererseits, um zu untersuchen, inwieweit das Verhalten von Abwasser 5 bei Oxidation durch die Hauptkomponenten bestimmt wird. Wie sich anhand der gelchromatographischen Auftrennung von Abwasser 5 zeigte, konnte das Abwasser gut durch seine drei Hauptkomponenten dargestellt werden (s. Abbildung 4.22).

Durch Superposition der Chromatogramme der Einzelsubstanzen (s. Abbildung 4.22 links oben) erhält man ein Chromatogramm, das dem von Abwasser 5 ähnlich ist (s. Abbildung 4.22 rechts oben). Weiterhin zeigte sich, dass die entstandenen Oxidationsprodukte bei der Ozonung und beim Peroxon-Verfahren ein sehr ähnliches Fraktionsmuster im LC-DOC-Chromatogramm ergaben (s. Abbildung 4.22 links unten). Das Signal für PD bei einer Retentionszeit von ca. 140 min verschwand, während sich drei Fraktionen im Bereich von Retentionszeiten zwischen 40 und 70 min bildeten (Maxima bei ca. 47 min, 58 min und 69 min). Dass diese Fraktionen nach Ozonung und Peroxon-Oxidation unterschiedliche Substanzen beinhalteten, war je-

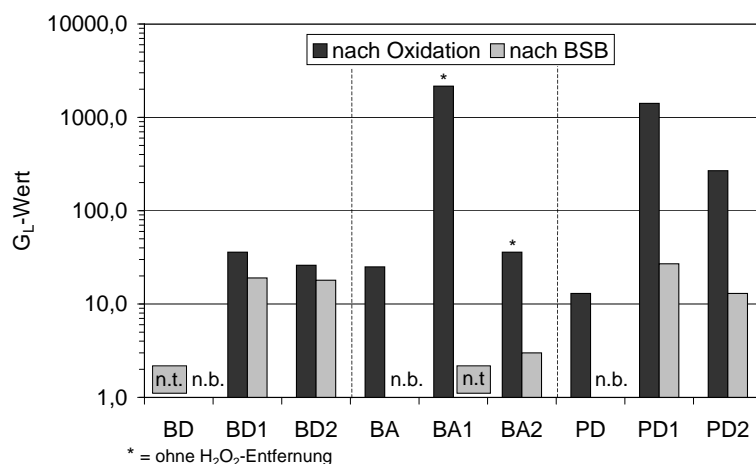


Abbildung 4.21: Toxizität der Einzelsubstanzen Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepin (PD) unbehandelt und nach Ozonung bei pH 3,0 (Index1) und Peroxon-Oxidation bei pH 8,5 (Index2) sowie nach BSB<sub>28</sub>. Ohne Index: nur biologischer Abbau. n.b. = nicht bestimmt, n.t. = nicht toxisch.

doch nicht auszuschließen, da auch Butendiol bei 69 min eluierte, in den oxidierten Proben aber nicht gefunden werden konnte (vergl. Abbildung 4.20). Weiterhin zeigte auch PD neben dem Hauptsignal bei 140 min ein weiteres Signal bei 69 min, so dass hier eine eindeutige Zuordnung nicht möglich war. BA zeigte nur ein diffuses Signal im Bereich von Retentionszeiten zwischen 45 und 90 min. Da BA in einer Reinheit >99 % und PD mit einer Reinheit von 97 % (Analyseangabe Hoffmann-La Roche) eingesetzt wurden, konnten Verunreinigungen der Substanzen nicht der Grund für diese Fraktionierung sein. Hier war von starken Wechselwirkungen der Substanzen mit dem Säulenmaterial auszugehen. Weiterhin betrug die Wiederfindung an DOC im Chromatogramm (chromatographierbarer Anteil des DOC) bei BA und PD nur 51 bzw. 55 %, was durch die flüchtigen Eigenschaften der Stoffe erklärbar ist. Ein Teil der Substanzen wurde so bei der Entfernung des anorganischen Kohlenstoffs (IC) aus der Probe ausgeblasen. Bei der Messung der DOC-Absolutwerte wurde deswegen auf eine Entgasung verzichtet und der IC getrennt gemessen (s. Abbildung 4.20). Die Fraktionsverteilung der Summe der Einzelsubstanzen nach Peroxon-Oxidation entsprach wiederum der des oxidierten Abwassers (s. Abbildung 4.22 rechts unten). Da die Oxidation der Substanzen getrennt erfolgte und nur die Chromatogramme zusammengelegt wurden, kann daraus gefolgert werden, dass bei der Oxidation von AbWa5 keine oder nur geringe Wechselwirkungen zwischen den Einzelsubstanzen

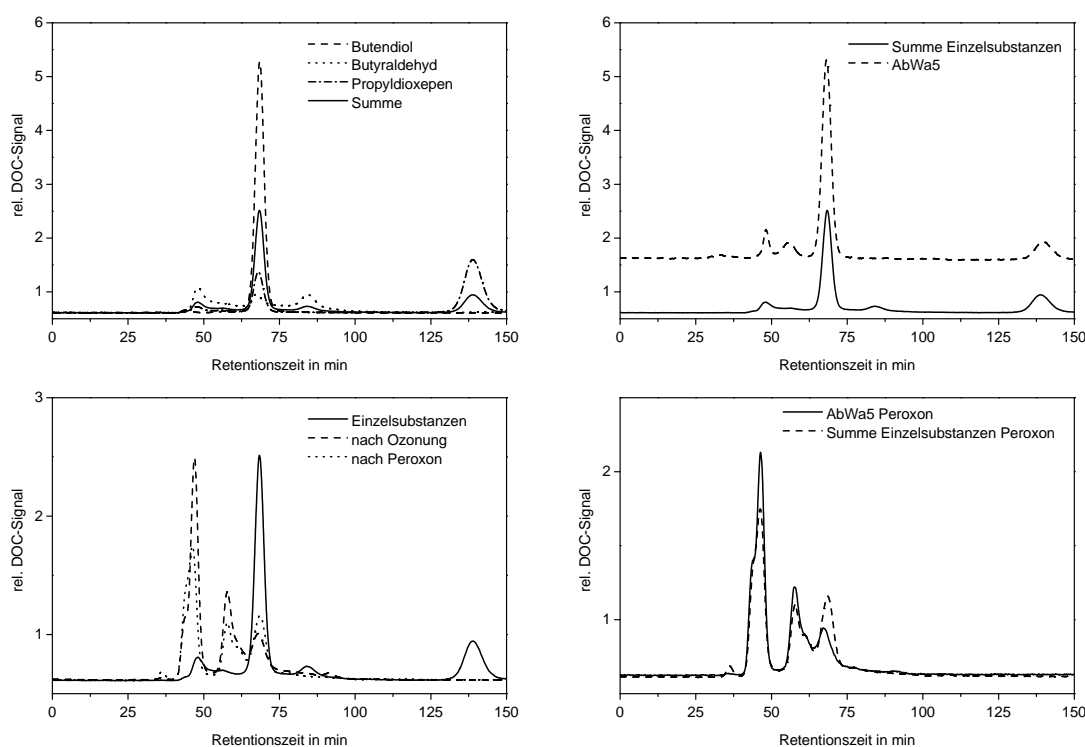


Abbildung 4.22: Gelchromatographische Untersuchung (LC-DOC, TSK HW 40S) von AbWa5 und seinen Einzelsubstanzen. Links oben: Einzelsubstanzen sowie Superposition der Chromatogramme. Rechts oben: Vergleich der Chromatogramme von AbWa5 mit Superposition der Chromatogramme der Einzelsubstanzen. Links unten: Superposition der Chromatogramme der Einzelsubstanzen nach Ozonung und Peroxon-Oxidation. Rechts unten: Vergleich der Chromatogramme von AbWa5 nach Peroxon-Oxidation mit Superposition der Chromatogramme der Einzelsubstanzen nach Peroxon-Oxidation.

oder den Oxidationsprodukten vorhanden waren. Somit können bestimmte Effekte wie die schlechte biologische Abbaubarkeit oder das Toxizitätsverhalten von AbWa5 einer einzelnen Substanz zugeschrieben werden. Wie in Abbildung 4.20 gezeigt, waren v.a. die Substanzen BD und PD bzw. deren Oxidationsprodukte für eine schlechte biologische Abbaubarkeit des Abwassers verantwortlich. Demgegenüber konnte bei der Beurteilung der Toxizität keine eindeutige Zuweisung erfolgen, da durch die Oxidation aller drei Substanzen eine Erhöhung der Toxizität eintrat. Es zeigte sich aber auch hier, dass BA einen geringeren Einfluss auf die Toxizität hatte, da im Gegensatz zu BD und PD bei BA1 und BA2 eine vollständige bzw. fast vollständige Detoxifizierung im biologischen Abbau erzielt wurde.

#### 4.5.5 Biologischer Abbau Abwasser 5

Für einen effektiven Bioabbau mussten die oxidierten Abwasserproben stärker verdünnt werden (Tabelle 4.6). Während die unverdünnte und die 1:10 verdünnte ozont-Abwasserprobe einen gegenüber dem unbehandelten Abwasser niedrigeren BSB zeigte, wurden erst in einer 1:50-Verdünnung mit einem BSB/CSB-Verhältnis von 0,30 befriedigende Ergebnisse erzielt. Dieses Verhalten könnte mit der erhöhten Toxizität nach Oxidation erklärt werden, weshalb die Probe stärker verdünnt werden musste, um einen biologischen Abbau zu ermöglichen. Ähnliches Verhalten zeigte auch die unbehandelte Probe, nur musste aufgrund der niedrigeren Ausgangstoxizität die Probe weniger stark verdünnt werden.

Tabelle 4.6: BSB-Messung von Abwasser 5 nach Ozonung in verschiedenen Verdünnungen.

Probe	BSB <sub>47</sub> in mg/L	BSB/CSB
AbWa5	136	0,02
AbWa5, 1:10	1420	0,18
AbWa5, ozont	115	0,02
AbWa5, ozont, 1:10	330	0,05
AbWa5, ozont, 1:50	1850	0,30

### 4.5.6 Zusammenfassung: Behandlung Abwasser 5

Bei der Oxidation von Abwasser 5 zeigte es sich, dass die Kenntnis der Einzelsubstanzen vorteilhaft war, um bestimmte Effekte einer Einzelsubstanz zuschreiben zu können. Weiterhin konnte das Verhalten von Abwasser 5 bei der Oxidation anhand vergleichender Experimente mit den Einzelsubstanzen relativ gut beschrieben werden. Die Ozonung erwies sich bei Betrachtung des kombiniert chemisch-biologischen Prozesses als vernünftiges Behandlungsverfahren für Abwasser 5, wenn auch der Gesamtabbau der organischen Belastung im Vergleich zu den anderen in der vorliegenden Arbeit untersuchten Abwässern gering war. Da jedoch die biologische Abbaubarkeit bei stärkerer Verdünnung weiter anstieg, in diesen Konzentrationsbereichen aber immer noch eine gewisse Toxizität im Leuchtbakterienhemmtest vorlag, wurde das Abwasser 5 nach Ozonung für die folgenden Untersuchungen in Biofilmreaktoren eingesetzt. Es sollte damit eine Situation simuliert werden, in der industrielles Abwasser mit den entsprechenden problematischen Eigenschaften (Toxizität, geringe biologische Abbaubarkeit) in eine kommunale Kläranlage eingeleitet wird. Das unbehandelte Abwasser 5, welches als sehr refraktär, aber nur gering toxisch eingestuft werden konnte, sollte als weiteres Modellabwasser für diese Untersuchungen verwendet werden, da es sich in den erwähnten Eigenschaften jeweils vom ozonten Abwasser unterschied. Fragestellung war somit, inwieweit die in Batch-Versuchen ermittelten Effekte auf kontinuierlich arbeitende Abwassersysteme übertragen werden können, da hier die Effekte der Adaptation und des Cometabolismus unter realen Bedingungen (z.B. Verdünnung bei Mischung mit anderen Abwasserteilströmen) eine verstärkte Rolle spielen.

## 4.6 Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit von Abwasser 5 in Biofilmreaktoren

Zur Untersuchung der biologischen Abbaubarkeit in kontinuierlich betriebenen Systemen wurden Festbettbiofilmreaktoren (BFR) eingesetzt (s. Abschnitt 3.3.3). Diese wurden zur Etablierung eines Biofilms für 3 Monate mit einem synthetischen Abwasser (SAW) gefüttert. Danach wurden 2 BFR weiterhin mit SAW als Kontrollreaktoren (BFR 1, BFR 2) betrieben, bei BFR 3 und BFR 4 wurde das ozonten Abwasser 5 (AbWa5 ozont) dem SAW zugesetzt, BFR 5 und BFR 6 wurden nur mit AbWa5 ozont ohne SAW betrieben. Dieser Versuch wurde wiederholt und anstelle des ozonten Abwassers das unbehandelte Abwasser (AbWa5) verwendet. Zusätzlich zum Abbau des DOC wurde mit Hilfe der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung überprüft, ob der Wechsel der C-Quelle eine Veränderung in der Populationszusammensetzung der Bakterien im Biofilm bewirkte (System 1, s. Abschnitt 3.5.4.1).



### 4.6.1 DOC-Abbau in Biofilmreaktoren (System 1)

In den kontinuierlich betriebenen Reaktoren wurde der DOC des ozonten Abwassers zu ca. 30 % eliminiert (s. Abbildung 4.23). Dies entsprach dem Ergebnis aus dem BSB<sub>28</sub>-Versuch (vergl. Tabelle 4.6). Die Adaptationsphase war relativ kurz.

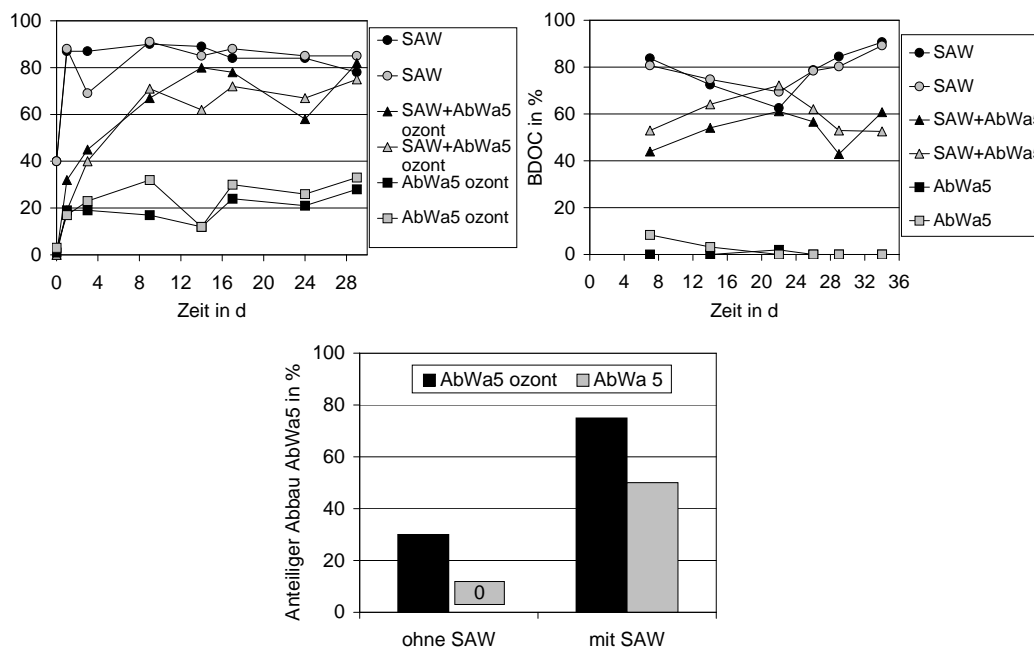


Abbildung 4.23: DOC-Elimination von AbWa5 in Festbettbiofilmreaktoren. Links oben: AbWa5 ozont mit und ohne Zusatz von SAW. Rechts oben: AbWa5 mit und ohne Zusatz von SAW. Unten: Anteiliger Abbau von AbWa5 bzw. AbWa5 ozont mit und ohne Zusatz von SAW.

Bereits nach einer Betriebszeit von 4 Tagen wurden ca. 20 % des DOC eliminiert. In Mischung mit dem synthetischen Abwasser wurde das AbWa5 ozont wesentlich besser abgebaut. Die DOC-Elimination stieg im Verlauf der ersten 12 Tage kontinuierlich an und erreichte Werte von über 80 %. Bei der Reaktorpassage wurde das Abwasser vollständig detoxifiziert (Zulauf AbWa5 ozont 1:50,  $G_L$ -Wert = 19; Ablauf  $G_L$ -Wert <2). Legt man den SAW-Abbau von ca. 85 % in BFR 1 und 2 auch für die Mischung mit AbWa5 ozont zugrunde, so wurde das ozonte Abwasser bei Anwesenheit des SAW zu 75 % abgebaut (s. Abbildung 4.23 unten). Entsprechende Beobachtungen wurden auch für das unbehandelte Abwasser 5 gemacht. Dieses wurde im Gegensatz zur BSB-Messung in den Biofilmreaktoren ohne Zusatz von SAW nicht abgebaut. In Mischung mit SAW wurde der DOC aber zu ca. 60 % eliminiert, was einem anteiligen Abbau von AbWa5 von 50 % entsprach. Dies bedeutete

ebenfalls eine deutliche Verbesserung gegenüber der statischen Untersuchungsmethode bei der BSB-Messung ohne Zusatz biologisch leicht abbaubarer Substanzen. Der Verlauf der DOC-Abbaukurven in den Biofilmreaktor-Experimenten ließ vermuten, dass Adsorptionsprozesse für die DOC-Elimination nur eine untergeordnete Rolle spielten. In diesem Falle wäre zu Beginn der Versuche eine höhere Elimination zu erwarten gewesen, da zu diesem Zeitpunkt Adsorptionsprozesse gegenüber Abbauvorgängen eine wichtigere Rolle spielen.

#### 4.6.1.1 Gelchromatographische Untersuchungen

Anhand der LC-DOC Untersuchung konnte verdeutlicht werden, wie die Adaptation der Mikroorganismen zu einer Verbesserung des Bioabbaus von AbWa5 ozont unter Zugabe von SAW führte (s. Abbildung 4.24). Während nach 3 Tagen Betriebszeit nur ein leichter Um- bzw. Abbau der DOC-Fractionen erfolgte, konnte nach 29 Tagen Betriebszeit eine fast vollständige Elimination der DOC-Fractionen festgestellt werden.

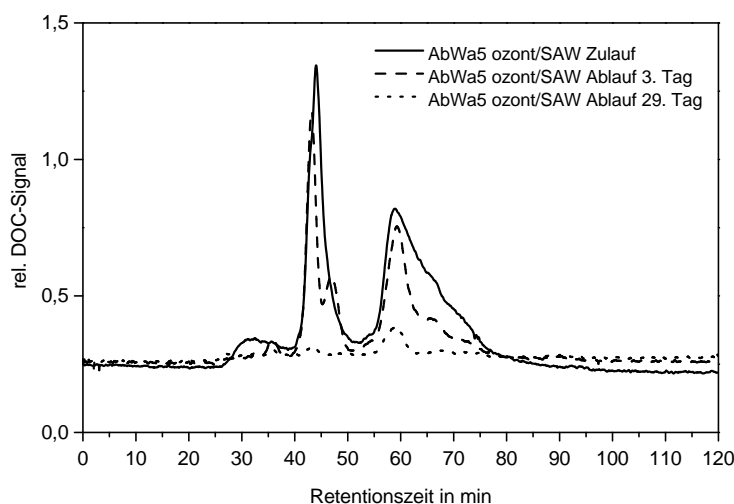


Abbildung 4.24: Gelchromatographische Untersuchung (LC-DOC, TSK HW 40S). Biofilmreaktorversuch von Abwasser 5 nach Ozonung (AbWa5 ozont) in Mischung mit synthetischem Abwasser (SAW). Zulaufprobe sowie Ablaufproben nach 3 und 29 Tagen Betriebszeit.

### 4.6.2 Zusammenfassung Abbauprobungen System 1

Die Ergebnisse aus den Abbauprobungen in Biofilmreaktoren zeigten an, welche Faktoren für einen effektiven Bioabbau von Bedeutung sind:

- Adaptationsphase der Mikroorganismen, Induktionsphase von Abbaumechanismen und Entwicklung von Abbauspezialisten,
- Anwesenheit biologisch leicht eliminierbarer Substanzen und Zusammenspiel unterschiedlicher Bakterienpopulationen: Cometabolismus, Kommensalismus, Synergismus.

Der biologische Abbau von Abwasser 5 nach Ozonung konnte erheblich verbessert werden. Somit ist zu erwarten, dass die Inhaltsstoffe des so vorbehandelten Abwassers auch bei Indirekteinleitung in kommunale Abwassersysteme zu einem Großteil abgebaut werden können. Weiterhin wurde deutlich, dass im Gegensatz zu den BSB-Untersuchungen der biologische Abbau des ozonten Abwassers gegenüber dem unbehandelten Abwasser wesentlich verbessert wurde. Die Oxidationsprodukte nach Ozonung waren somit biologisch besser abbaubar. Im kontinuierlich betriebenen System stellte die erhöhte Toxizität nach Oxidation nach Adaptation der Mikroorganismen kein Problem für einen stabilen Bioabbau dar.

## 4.7 Populationsanalyse System 1

### 4.7.1 Aktivitätsmessung mit CTC

Neben der Charakterisierung der Bakterienpopulation mit der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) wurde die Aktivität der Bakterien mit Hilfe des Vitalfarbstoffes CTC bestimmt (s. Abschnitt 3.4.3). Anhand des Vergleichs des CTC-Signals mit der Gesamtzellzahl (DNA-Farbstoff DAPI) konnte eine Abschätzung getroffen werden, wie hoch der Anteil der aktiven Biomasse war. In Abbildung F.1 im Anhang ist zur Verdeutlichung der Größenverhältnisse der Mikroskopaufnahmen eine Skalierung des verwendeten Objektivs gegeben. Während die Kontrollreaktoren eine gleichmäßige Aktivität über den Versuchszeitraum zeigten, stieg das CTC-Signal in den mit AbWa5 + SAW betriebenen Reaktoren deutlich an (s. Abbildung 4.25). Die prozentuale DOC-Elimination war zwar im Vergleich zu den nur mit SAW betriebenen Kontrollreaktoren etwas geringer, jedoch betrug die zudosierte DOC-Konzentration ungefähr das vierfache. Somit konnte eine gute Übereinstimmung der Bakterienaktivität zu den DOC-Eliminationsraten gefunden werden, so dass wiederum nicht von einer signifikanten DOC-Elimination aufgrund von Adsorptionsvorgängen auszugehen war. Wurde nur das ozonte Abwasser 5 zudosiert, so sank die Aktivität. Zudem wurden zunehmend fädige Strukturen im DAPI-Bild beobachtet. Diese konnten nicht

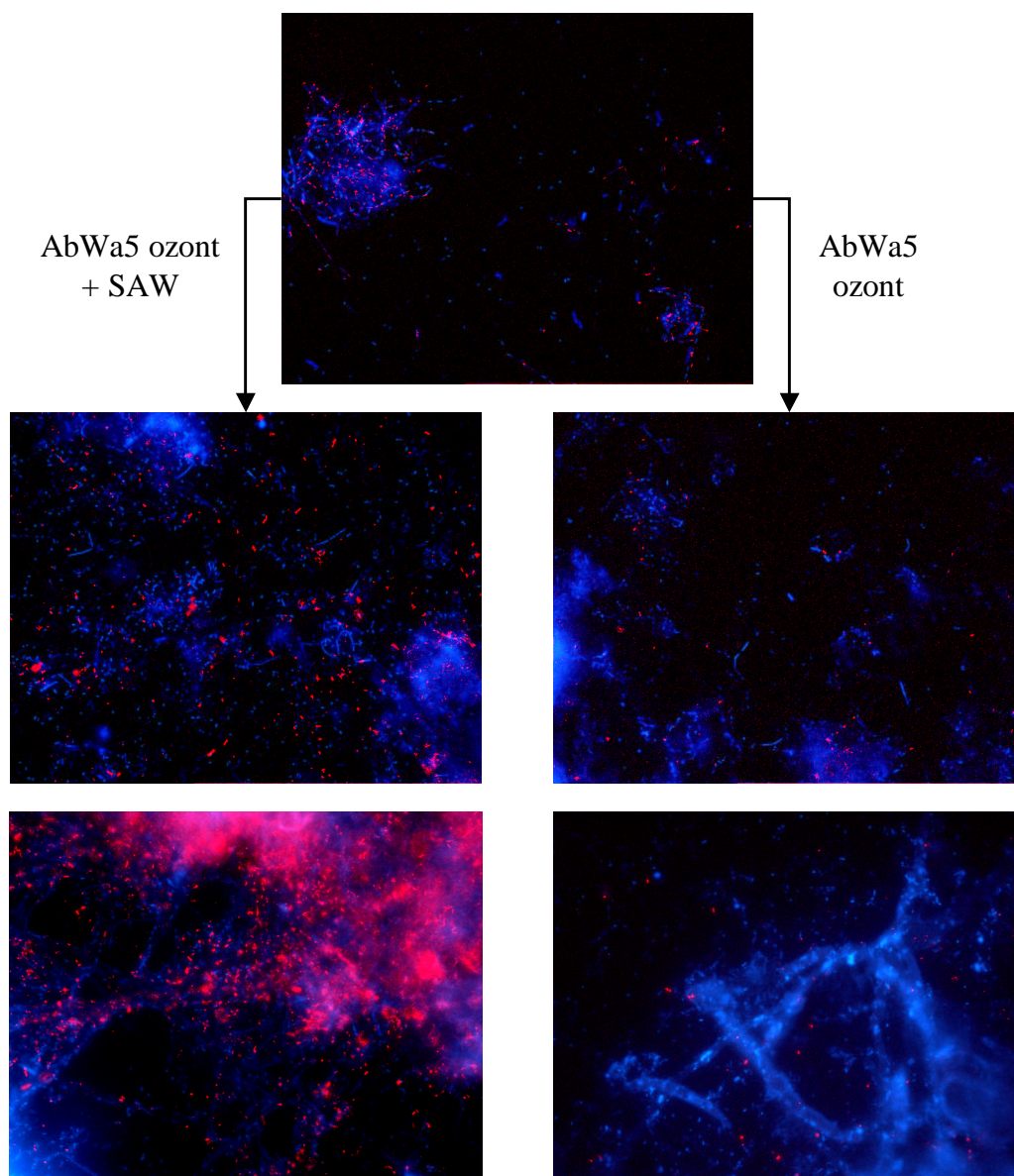


Abbildung 4.25: Messung der Bakterienaktivität in System 1. Oben: Aktivität zu Versuchsbeginn (Kontrollreaktor). Linke Spalte: Abwasser 5 ozont unter Zugabe von SAW nach 11 d Versuchszeit (mitte) und zu Versuchsende (unten). Rechte Spalte: Abwasser 5 ohne SAW nach 11 d Versuchszeit (mitte) und zu Versuchsende (unten).

mit Hilfe der eingesetzten Gensonden in der Populationsanalyse einer Untergruppe der Proteobakterien zugeordnet werden (s. Abschnitt 4.7.2), so dass es sich hierbei

z. B. um filamentöse Bakterien (vergl. Abschnitt 2.6.2) oder Pilze handeln konnte.

### 4.7.2 FISH-Analyse

Eine Populationsanalyse in System 1 wurde zu Beginn und an Tag 23 des Biofilmreaktorversuchs mit Abwasser 5 nach Ozonung durchgeführt. Als Vergleichspunkt dienten die Kontrollreaktoren, die weiterhin mit SAW betrieben wurden. Bei Verwendung einer allgemeinen Sonde (EUB338), die gegen alle *Bacteria* gerichtet war, konnte eine relativ gute Hybridisierungsrate in den mit SAW betriebenen Reaktoren erreicht werden (s. Abbildung 4.26). Eine weitere Verbesserung der Hybridisierungsrate wäre mit einem kombinierten Einsatz der Sonden EUB338I-III möglich [173], was im Rahmen dieser Arbeit aber nicht durchgeführt wurde.

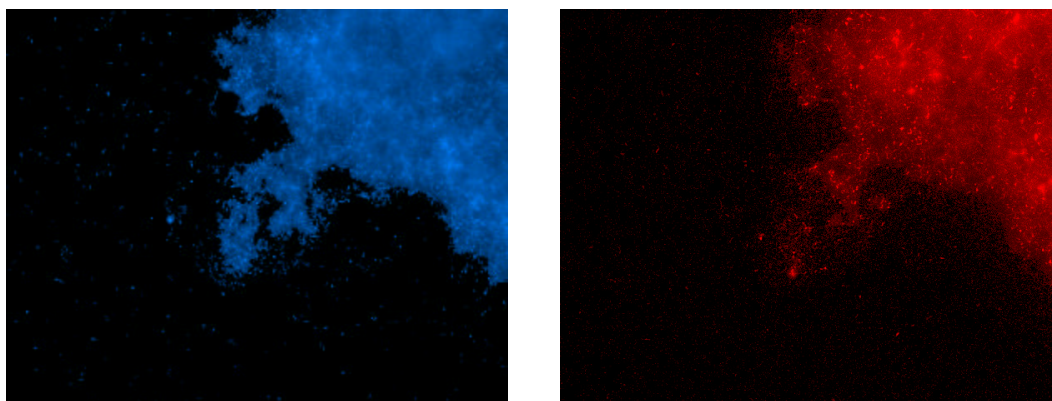


Abbildung 4.26: Hybridisierung der Biofilmreaktorprobe mit der Sonde EUB338 (*Bacteria*) bei Dosierung von synthetischem Abwasser (SAW). Links: DAPI-Bild (Gesamtzellzahl), rechts: Sonde EUB338.

Wurden die spezifischen Sonden für die  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien eingesetzt, konnten zwar Vertreter aller drei Untergruppen gefunden werden, der Anteil an der Gesamtzellzahl war jedoch geringer als bei Verwendung der Allgemeinsonde (s. Abbildung 4.27). Die  $\beta$ -Proteobakterien zeigten die größte Häufigkeit, gefolgt von den  $\gamma$ -Proteobakterien.  $\alpha$ -Proteobakterien wurden nur selten gefunden. Die Signale, die mit der Sonde ALF1b erhalten wurden, waren zumeist sehr diffus und kontrastarm, so dass sie sich nur wenig von der Autofluoreszenz der Biofilmproben unterschieden. Es musste also von vielen weiteren Vertretern der *Bacteria* in den Biofilmproben ausgegangen werden, die mit den eingesetzten Sonden nicht nachzuweisen waren. Wurde das ozonte Abwasser 5 zusätzlich zum SAW zudosiert, so ging der relative Anteil der  $\gamma$ -Proteobakterien zurück, die  $\beta$ -Proteobakterien stellten deutlich den

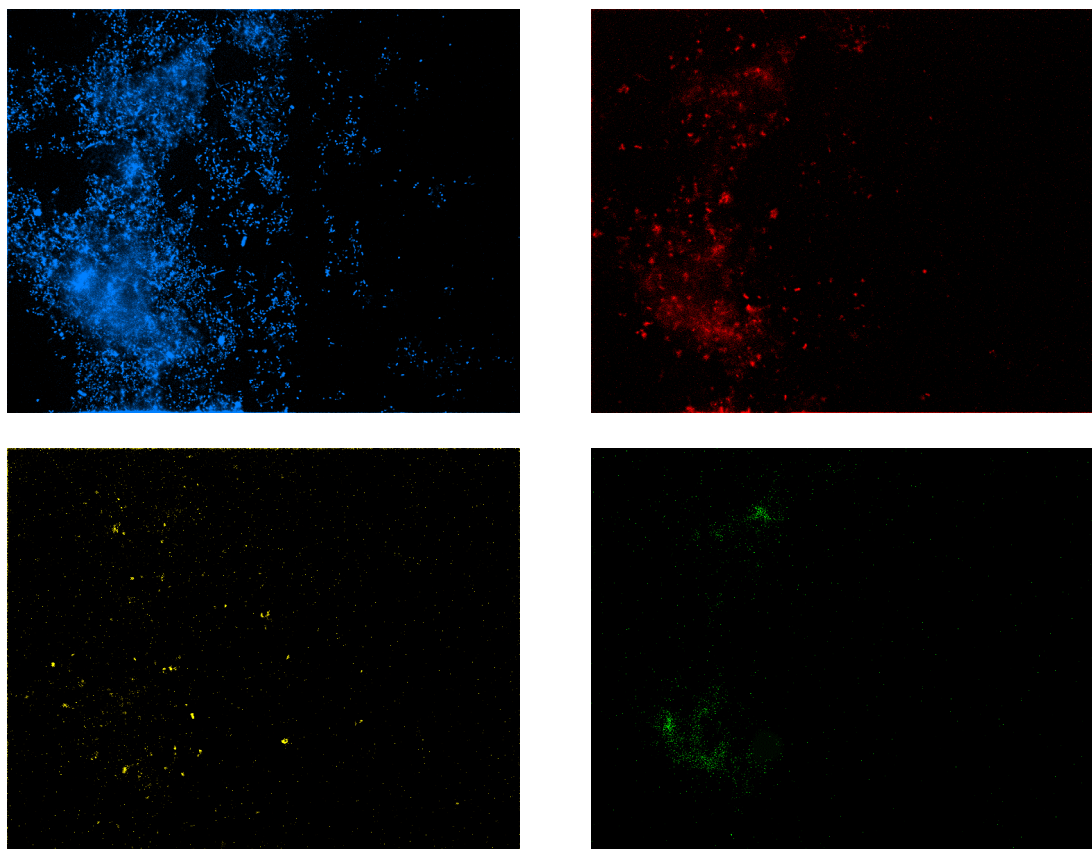


Abbildung 4.27: Hybridisierung der Biofilmreaktorprobe bei Dosierung von synthetischem Abwasser (SAW). Links oben: DAPI-Bild (Gesamtzellzahl), rechts oben: Sonde BET42a ( $\beta$ -Proteobakterien), links unten: Sonde GAM42a ( $\gamma$ -Proteobakterien), rechts unten: Sonde ALF1b ( $\alpha$ -Proteobakterien).

Großteil der detektierbaren Bakterien dar (s. Abbildung 4.28). Ob weitere Populationsverschiebungen aufgetreten waren, konnte aufgrund der niedrigen Hybridisierungsrate nicht gesagt werden. Neben Änderungen in anderen Untergruppen der *Bacteria* konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass jeweils innerhalb der  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Untergruppe eine Verschiebung stattgefunden hatte. Schwierig gestaltete sich die Populationsanalyse in den Biofilmreaktoren, denen ausschließlich AbWa5 ozont zudosiert wurde. Hier sank die Hybridisierungsrate allgemein, so dass Änderungen in der Zusammensetzung nicht erkannt werden konnten. Dies konnte zum einen auf die geringe Aktivität der Bakterien in diesen Reaktoren zurückgeführt werden, wie sie in der CTC/DAPI-Analyse gefunden wurde. Eine geringe Aktivität bedeutet,



dass pro Bakterienzelle weniger Ribosomen vorhanden waren, so dass das Detektionslimit für FISH unterschritten wurde, d.h. das Fluoreszenzsignal nicht ausreichend verstärkt wurde. Zum anderen kann das im DAPI-Bild festgestellte Auftreten von vermutlich filamentösen Bakterien und Pilzen, die nicht mit den eingesetzten Sonden nachgewiesen werden konnten, ein Grund für die niedrige Hybridisierungsrate sein.

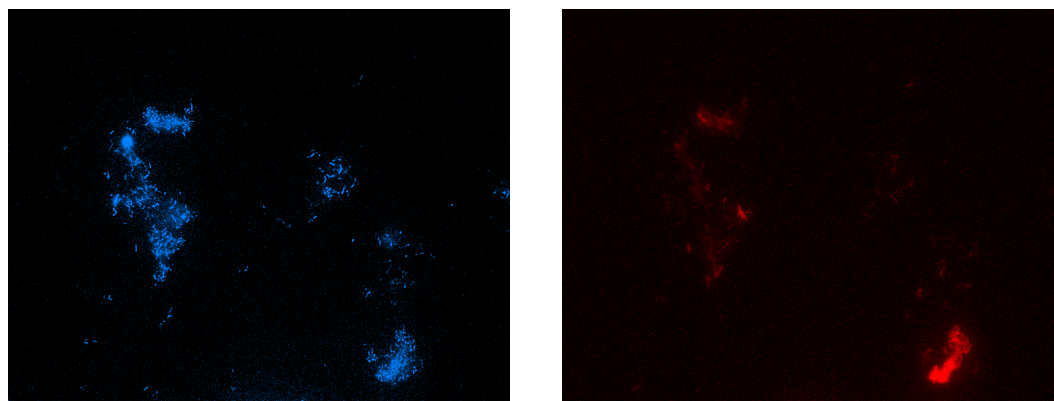


Abbildung 4.28: Hybridisierung der Biofilmreaktorprobe bei Dosierung von SAW + Abwasser 5 nach Ozonung. Links: DAPI-Bild (Gesamtzellzahl), rechts: Sonde BET42a ( $\beta$ -Proteobakterien),  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien nicht nachweisbar.

### 4.7.3 Zusammenfassung: Populationsanalyse System 1

Es zeigte sich, dass bei der allgemeinen Untersuchungen der Populationsstruktur ohne den Einsatz vieler Gensonden, was einen erheblichen Mehraufwand bedeuten würde, keine eindeutigen Aussagen getroffen werden können. Die hier festgestellten Änderungen der Populationsanteile der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien waren gering, weiterhin konnte eine Vielzahl der *Bacteria* nicht detektiert werden, sei es aufgrund zu geringer Aktivität (im Falle von AbWa5 ozont) oder aufgrund weiterer, nicht nachgewiesener Vertreter der *Bacteria* (im Falle der Zudosierung von AbWa5 ozont und SAW). Sinnvoll ist somit, hinsichtlich einer speziellen Untergruppe von Bakterien mit einer bestimmten Stoffwechsellistung (Nitrifikation, Phosphatelimination) oder einer bestimmten Problematik (Blähschlamm) zu untersuchen. Beim Abbau von C-Quellen, insbesondere bei Zugabe von Abwässern mit undefinierter Zusammensetzung, stößt die Populationsanalyse mit FISH auf ihre Grenzen, da die Fähigkeit zur Verstoffwechslung verschiedener C-Quellen nicht oder nur selten an die Phylogenie der Bakterien geknüpft ist. Vorteile können hier

z.B. DNA-amplifizierende Systeme wie die PCR-DGGE-Populationsanalyse bieten, wo zwar nur selten eine eindeutige Identifizierung der Bakteriengruppen möglich ist, die Änderung ihrer Zusammensetzung jedoch besser verfolgt werden kann. Eine in Zukunft erweiterte Kenntnis über verschiedene Stoffwechselleistung von Bakterien kann für die FISH-Analyse genutzt sein, so dass in Mischpopulationen gezielt nach bestimmten Spezialisten, z.B. für einen Schadstoffabbau, gesucht werden kann.

Als Konsequenz wurde ein entsprechender Versuchsansatz gewählt, in dem der Einfluss des Abwassers 5 vor und nach Ozonung auf die Nitrifikation und der dafür verantwortlichen Bakterien untersucht werden sollte. Dieser wird im folgenden Abschnitt beschrieben.

## 4.8 Nitrifikation in Biofilmreaktoren unter Einfluss organischer C-Quellen (System 2)

Mit Hilfe der Festbettbiofilmreaktoren (BFR) wurde der Einfluss von Abwasser 5 auf die Nitrifikation als wichtigen Stoffwechselfvorgang in biologischen Abwassersystemen untersucht. Die Biofilmreaktoren wurden 2 Monate vor Versuchsbeginn mit einem Nitrifikationsmedium ohne organische C-Quelle gefüttert und mit einer Nitrifikanten-Anreicherungskultur (Kläranlage Stuttgart-Büsnau) angeimpft, um eine stabile Nitrifikantenpopulation im Biofilm zu erhalten. Neben den bei System 1 eingesetzten Biofilmreaktoren BFR 1-6 wurden zusätzlich zwei größere Biofilmreaktoren eingesetzt (BFR 7 und 8, s. Abschnitt 3.3.3). Als Kontrollreaktoren wurden BFR 1 und BFR 7 weiterhin mit Nitrifikationsmedium betrieben. Den anderen Reaktoren wurden verschiedene organische C-Quellen im Massekonzentrationsverhältnis von  $\text{CSB:N-NH}_4^+ = 1:1$  zugesetzt (s. Tabelle 3.18):

- Abwasser 5 nach Ozonung (BFR 4 und BFR 8, sowie in BFR 5 in halber Konzentration)
- Abwasser 5, unbehandelt (BFR 6)
- Acetat (BFR 2) und Acetat + Pyruvat (BFR 3) als biologisch leicht abbaubare organische C-Quellen

Nach 73 Tagen Betriebszeit wurde die Konzentration der organischen C-Quellen vervierfacht ( $\text{CSB:N-NH}_4^+ = 4:1$ ), die gesamte Versuchsdauer belief sich auf 110 Tage. Neben der DOC-Elimination wurde der Abbau von Ammonium sowie die Bildung von Nitrit und Nitrat gemessen. Mit Hilfe der Fluoreszenz in-situ Hybridisierung wurden die Populationsverschiebungen innerhalb der Nitrifikantenpopulation untersucht. Bei der Populationsanalyse von System 1 hatte es sich gezeigt, dass es schwierig war, Verschiebungen innerhalb von Bakteriengruppen mit Hilfe von Sonden



zu detektieren. Grund hierfür war die über viele Gattungen und Arten verteilte Fähigkeit von Bakterien, unterschiedliche organische C-Quellen zu nutzen sowie die fehlende Identifizierbarkeit oder Detektierbarkeit der vorhandenen Bakterien. Demgegenüber sind die Vertreter der Nitrifikanten zu einem großen Teil bekannt, so dass hier eine gezielte Untersuchung der Populationzusammensetzung und -verschiebung möglich ist.

### 4.8.1 DOC-Elimination

Die organischen C-Quellen wurden zu Versuchsbeginn (Phase 1) im Verhältnis von  $\text{CSB:N-NH}_4^+ = 1:1$  zugesetzt, was bei Abwasser 5 einem DOC-Gehalt von 8,14 mg/L und beim ozonten Abwasser von 10,12 mg/L entsprach. Somit war die Verdünnung ungefähr um den Faktor 4 gegenüber den Biofilmreaktorversuchen im System 1 erhöht. Damit ergab sich für beide Abwässer eine weitere Verbesserung der biologischen Abbaubarkeit im Vergleich zu System 1. Diese Verbesserung blieb auch während Phase 2 des Versuchs, bei der die DOC-Konzentration um den Faktor 4 erhöht wurde, bestehen. In den Abbildungen 4.29 und 4.30 ist die DOC-Elimination neben den Daten für die Nitrifikation der mit Abwasser 5 betriebenen Reaktoren dargestellt. Bei AbWa5 ozont konnte eine DOC-Elimination von deutlich über 80% erreicht werden (BFR 4, 5 und 8), bei AbWa5 von ca. 70% gegen Versuchsende (BFR 6).

### 4.8.2 Nitrifikation Abwasser 5

Die Dosierung von AbWa5 (BFR 6, s. Abbildung 4.30) verursachte zu Beginn des Versuches eine deutliche Störung der Nitrifikation. Zwar konnte kein Nitrit im Ablauf des Reaktors detektiert werden, jedoch wurden teilweise hohe Konzentration an Ammonium und dementsprechend verringerte Nitrat-Ablaufkonzentrationen gemessen. Auch die DOC-Elimination schwankte in den ersten 50 Versuchstagen relativ stark. Noch bevor die DOC-Konzentration erhöht wurde, stabilisierte sich jedoch das System, so dass die Nitrifikation fast vollständig verlief. Die Erhöhung der DOC-Konzentration bewirkte keine Störung des Systems, der BDOC erhöhte sich weiter auf Werte bis über 70 %. Die Anpassung der Bakterien in den ersten 73 d lieferte somit eine stabile Mikroorganismenpopulation, so dass auch höhere Konzentrationen des Abwassers weder die Nitrifikation noch die DOC-Elimination beeinträchtigten. Weiterhin lag die Vermutung nahe, dass die Entwicklung der heterotrophen Population einen Vorteil für die Nitrifikanten darstellte. Denkbar ist hier die Elimination hemmender Substanzen, welche zu Beginn der C-Quellen-Dosierung die Nitrifikation störten. Wie von [101] erwähnt, ist denkbar, dass der Cometalabolismus zwischen autotropher und heterotropher Population sowohl die Nitrifikation als auch die DOC-Elimination förderte. Auffallend war ebenso, dass im Vergleich zu System

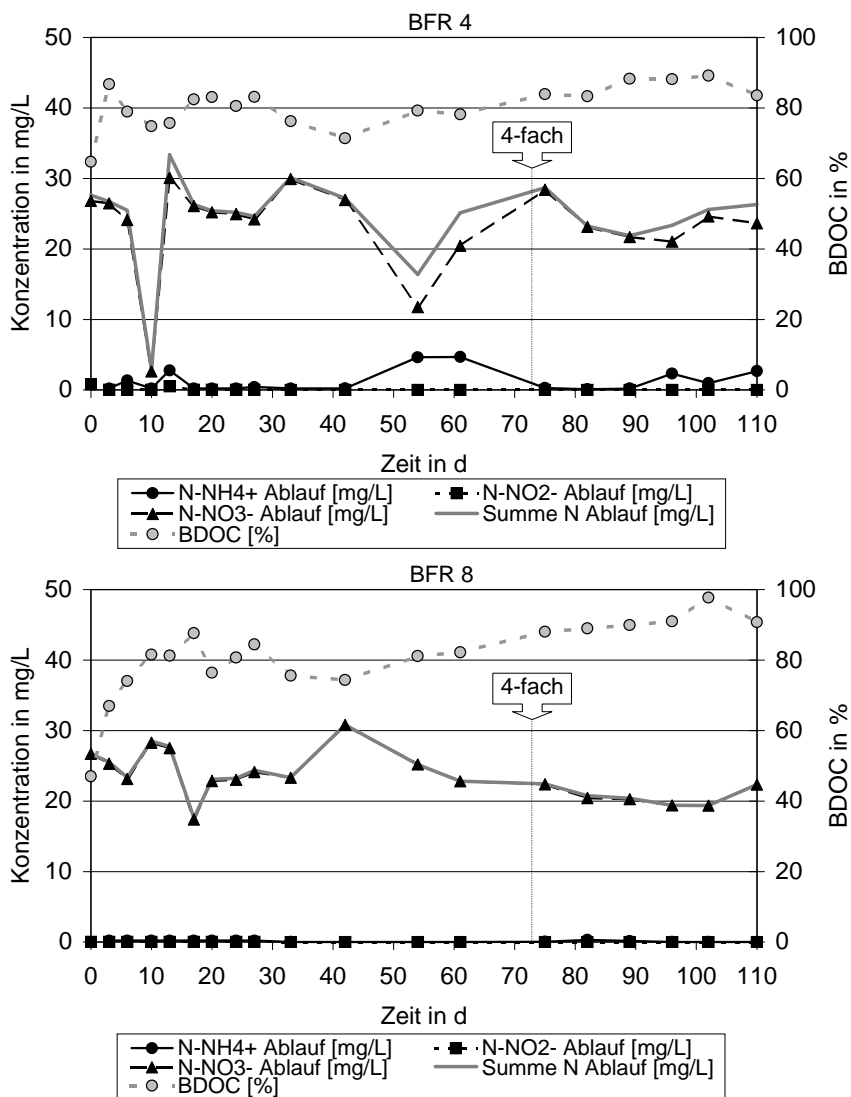


Abbildung 4.29: Nitrifikation und DOC-Elimination (BDOC) von Abwasser 5 nach Ozonung (BFR 4 und BFR 8). Ab Versuchstag 73 wurde die Konzentration der C-Quelle vervierfacht. Summe  $\rho(N)_{Zulau\text{f}} = 30 \text{ mg/L}$ .

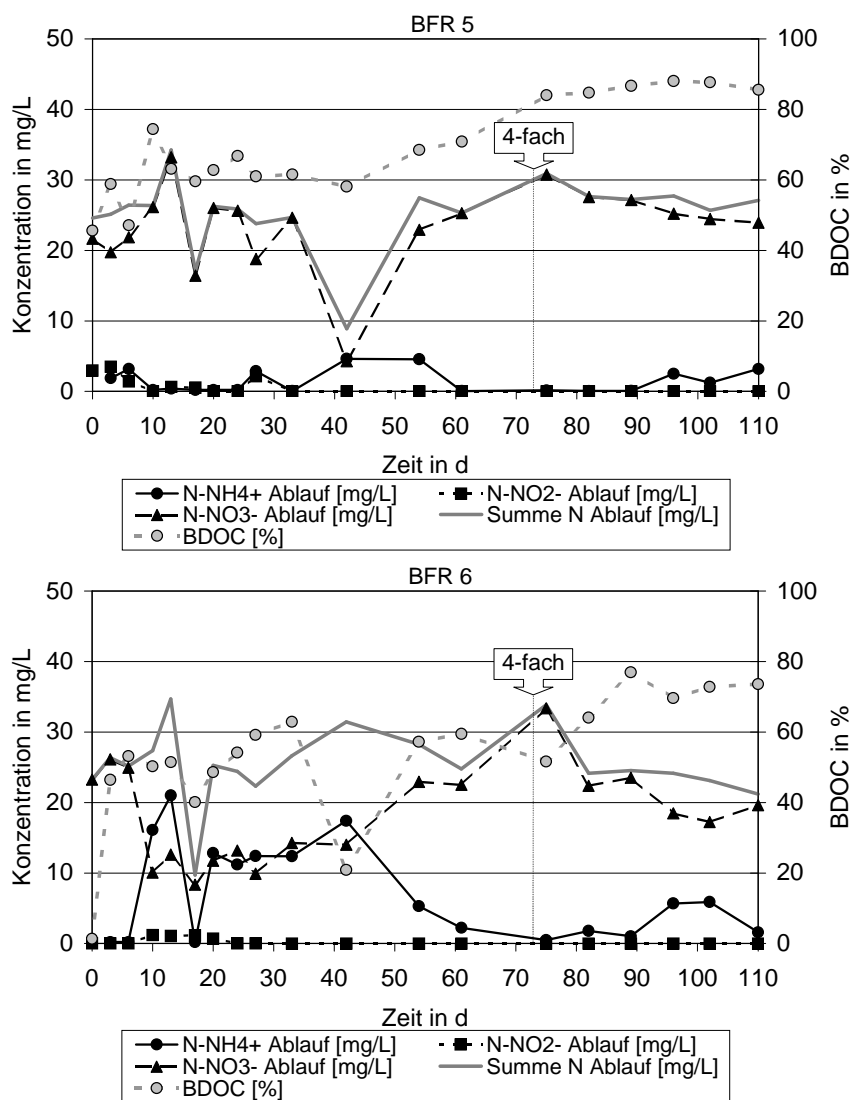


Abbildung 4.30: Nitrifikation und DOC-Elimination (BDOC) von Abwasser 5 nach Ozonung (BFR 5 mit halber Konzentration) und unbehandelt (BFR 6). Ab Versuchstag 73 wurde die Konzentration der C-Quelle vervierfacht. Summe  $\rho(N)_{Zulau\text{f}} = 30 \text{ mg/L}$ .

1 (Mischung von AbWa5 mit SAW) der biologische Abbau von Abwasser 5 weiter verbessert wurde, was jedoch auch in der längeren Versuchslaufzeit begründet sein kann. Eine Hemmung der Nitrifikanten durch Sauerstofflimitierung konnte anhand der hohen Nitrifikationsrate ausgeschlossen werden. Grund hierfür kann die nur langsame Entwicklung der heterotrophen Bakterienpopulation sein, da die organischen Substanzen von AbWa5 nur schwer biologisch abbaubar waren. Die Wachstumsrate der heterotrophen Bakterien war demnach entsprechend niedrig, so dass es zu keiner direkten Konkurrenz mit den Nitrifikanten um Sauerstoff kam.

### 4.8.3 Nitrifikation Abwasser 5 ozont

Im Gegensatz zu AbWa5 wurde bei Dosierung des ozonten Abwassers keine Beeinträchtigung der Nitrifikation festgestellt (BFR4 und BFR8, s. Abbildung 4.29, BFR5, s. Abbildung 4.30). Die erhöhte Toxizität des ozonten Abwassers im Leuchtbaktrienhemmtest (bei  $\rho(DOC) = 10 \text{ mg/L}$  betrug die Lumineszenzhemmung ca. 85 %) wirkte sich somit nicht negativ auf die Nitrifikanten aus. Ein Grund kann in der besseren biologischen Abbaubarkeit des ozonten Abwassers gesehen werden, so dass sich relativ schnell eine heterotrophe Bakterienpopulation im Reaktor ansiedelte und somit die Nitrifikanten nicht gestört wurden. Auch hier konnte keine Sauerstofflimitierung beobachtet werden. Weiterhin kann auch hier vermutet werden, dass die Nitrifikanten einen cometabolischen Abbau refraktärer Stoffe bewirken (Bildung von OH-Radikalen durch das Enzym Ammonium-Monooxygenase) oder Cosubstrate für heterotrophe Mikroorganismen liefern können, was den verbesserten biologischen Abbau sowie die stabile Nitrifikation erklären könnte [101]. Die Reaktoren BFR 4, BFR 5 und BFR 8 unterschieden sich nur wenig, auffallend war die etwas geringere DOC-Elimination in BFR 5 zu Beginn des Versuches. Hier wurde nur die halbe Konzentration an AbWa5 ozont zudosiert (Phase 1:  $\rho(DOC) = 5 \text{ mg/L}$ ). Bei dieser geringen Konzentration wirkte sich jedoch der Ablaufwert des DOC bei der Berechnung des BDOC (s. Gleichung 3.11) stärker aus, da z.B. auch bei den autotroph betriebenen Reaktoren geringe DOC-Konzentrationen im Ablauf gemessen wurden. Diese entstanden vermutlich durch die mikrobielle Aktivität in den Biofilmreaktoren sowie der Lysis von Zellen. Deshalb war davon auszugehen, dass der eigentliche Abbau von AbWa5 ozont in BFR 5 im Bereich der Reaktoren BFR 4 und BFR 8 lag. Weiterhin zeigte sich, dass die Kontaktzeit im miniaturisierten Reaktor BFR 4 ausreichte, um annähernd die gleiche Abbauleistung wie in BFR 8 zu erzielen.

### 4.8.4 Autotroph betriebene Reaktoren

Als Kontrollreaktoren wurden die Reaktoren BFR 1 und BFR 7 ausschließlich mit Nitrifikationsmedium ohne organische C-Quelle betrieben. Während im größeren Reaktor BFR 7 die Nitrifikation vollständig und sehr stabil über den gesamten Ver-

suchszeitraum war, unterlag diese in BFR 1 größeren Schwankungen (s. Abbildung 4.31). Diese traten aufgrund von Problemen mit der Dosierpumpe und der Zuleitung zu BFR 1 auf, weiterhin wurde bei der Probenahme für die FISH-Untersuchung wahrscheinlich zu viel Biomasse entfernt, was insbesondere beim relativ schwach ausgebildeten autotrophen Biofilm einen negativen Einfluss hatte. Im Versuchszeitraum von Tag 27-80 wurden niedrige Nitrat-Ablaufkonzentrationen festgestellt, jedoch konnte wiederum kein Nitrit detektiert werden. Somit war zu beachten, dass Schwankungen bzw. der Ausfall der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung sowie die Entnahme von Biofilm einen erheblichen Einfluss auf die Nitrifikation besaß, insbesondere in den verwendeten miniaturisierten Reaktoren. Erst nach einem längeren stabilen Betrieb erholte sich die Nitrifikantenpopulation und erreichte ab Versuchstag 80 wieder einen fast vollständigen Abbau des Ammoniums.

#### 4.8.5 Nitrifikation in den Vergleichsreaktoren

Reaktor BFR 2 wurde Acetat als biologisch leicht verwertbare C-Quelle zudosiert. Ähnlich wie bei BFR 6 (Zudosierung von AbWa5) wurde auch hier die Nitrifikation zu Versuchsbeginn gestört (s. Abbildung 4.32). Hier waren auch geringe Konzentrationen an Nitrit im Ablauf messbar. In diesem Fall war der Effekt also nicht auf refraktäre oder hemmende Stoffe zurückzuführen, sondern auf eine biologisch sehr leicht und schnell zu verwertende Substanz (Abbau bereits zu Beginn der Dosierung über 80 %). Hier konnte somit von einer Konkurrenzsituation zwischen heterotrophen und autotrophen Bakterien ausgegangen werden. Jedoch trat auch hier nach einer Versuchsdauer von ca. 60 Tagen eine Stabilisierung der Nitrifikationsleistung auf, die sich bei Erhöhung der Acetatkonzentration in Phase 2 nicht veränderte.

Die Zugabe von Acetat und Pyruvat in BFR 3 bewirkte ebenfalls eine leichte Störung in der Nitrifikationsleistung. Zwar wurde auch hier eine Stabilisierung des Systems nach ca. 35 Versuchstagen erreicht, jedoch verursachte die Erhöhung der Acetat- und Pyruvat-Konzentration ab Versuchstag 73 wieder eine Verringerung des Ammoniumabbaus. Pyruvat war deswegen als zusätzliche C-Quelle ausgewählt worden, weil *Nitrospira* über die Fähigkeit verfügt, Pyruvat aufzunehmen [190]. Zwar wurden unterschiedliche Ergebnisse für Acetat und für Acetat + Pyruvat als C-Quelle erhalten, jedoch konnte anhand der Nitrifikationsdaten keine unterscheidbare Beeinflussung der Nitrit-Oxidation gefunden werden. Es kann aber die Aussage getroffen werden, dass *Nitrospira* bzw. die Nitrit-Oxidation bei keiner der untersuchten C-Quellen (AbWa5, AbWa5 ozont, Acetat, Pyruvat) sichtbar gehemmt wurde, da das durch Ammonium-Oxidation entstandene Nitrit meist vollständig in Nitrat umgewandelt wurde. Demgegenüber schien der erste Schritt, die Ammonium-Oxidation, stärker beeinflusst zu werden. Hier könnte sich die postulierte Eigenschaft von *Nitrospira* zum mixotrophen Stoffwechsel [190] als vorteilhaft für die untersuchten Abwassersysteme erwiesen haben.

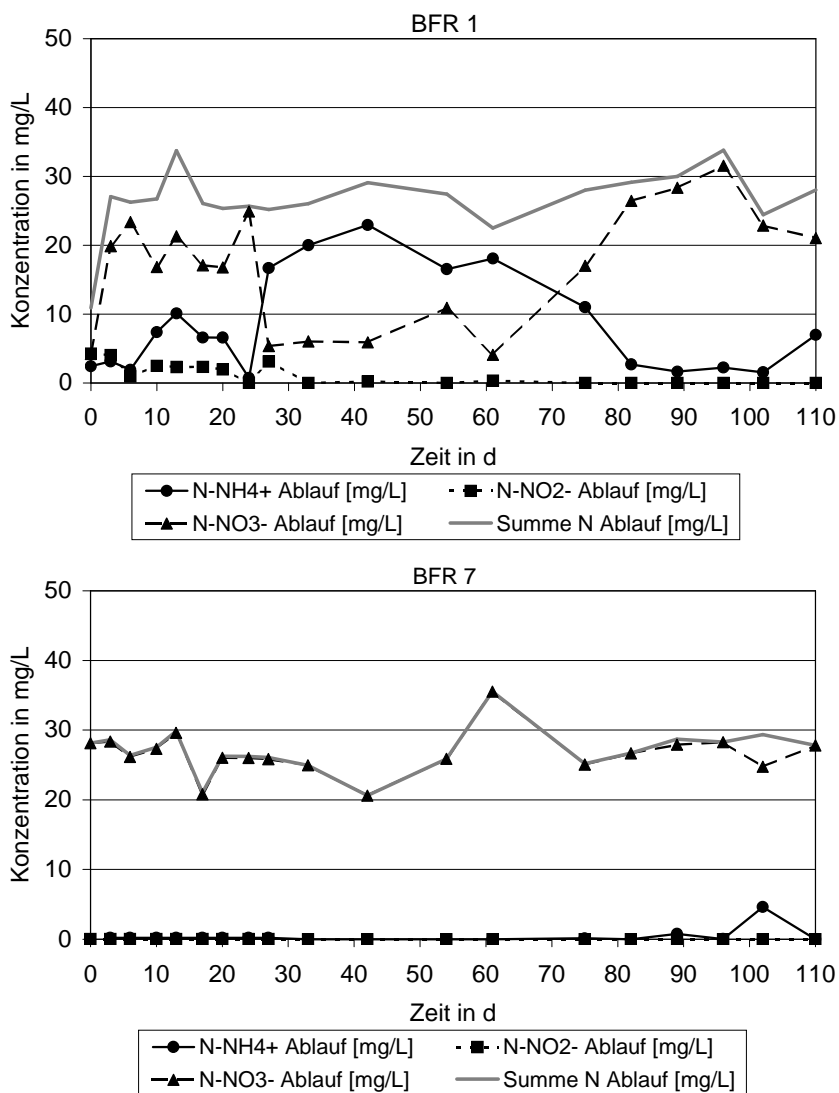


Abbildung 4.31: Nitrifikation im Biofilmreaktorversuch. Kontrollreaktoren ohne Zugabe organischer C-Quellen (BFR 1 und BFR 7). Summe  $\rho(N)_{Zulau\!f} = 30$  mg/L.

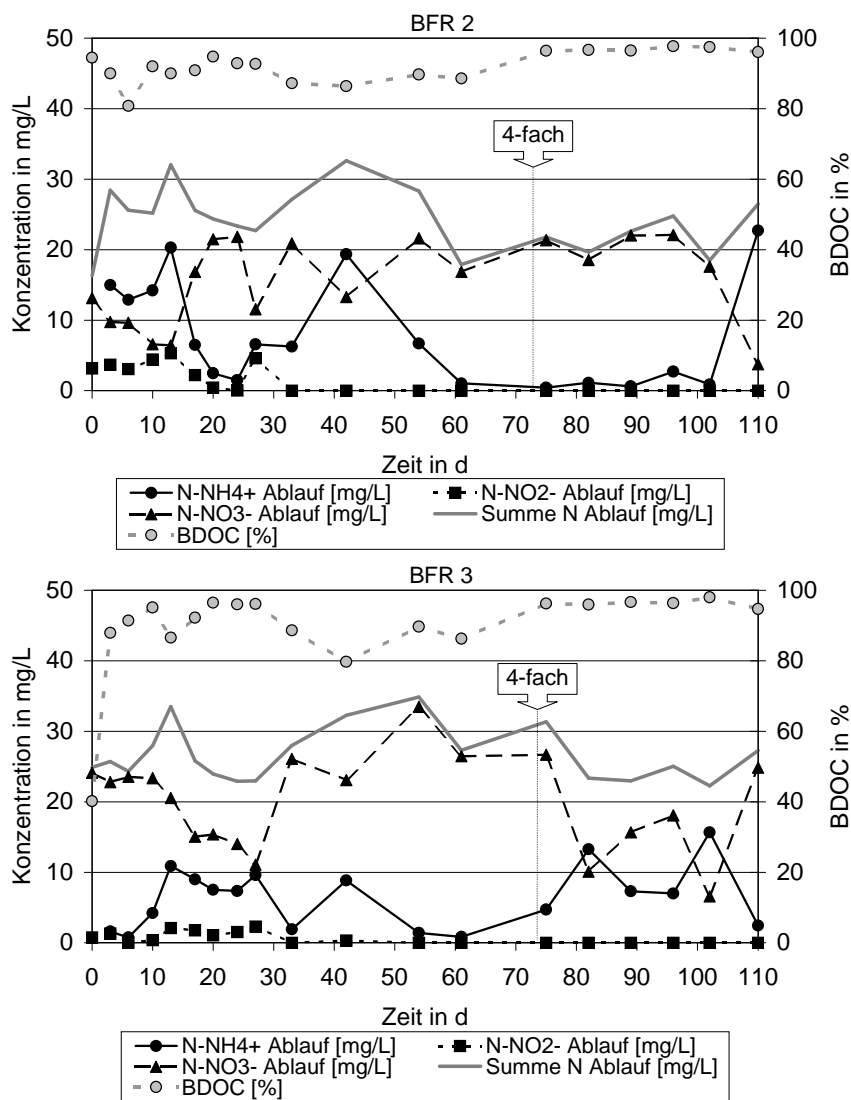


Abbildung 4.32: Nitrifikation und DOC-Elimination (BDOC) im Biofilmreaktorversuch. Vergleichsreaktoren unter Zugabe von Acetat (BFR 2) bzw. Acetat + Pyruvat (BFR 3). Ab Versuchstag 73 wurde die Konzentration der C-Quelle vervierfacht. Summe  $\rho(N)_{Zulauf} = 30 \text{ mg/L}$ .

Die Bilanz für den Gesamtstickstoffgehalt im Ablauf aller Biofilmreaktoren war meist negativ. Neben der Summierung möglicher Messwertungenauigkeiten ist anzunehmen, dass ein Teil des in Form von  $\text{NH}_4^+$  angebotenen Stickstoffs zum Aufbau von Zellmasse, insbesondere durch die Entwicklung der heterotrophen Bakterienpopulation, verwendet wurde.

#### 4.8.6 Gelchromatographische Untersuchungen

Anhand der LC-DOC Untersuchungen konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sich der biologische Abbau von AbWa5 und AbWa5 ozont im Verlauf der Biofilmreaktorexperimente verbesserte (s. Abbildung 4.33). Beim ozonten Abwasser zeigte sich bereits am 6. Versuchstag, dass ein Großteil des DOC abgebaut wurde, während er beim unbehandelten Abwasser 5 zu diesem Zeitpunkt kaum verändert wurde. Im weiteren Verlauf zeigte sich auch hier, dass die Adaptation der Mikroorganismen zu einem erhöhten Abbau des DOC führte. Das Signal von Propyldioxepen bei einer Retentionszeit von ca. 140 min zeigte nur eine geringe Abnahme, während das Signal bei 69 min (Butendiol und Propyldioxepen) sowie das diffuse Signal von Butyraldehyd deutlicher verringert wurden. Hier konnte nicht eindeutig gesagt werden, welche Substanz zu welchem Prozentsatz abgebaut wurde, da die Signale der einzelnen Substanzen im LC-DOC Chromatogramm nicht getrennt waren (vergl. Abbildung 4.22). Eine Einzelsubstananalytik wurde mit den Reaktorproben nicht durchgeführt.



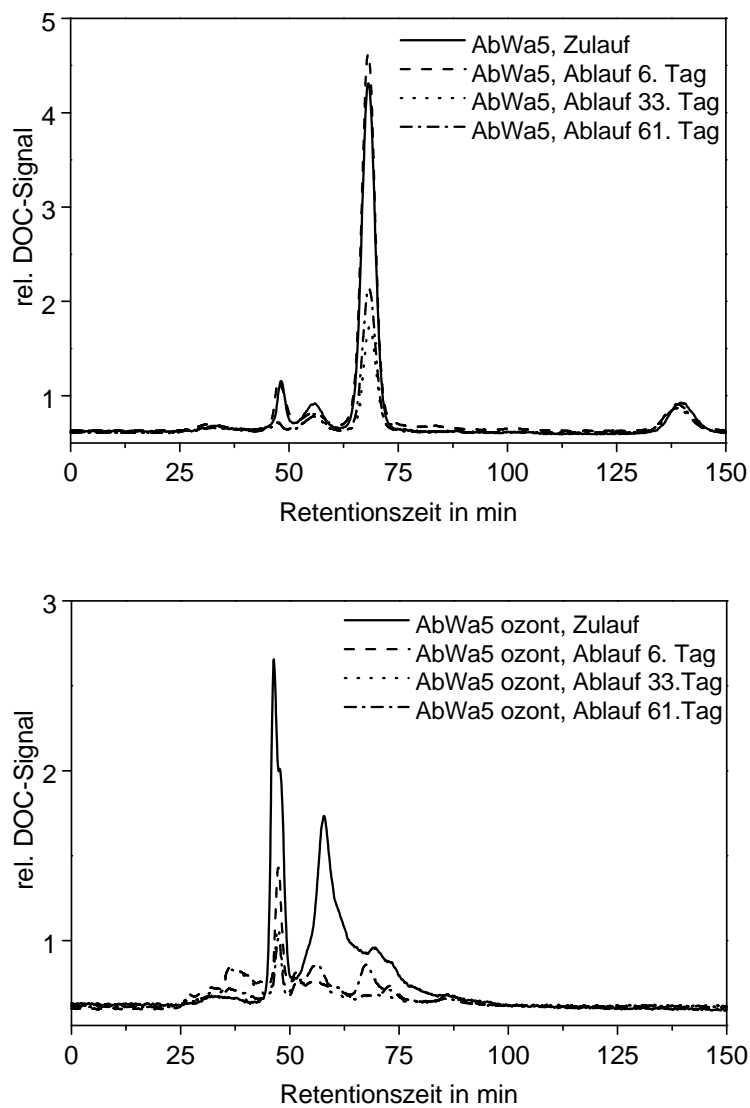


Abbildung 4.33: Gelchromatographische Untersuchung (LC-DOC, TSK HW 40S). Biofilmreaktorversuch zur Nitrifikation unter Zugabe von Abwasser 5 vor (AbWa5) und nach Ozonung (AbWa5 ozont). Zulaufprobe sowie Ablaufproben nach 6, 33 und 61 Tagen Betriebszeit.

## 4.9 Populationsanalyse System 2

Parallel zur Messung der Nitrifikationsleistung und der DOC-Elimination (s. Abschnitt 4.8) wurde die Zusammensetzung der Nitrifikantenpopulation in den Biofilmreaktoren mit Hilfe der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung untersucht. Es wurden die Reaktoren BFR 1 (autotroph), BFR 2 (Acetat), BFR 3 (Acetat und Pyruvat), BFR 4 (AbWa5 ozont) und BFR 6 (AbWa5) für die Populationsanalysen herangezogen. Im Falle der AOB wurde das Mehrfachsondenkonzept angewendet, d.h. es wurden für jede Hybridisierung zwei hierarchische Sonden mit unterschiedlicher Spezifität und unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung eingesetzt. Dies bedeutete, dass für jede Sonde eine weitere Sonde verwendet wurde, die einer übergeordneten Populationsebene entsprach (s. auch Abbildung 2.6):

- AOB-spezifische Sonde Nso190 und Sonde BET42a, spezifisch für die  $\beta$ -Untergruppe der Proteobakterien
- Sonde NEU, spezifisch für alle halotoleranten AOB der Gattung *Nitrosomonas*, und Sonde Nso190 (alle AOB)

*Nitrospira* als wichtigster Vertreter der NOB wurde mit der Sonde Ntspa712, spezifisch für alle Bakterien der Gattung *Nitrospira*, nachgewiesen. Ntspa712 wurde in Kombination mit der Sonde Nso190 eingesetzt. Weiterhin wurden wie in System 1 die Sonden GAM42a und ALF1b, spezifisch für die  $\gamma$ - bzw.  $\alpha$ -Untergruppe der Proteobakterien, verwendet. Die Kombination verschiedener Sonden mit unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierung sollte eine eindeutige Zuordnung der markierten Bakterien zu einer Population ermöglichen, da dadurch die Entstehung falsch-positiver Signale verringert wird. Bindet eine Bakterienzelle beim Mehrfachsondenkonzept beide Sonden, so gehört sie der Untergruppe an und das Fluoreszenzbild ist eine Mischfarbe beider Fluoreszenzfarbstoffe. Bindet sie nur die Sonde der übergeordneten Populationsebene, so gehört sie nicht der untersuchten Untergruppe dieser Populationsebene an. Gehören wie im Falle der AOB und der NOB die untersuchten Populationen nicht-verwandten Gattungen an, so sollte keine Zelle mit beiden Sonden binden. In Abbildung F.1 im Anhang ist zur Verdeutlichung der Größenverhältnisse der Mikroskopaufnahmen eine Skalierung des verwendeten Objektivs gegeben.

### 4.9.1 Populationszusammensetzung der Nitrifikanten

Vor Dosierung der organischen C-Quellen wurde die Populationszusammensetzung der Nitrifikanten in den autotroph betriebenen Biofilmreaktoren charakterisiert. Diese Zusammensetzung änderte sich im Verlauf der Versuchs im Kontrollbiofilmreaktor (BFR 1, reine Nitrifikation) nicht, so dass sie als Bezugspunkt dienen konnte.

Der Großteil der Bakterien im Nitrifikationsbiofilmreaktor konnte den  $\beta$ -Proteobakterien zugeordnet werden (s. Abbildung 4.34). Fast alle der mit DAPI angefärbten Zellen (blaues Fluoreszenzsignal) hybridisierten mit der Sonde BET42a. Es konnten keine Bakterien der  $\gamma$ - oder  $\alpha$ -Untergruppe detektiert werden. Der Anteil der NOB (*Nitrospira*) war relativ gering, weiterhin war die Signalintensität relativ schwach, so dass von einer geringen Aktivität der *Nitrospira* ausgegangen werden konnte. Dies könnte im Zusammenhang stehen mit der zeitweise nicht vollständigen Ammonium-Oxidation im Kontrollreaktor (vergl. Abbildung 4.31), da dadurch auch das Angebot an Nitrit für die Nitrit-Oxidierer verringert war. Die Signalstärke beim Nachweis der AOB war durch die geringere Aktivität nicht abgeschwächt, allerdings wurde im Falle der AOB beobachtet, dass selbst längere Hungerzeiten keinen Einfluss auf die Signalintensität bei der FISH-Analyse hatten [245]. Vermutlich wird der Ribosomengehalt der AOB nur langsam an die Stoffwechselaktivität angepasst. Die  $\beta$ -Proteobakterien gehörten fast ausschließlich den AOB an, da die Sonden BET42a und Nso190 nahezu identische Fluoreszenzbilder erzeugten (s. Abbildung 4.34). Kombinierte man die Sonden Nso190 und NEU, so zeigte sich, dass ein geringer Anteil der AOB nicht zu den halotoleranten Arten von *Nitrosomonas* gehörten. Wenige etwas weniger sphärisch ausgebildete Zellhaufen banden ausschließlich die Sonde Nso190, nicht jedoch die Sonde NEU (s. Abbildung 4.34).

#### 4.9.2 Populationsanalyse bei Dosierung biologisch leicht abbaubarer C-Quellen

Die Zugabe der organischen C-Quellen bewirkte das Wachstum heterotropher Bakterien. Die DOC-Elimination bei Dosierung von Acetat und Acetat + Pyruvat lag schon zu Beginn von Phase 1 (73 d, Massekonzentrationsverhältnis CSB:N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 1:1) bei über 80% (s. Abbildung 4.32). Der Nachweis durch Gensonden gelang zeitlich versetzt, was auf die geringe Konzentration dieser Bakterien zu Beginn zurückgeführt werden kann. Auch am Ende von Phase 2 (37 d, CSB:N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> = 4:1) war die Anzahl heterotropher Bakterien an der Gesamtzellzahl relativ gering. In Abbildung 4.35 sind die FISH-Aufnahmen am Ende von Phase 2 bei Acetat-Dosierung gezeigt. Die  $\beta$ -Proteobakterien bildeten weiterhin den Großteil der Bakterien, während  $\alpha$ -Proteobakterien und  $\gamma$ -Proteobakterien nur vereinzelt gefunden werden konnten. Im Gegensatz zum Kontrollreaktor zeigte sich hier, dass einige Einzelzellen und losere kleine Zellhaufen der  $\beta$ -Proteobakterien nicht zu den AOB gehörten, so dass es sich hier vermutlich um heterotrophe  $\beta$ -Proteobakterien handelte. Der Anteil der mit NEU nachweisbaren AOB war ähnlich dem des Kontrollreaktors. Es wurden nur wenige Zellhaufen gefunden, die nicht zu den halotoleranten Arten von *Nitrosomonas* gehörten. Gegen Ende von Phase 1 war die Abundanz von *Nitrospira* erhöht, während gegen Ende von Phase 2 der Anteil an der Gesamtzellzahl wieder ungefähr

dem zu Beginn der Acetat-Dosierung entsprach. Ein Zusammenhang mit der Nitrit-Oxidationsrate konnte nicht festgestellt werden, da in Phase 2 die Nitrifikation fast vollständig verlief und Nitrit im Ablauf des Reaktor nicht auftrat.

Die Entwicklung der heterotrophen Population in BFR 3 (Acetat + Pyruvat) verlief ähnlich wie in BFR 2. Gegen Ende von Phase 2 konnten einige  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien gefunden werden, wobei letztere etwas häufiger auftraten. Die  $\beta$ -Proteobakterien stellten aber immer noch den Großteil der Bakterien dar (s. Abbildung 4.36). Wiederum fanden sich einzelne Zellen oder kleine Zellhaufen der  $\beta$ -Proteobakterien, die nicht zu den AOB gehörten. Auch die Zusammensetzung der AOB zeigte keine deutlichen Unterschiede zum Kontrollreaktor, es wurden wiederum einige Zellhaufen gefunden, die nicht mit der Sonde NEU nachzuweisen waren. Es konnte jedoch festgestellt werden, dass *Nitrospira* nicht so häufig auftrat wie in BFR 2 mit Acetat. In Abbildung 4.36 sind zwei Ausschnitte des Biofilms mit der Sonde Ntspa712 dargestellt, wobei das rechte Bild, wo vermehrt *Nitrospira* auftrat, eher untypisch war. Da aber auch bei BFR 3 in Phase 2 kein Nitrit im Ablauf gefunden werden konnte, bestand kein Zusammenhang zwischen Aktivität und Auftreten der Nitrooxidierer. Fraglich war, ob sich neben *Nitrospira* auch *Nitrobacter* im Biofilm etabliert hatte, da aber nur sehr wenige  $\alpha$ -Proteobakterien detektiert werden konnten, war ein gehäuftes Auftreten von *Nitrobacter* auszuschließen. Ein Einfluss von Pyruvat als zusätzlicher organischer C-Quelle konnte anhand der Ergebnisse nicht festgestellt werden, da sich die Aktivität der *Nitrospira* nicht verändert hatte. Vermutlich ergibt sich aus der Fähigkeit von *Nitrospira* zum mixotrophen Stoffwechsel ein Wettbewerbsvorteil in gemischt heterotroph-autotrophen Systemen, der in den hier untersuchten Systemen keine Rolle spielte, da auch in Phase 2 die Konzentration der organischen C-Quelle im Vergleich zur Ammonium-Konzentration relativ niedrig war. In realen Kläranlagen und Abwassersystemen kann dies jedoch mit ein Grund dafür sein, dass häufig *Nitrospira* als Hauptvertreter der NOB gefunden wird.

### 4.9.3 Populationsanalyse bei Dosierung von Abwasser 5 ozont

Im Falle der heterotrophen Population ergab sich für BFR 4 (AbWa5 ozont) ein ähnliches Bild wie bereits für BFR 2 und BFR 3 beschrieben. Die  $\beta$ -Proteobakterien stellten weiterhin den Großteil der Bakterien dar, wobei die Einzelzellen und loseren Zellhaufen wiederum als heterotrophe Bakterien eingeordnet werden konnten (s. Abbildung 4.37). Der Anteil der  $\gamma$ -Proteobakterien war etwas gegenüber den anderen Reaktoren erhöht,  $\alpha$ -Proteobakterien wurden in geringen Anteilen gefunden. *Nitrospira* als Nitrit-Oxidierer konnte während der gesamten Versuchslaufzeit in hoher Anzahl nachgewiesen werden. Die Zusammensetzung der Ammonium-Oxidierer zeigte jedoch eine deutliche Veränderung. Während am Ende von Phase 1 der An-

teil der mit der Sonde NEU detektierbaren AOB dem der Reaktoren BFR 2 und BFR 3 entsprach, war zu Versuchsende eine deutliche Verschiebung zu nicht mit der Sonde NEU detektierbaren AOB festzustellen. Es wurden teilweise sehr große, jedoch weniger sphärisch und weniger dicht gepackte Zellhaufen gefunden, die ausschließlich mit der Sonde Nso190 nachzuweisen waren. Der Anteil dieser AOB betrug je nach Bildausschnitt ungefähr zwischen 20% und 60%, was einen deutlichen Unterschied zu den anderen untersuchten Biofilmreaktoren darstellte. Die nach außen hin nicht veränderte Nitrifikationsleistung in BFR 4 wurde also von einer Populationsverschiebung innerhalb der AOB begleitet, wobei der Anteil der halophilen und halotoleranten Arten von *Nitrosomonas* stark abnahm. Eine Änderung der Populationszusammensetzung der AOB wurde auch in anderen Arbeiten festgestellt (vergl. Tabelle 2.4). So fanden Okabe et al. [232], dass der Wechsel von häuslichem auf synthetisches Abwasser eine Verschiebung zu den halotoleranten *Nitrosomonas*-Arten bewirkte. Ebenso dominierte diese Fraktion in älteren autotrophen Biofilmen, wie es auch in der vorliegenden Arbeit der Fall war. Ein verstärktes Auftreten von *Nitrospira*, die in Abwassersystemen nur selten gefunden wurden, wurde z.B. bei geringen Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff und bei erhöhten Temperaturen beobachtet [185]. Ballinger et al. [203] untersuchten die AOB-Zusammensetzung bei verschiedenen C/N-Verhältnissen. Nach einer ersten Erhöhung von C/N verringerte sich die Nitrifikationsleistung, nach der Rückkehr zum Ausgangsverhältnis konnte die Nitrifikationsleistung wieder vollständig hergestellt werden. Allerdings konnten zu diesem Zeitpunkt die anfänglich im Reaktor vorherrschenden AOB der  $\beta$ -Proteobakterien nicht mehr gefunden werden, so dass die Frage offen blieb, welche Bakterien für die Nitrifikationsleistung verantwortlich waren. Auch die Ammonium-Konzentration besitzt Auswirkungen auf die Zusammensetzung der AOB. Princic et al. [247] stellten reversible Populationsänderungen fest, konnten aber aufgrund reiner PCR-Untersuchungen keine Aussagen über die Identität der AOB machen. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass trotz der Kenntnis vieler AOB die Frage offen ist, welche Bakterien sich unter welchen Bedingungen in Abwassersystemen etablieren und wie das durch Einstellung der Betriebsparameter gesteuert werden kann. Welchen Bakteriengruppen die nicht mit der NEU-Sonde detektierbaren AOB angehörten, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht näher untersucht. In Frage kommen Vertreter der *Nitrospira*, die allerdings in Abwassersystemen bisher nur selten gefunden wurden. Vermutlich kann unter den eingesetzten Hybridisierungsbedingungen *Nitrosomonas ureae* mit Hilfe der Sonde Nso190 nachgewiesen werden [225], nicht jedoch mit der Sonde NEU [232], so dass *N. ureae* ebenfalls in Frage kommt.

#### 4.9.4 Populationsanalyse bei Dosierung von Abwasser 5

Bei der Zugabe des unbehandelten Abwassers 5 hatte sich gezeigt, dass die DOC-Elimination zu Beginn relativ niedrig war und erst gegen Ende der ersten Versuchsphase auf Werte um 60 % stieg. In Phase 2 konnte eine weitere Erhöhung auf bis zu 75 % festgestellt werden (vergl. Abbildung 4.30). Mit der Verbesserung der DOC-Elimination trat auch eine Stabilisierung der Nitrifikationsleistung ein. Ein sichtbarer Einfluss auf die Populationszusammensetzung der Nitrifikanten konnte dagegen nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zum ozonten Abwasser 5 ähnelte die Populationszusammensetzung der bei Dosierung der biologisch leicht abbaubaren Substanzen in BFR 2 und BFR 3. Als heterotrophe Bakterien wurden wiederum einige  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Proteobakterien sowie wenige nicht-AOB  $\beta$ -Proteobakterien identifiziert. Ebenso wurden nur wenige AOB nicht mit der Sonde NEU detektiert. *Nitrospira* konnte über den ganzen Versuchszeitraum in großer Anzahl gefunden werden (s. Abbildung 4.38).

Die Effekte von Abwasser 5 und Acetat/Pyruvat auf die Nitrifikation und die Populationszusammensetzung der Nitrifikanten waren zwar ähnlich, die Gründe hierfür aber vermutlich unterschiedlich. Während die biologisch leicht abbaubaren Substanzen insbesondere zu Beginn der Dosierung das Wachstum heterotropher Mikroorganismen förderte, die somit eine Konkurrenz für die Nitrifikanten darstellten, können die biologisch schwer abbaubaren Substanzen von Abwasser 5 eine Hemmwirkung ausgeübt haben. Diese Hemmwirkung wäre dann reduziert, wenn durch die Etablierung von heterotrophen Bakterien die Elimination der verantwortlichen Substanzen verbessert wird.

#### 4.9.5 Zusammenfassung: Populationsanalyse System 2

Die Dosierung des Abwassers 5 nach Ozonung zu einem autotroph betriebenen Biofilmreaktor bewirkte eine Änderung in der Populationszusammensetzung der Ammonium-Oxidierer, während die Aktivität der Nitrifikation nicht beeinträchtigt, sondern eher stabilisiert wurde. Es entwickelte sich verstärkt eine Population an AOB, die nicht mit der Sonde NEU nachzuweisen war, und somit nicht zu den halophilen oder halotoleranten Vertretern von *Nitrosomonas* zählten. Diese formten weniger dichte Zellhaufen und waren auch in den anderen untersuchten Systemen nachzuweisen, allerdings nur in geringer Anzahl. Zu welcher Gruppe der AOB diese Bakterien gehörten, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht geklärt werden.

Das unbehandelte Abwasser 5 beeinträchtigte die Nitrifikation zu Beginn der Dosierung. Im Verlauf von Phase 1 stieg die DOC-Elimination an, was zu einer Wiederherstellung der Nitrifikationsleistung führte, welche auch bei der Erhöhung der DOC-Konzentration in Phase 2 konstant blieb. Dies zeigt, wie wichtig das Zusammenspiel verschiedener Mikroorganismenpopulationen in einem Abwassersystem

ist. Die Zusammensetzung der AOB zeigte keine Veränderungen im Vergleich zum autotrophen Biofilm oder bei Dosierung von Acetat und Acetat/Pyruvat.

*Nitrospira* als Vertreter der NOB konnte in allen Systemen, insbesondere bei Dosierung von Acetat, AbWa5 ozont und AbWa5 in großer Zahl detektiert werden. Da nur wenige  $\alpha$ -Proteobakterien nachgewiesen werden konnten, konnte die mögliche Anwesenheit von *Nitrobacter* vernachlässigt werden. Eine Beeinträchtigung der Nitrit-Oxidation konnte im Gegensatz zur Ammonium-Oxidation nur selten festgestellt werden, so dass gefolgert werden kann, dass *Nitrospira* weniger anfällig gegenüber äußeren Störeinflüssen ist.

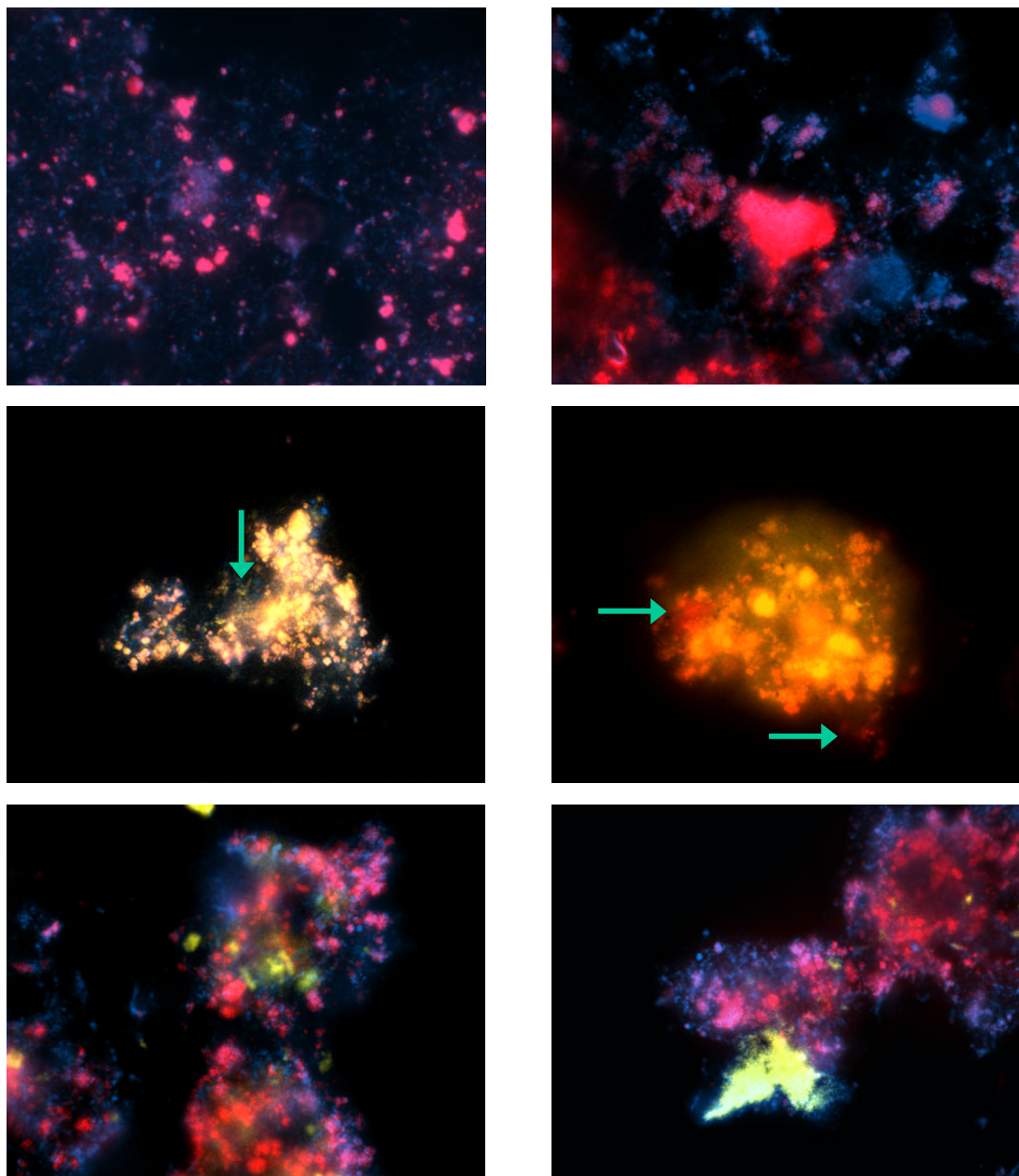


Abbildung 4.34: FISH-Analyse des Kontrollreaktors BFR 1. Links und rechts oben: DAPI (blau, Gesamtzellzahl), Sonde BET42a (rot). Mitte links: Sonden BET42a (gelb) und Nso190 (rot), Pfeil zeigt nur mit BET42a gefärbte Zellen an. Mitte rechts: Sonden Nso190 (rot) und NEU (gelb), die Pfeile zeigen nur mit Nso190 gefärbte Zellen an. Links und rechts unten: Sonden Nso190 (rot) und Ntspa712 (gelb).



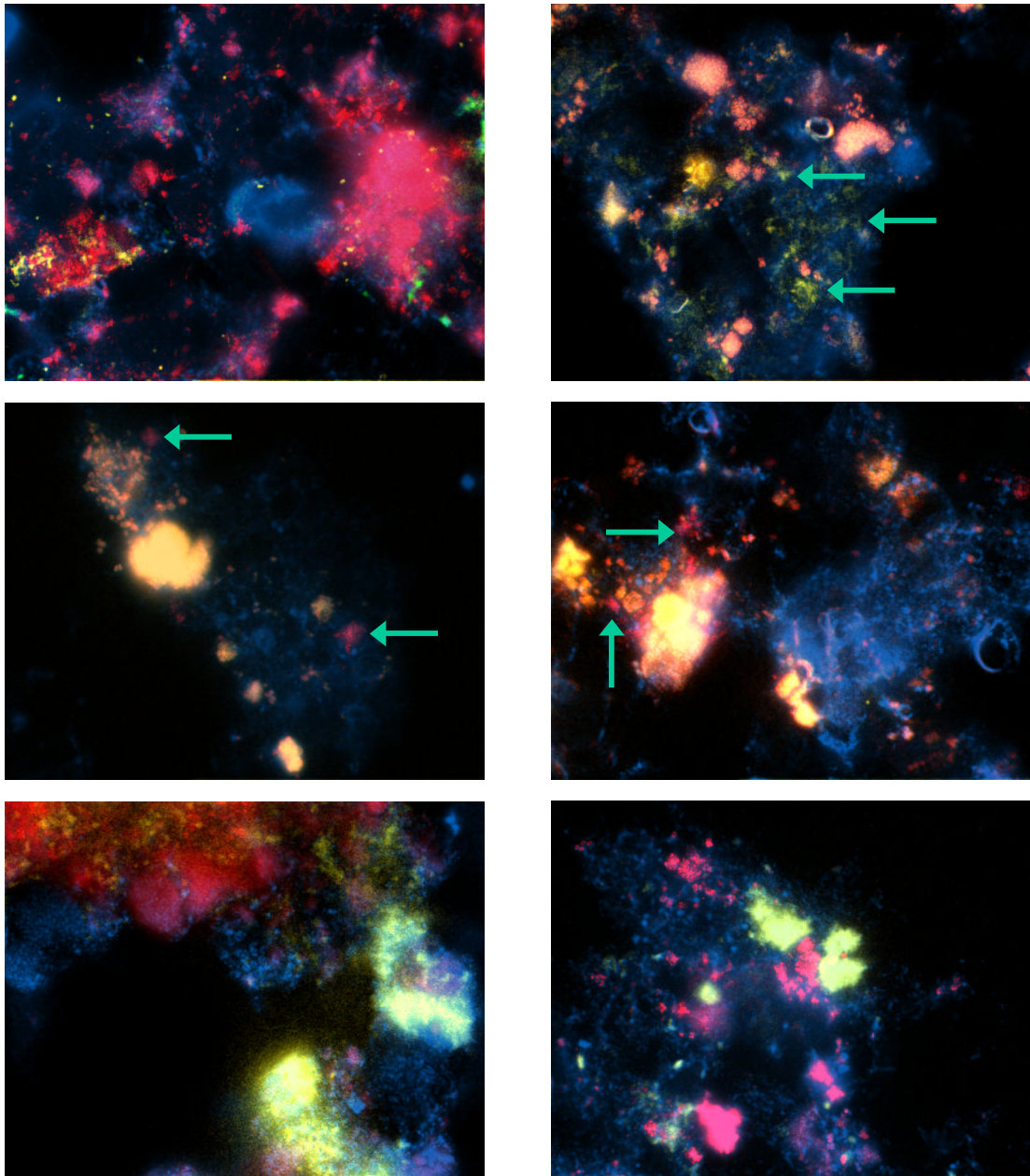


Abbildung 4.35: FISH-Analyse von BFR 2, Dosierung von Acetat, Ende Phase 2. Blau: Gesamtzellfärbung mit DAPI. Links oben: Sonden BET42a (rot), ALF1b (grün), GAM42a (gelb), oben rechts: BET42a (gelb), Nso190 (rot), die Pfeile markieren nur mit BET42a gefärbte Zellen. Mitte links und rechts: Sonden Nso190 (rot) und NEU (gelb), die Pfeile zeigen nur mit Nso190 gefärbte Zellen an. Links und rechts unten: Sonden Nso190 (rot) und Ntspa712 (gelb), linkes Bild: Aufnahme gegen Ende Phase 1, gehäuftes Auftreten von *Nitrospira*, rechtes Bild: Aufnahme gegen Ende Phase 2.

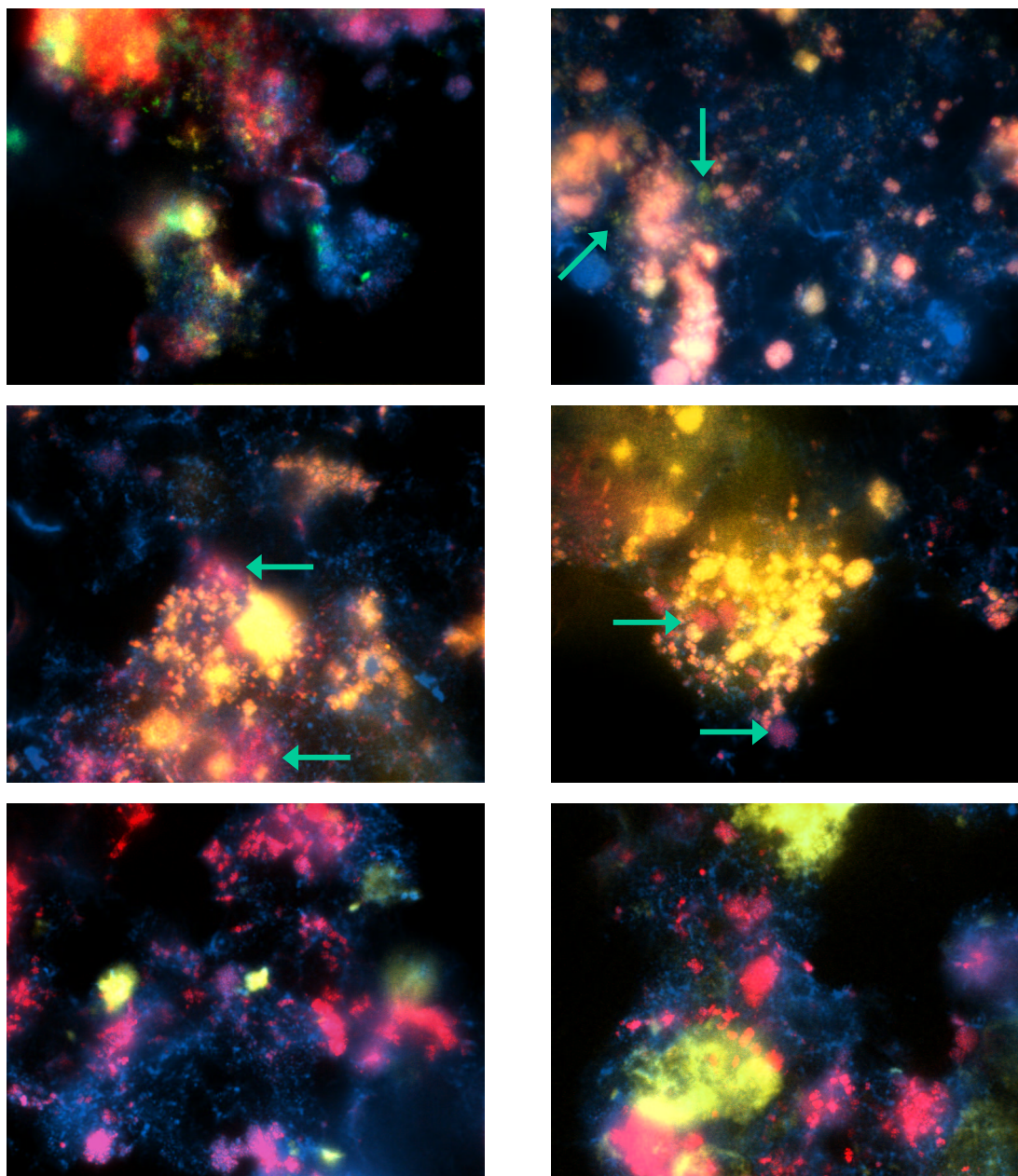


Abbildung 4.36: FISH-Analyse von BFR 3, Dosierung von Acetat und Pyruvat, Ende Phase 2. Blau: Gesamtzellfärbung mit DAPI. Links oben: Sonden BET42a (rot), ALF1b (grün), GAM42a (gelb), oben rechts: BET42a (gelb), Nso190 (rot), die Pfeile markieren nur mit BET42a gefärbte Zellen. Mitte links und rechts: Sonden Nso190 (rot) und NEU (gelb), die Pfeile zeigen nur mit Nso190 gefärbte Zellen an. Links und rechts unten: Sonden Nso190 (rot) und Ntspa712 (gelb).



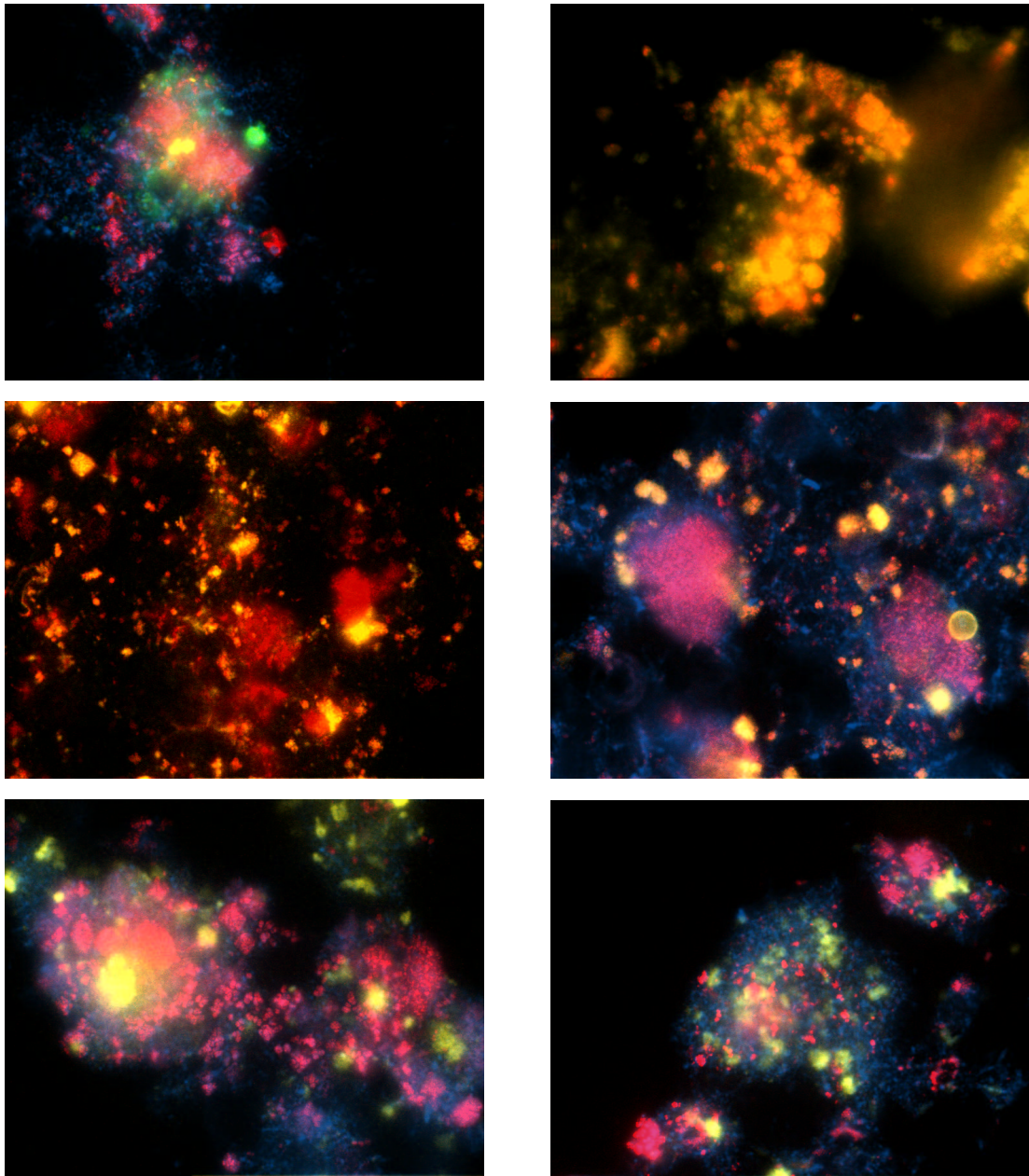


Abbildung 4.37: FISH-Analyse von BFR 4, Dosierung von Abwasser 5 nach Ozonung, Ende Phase 2. Blau: Gesamtzellfärbung mit DAPI. Links oben: Sonden BET42a (rot), ALF1b (grün), GAM42a (gelb), oben rechts: BET42a (gelb), Nso190 (rot), nur gelb gefärbte Zellen bilden teilweise eine Schicht um die AOB. Mitte links und rechts: Sonden Nso190 (rot) und NEU (gelb), große Anteile der AOB binden die Sonde NEU nicht. Links und rechts unten: Sonden Nso190 (rot) und Ntspa712 (gelb).

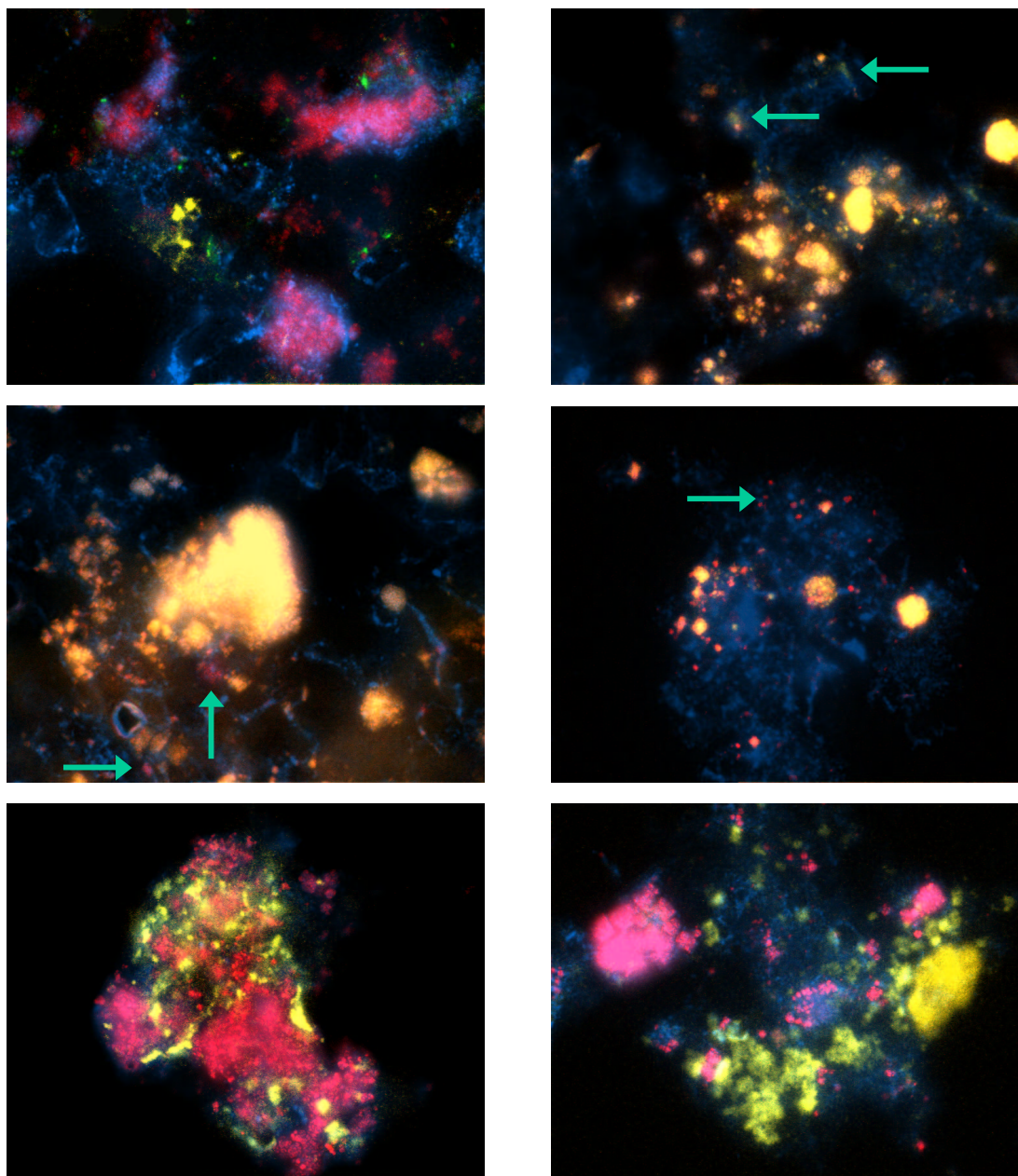


Abbildung 4.38: FISH-Analyse von BFR 6, Dosierung von Abwasser 5, Ende Phase 2. Blau: Gesamtzellfärbung mit DAPI. Links oben: Sonden BET42a (rot), ALF1b (grün), GAM42a (gelb), oben rechts: BET42a (gelb), Nso190 (rot), die Pfeile markieren nur mit Sonde BET42a gefärbte Zellen. Mitte links und rechts: Sonden Nso190 (rot) und NEU (gelb), die Pfeile markieren nur mit Sonde Nso190 gefärbte Zellen. Links und rechts unten: Sonden Nso190 (rot) und Ntspa712 (gelb), linkes Bild: Aufnahme gegen Ende Phase 1, rechtes Bild: Aufnahme gegen Ende Phase 2, jeweils hohe Abundanz von *Nitrospira*.

# Kapitel 5

## Zusammenfassung

Die kombiniert chemisch-biologische Abwasserbehandlung hat zum Ziel, toxische oder refraktäre Substanzen aus dem Abwasser zu entfernen und einen effektiven Gesamtabbau der Fracht zu erreichen. Einen entscheidenden Einfluss hat dabei die chemische Voroxidation. Hierbei sollen die Substanzen soweit abgebaut oder verändert werden, dass der nachfolgende Einsatz einer biologischen Stufe effektiv wird. Eine biologische Reinigung ist meist das kostengünstigste Verfahren zur Abwasserreinigung, so dass die chemische Oxidation dahingehend ausgelegt werden sollte, in Kombination mit dieser einen höchstmöglichen Wirkungsgrad zu erzielen.

Ziel dieser Arbeit war, die Effekte einer chemischen Abwasseroxidation auf eine biologische Reinigungsstufe zu untersuchen. Als Oxidationsverfahren dienten die aktivierten Oxidationsverfahren (AOP) unter Einsatz von Ozon, Wasserstoffperoxid und UV-Bestrahlung, die als Alternativen zu Nieder- und Hochdruckoxidationen bei der Behandlung von Abwasserteilströmen dienen können. Die Untersuchung erfolgte mit Hilfe der klassischen Methoden wie der Toxizitätsmessung im Leuchtbakterienhemmtest und der Messung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB). Um eine weitergehende Beurteilung der chemischen Oxidationsstufe zu erhalten, wurden kontinuierlich betriebene Abbauexperimente in Festbettbiofilmreaktoren durchgeführt, in denen die Phänomene der Adaptation, des cometabolischen Abbaus sowie der Populationsverschiebung innerhalb der bakteriellen Biozönose untersucht wurden. Hierbei wurde der Schwerpunkt auf die Nitrifikation als wichtigen Abbauvorgang in Kläranlagen gelegt, indem die Nitrifikationsaktivität sowie die Populationszusammensetzung der Ammonium- und der Nitrit-Oxidierer bestimmt wurde.

**Chemisch-biologische Abwasserbehandlung** Anhand fünf verschiedener Abwasserteilströme aus der chemischen Industrie wurde die Kombination aus chemischer Voroxidation und biologischem Abbau untersucht. Als Beurteilungsgrößen dienten Summenparameter, eine begrenzte Einzelstoffanalytik sowie die Toxizität. Es zeigte sich, dass die Ozonung in den meisten Fällen bereits einen guten Abbau

der Parameter chemischer Sauerstoffbedarf (CSB) und gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) lieferte. Der Ausbeutekoeffizient ( $\Sigma$  Oxidationsmittelmenge/ $\Delta$  CSB) lag im Bereich von 1,8 bis 4 g/g. Eine weitere Verbesserung erzielte insbesondere das Peroxon-Verfahren, die Kombination von Ozon und Wasserstoffperoxid. Der Ausbeutekoeffizient verbesserte sich teilweise, so dass der zusätzliche Einsatz von Wasserstoffperoxid gerechtfertigt werden konnte. Demgegenüber erwiesen sich die Verfahren unter Verwendung zusätzlicher UV-Bestrahlung als weniger geeignet, da aufgrund der hohen Eigenabsorption der verwendeten Abwässer im UV-Wellenlängenbereich die Oxidationswirkung verringert war. Dies traf insbesondere bei der Wasserstoffperoxid/UV-Oxidation zu.

Die für einen effektiven Abbau der Fracht nötigen Oxidationsmittelmengen unterschieden sich bei den verschiedenen Abwässern teilweise deutlich. Im Falle von **Abwasser 1** (Synthese von Oxazolamid) betrug bei der Ozonung das molare Ozon:DOC-Verhältnis 0,125, wodurch bereits eine CSB-Verringerung von ca. 70 % in der Kombination Oxidation-biologischer Abbau erreicht werden konnte. Dabei war der biologische Abbau für einen Großteil der Verringerung verantwortlich. Die Toxizität nach Oxidation war nur leicht erhöht und wurde durch den biologischen Abbau entfernt. Für die Oxidation von **Abwasser 2** (Synthese von DNS) erwies es sich als notwendig, eine höhere Oxidationsmitteldosis einzusetzen. Im Peroxon-Verfahren mit einem Verhältnis von Ozon:DOC:Wasserstoffperoxid von 1:1: $\frac{1}{3}$  kombiniert mit biologischem Abbau konnten 80 % des CSB eliminiert werden, wobei hier die chemische Oxidation den Hauptanteil ausmachte. Obwohl die Toxizität nach Oxidation stark erhöht war, hatte dies nur einen geringen Einfluss auf den biologischen Abbau, da die Toxizität durch die biologische Stufe entfernt wurde. Bei **Abwasser 3** (Synthese von Tinopal UP) war eine chemische Voroxidation nicht sinnvoll, da bereits ca. 60 % des CSB durch eine rein biologische Behandlung eliminiert werden konnten. Somit erwies sich hier eine nachgeschaltete chemische Oxidation als vorteilhaft, da die Oxidation auf den refraktären Anteil der Abwasserinhaltsstoffe beschränkt werden konnte. Durch diese veränderte Verfahrensführung (Oxidation mit Hilfe des Peroxon-Verfahrens) konnte ein Gesamteliminierung des CSB von über 80 % erreicht werden. Eine weitere Verbesserungsmöglichkeit liegt im Einsatz einer höheren Oxidationsmitteldosis, da die DOC-Konzentration nach biologischem Abbau deutlich verringert war und somit eine höhere Dosis nicht eine wesentlich höhere Menge an Oxidationsmitteln bedeutete. Problematisch bei der Behandlung von **Abwasser 4** (Synthese von Tinopal DMS) war die starke Schaumbildung bei Einsatz von Ozon, die eine genaue Beurteilung der Oxidationsverfahren erschwerte, da folgerichtig in relativ hoher Verdünnung gearbeitet werden musste. Hier wäre ein optimiertes Reaktordesign notwendig, um Ozon effektiv ohne die Bildung von Schaum ins Abwasser eintragen zu können. Für **Abwasser 5** erwies sich wiederum die reine Ozonung als geeignetes Verfahren. Jedoch wurden bei einem Ozon:DOC-Verhältnis von 0,25 im kombiniert chemisch-biologischen Verfahren nur ca. 40 %

des CSB eliminiert. Ebenso erhöhte sich die Toxizität nach Oxidation deutlich und konnte durch die biologische Behandlung nur teilweise eliminiert werden, während das Abwasser nach reiner biologischer Behandlung nicht mehr toxisch war, obwohl dort die CSB-Verringerung nur ca. 20 % betrug. Erst in einer höheren Verdünnung (1:50) erwies sich das ozonte Abwasser 5 als besser biologisch abbaubar, was auf die höhere Verdünnung toxischer Reaktionsprodukte zurückgeführt werden konnte.

**Toxizität** Bei der Beurteilung des Toxizitätsverhaltens der oxidierten Abwasserproben war zu beachten, dass teilweise hohe Restkonzentrationen an nicht reagiertem Wasserstoffperoxid einen großen Einfluss besaßen. Ebenso wurde bei Abwasser 5 die Entstehung von Wasserstoffperoxid im Oxidationsprozess beobachtet. Aus diesem Grund sollte gewährleistet sein, dass vor der weiteren biologischen Behandlung möglichst keine Restkonzentrationen des Oxidationsmittels im Abwasser vorliegen. Dies kann durch eine optimierte Verfahrensführung oder geeignete Zerstörung des Oxidationsmittels erfolgen. Jedoch wurde festgestellt, dass eine erhöhte Toxizität im Leuchtbakterienhemmtest nicht in allen Fällen eine direkte Aussage auf die biologische Abbaubarkeit der Abwasserinhaltsstoffe zulässt. Im Falle von Rest-Wasserstoffperoxid kann dabei eine Zerstörung durch enzymatische Reaktionen vermutet werden. In realen Systemen besteht weiterhin die Möglichkeit, dass restliches Wasserstoffperoxid bei Einleitung des Teilstromes in eine Kläranlage mit den dort vorhandenen gelösten Substanzen oder suspendierten Partikeln schnell abreagiert. Im Falle toxischer Substanzen im Leuchtbakterienhemmtest ist die Übertragung auf gemischte Bakterienpopulationen nicht immer möglich, da diese wesentlich unempfindlicher sein können, was auf Adaptationsvorgängen und verschiedenen Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Bakterienarten beruht. Somit sollten Toxizitätstest möglichst gut das reale System widerspiegeln, was z.B. durch den Einsatz kontinuierlich betriebener Reaktoren und einer entsprechenden Biozönose erreicht werden kann.

**Einzelstoffanalytik** Im Falle der Abwässer aus der Produktion von DNS und der optischen Aufheller konnte in **Abwasser 4** die Substanz 4,4-Bis[(4-anilino-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl) amino]stilben-2,2-disulfonat (Tinopal DMS) identifiziert werden. Ebenso entsprachen einige Oxidationsprodukte denen, die bei der Oxidation der Einzelsubstanz entstanden waren. Diese konnten jedoch nicht identifiziert werden. Es konnte aufgrund der Analyse des Absorptionsverhaltens und der Einzelsubstanzanalytik davon ausgegangen werden, dass in Abwasser 4 eine Vielzahl weiterer Stoffe vorlag, die zwar ähnliche Absorptionseigenschaften wie der optische Aufheller besaßen, sich aber in den Fluoreszenzeigenschaften und somit in der Struktur unterschieden.

Die detaillierte Verfolgung einer Einzelsubstanz in komplexen Mischabwässers ist



dann sinnvoll, wenn diese Substanz in relevanter Konzentration vorliegt und für eine bestimmte Eigenschaft des Abwassers wie Toxizität oder schlechte biologische Abbaubarkeit verantwortlich ist. In den anderen Fällen ist eine Beurteilung anhand von Summenparametern vorteilhaft. Neben den bereits erwähnten Summenparametern erwies sich dabei die gelchromatographische Auftrennung des DOC in Fraktionen (LC-DOC) als geeignetes Instrument zur qualitativen Beschreibung der Oxidationswirkung und Abbauleistung der chemischen und biologischen Verfahren.

Das einzige hier untersuchte Abwasser mit einer gut definierten Zusammensetzung war **Abwasser 5** (Synthese von Propyldioxepin). Während Propyldioxepin und Butendiol durch die Oxidationsverfahren relativ gut abgebaut wurden, erwies sich Butyraldehyd als schwerer oxidierbar. Jedoch war hier der Grad der Mineralisation höher und die durch Oxidation erhöhte Toxizität konnte beim biologischen Abbau vollständig entfernt werden. Aufgrund der LC-DOC Untersuchung war festzustellen, dass eine gegenseitige Beeinflussung der drei Hauptinhaltsstoffe und derer Oxidationsprodukte bei der Oxidation von Abwasser 5 keine bedeutsame Rolle spielte. Somit konnten anhand der Ergebnisse aus den Einzelsubstanzuntersuchungen die verschiedenen Eigenschaften des Abwassers jeweils einer oder mehreren der Einzelsubstanzen zugeschrieben werden.

**Abwasserbehandlung in Biofilmreaktoren** In kontinuierlich betriebenen Festbettbiofilmreaktoren wurde die biologische Abbaubarkeit von **Abwasser 5** vor sowie nach Ozonung untersucht. Die Auswahl dieses Abwassers erfolgte aus dem Grund, da das unbehandelte Abwasser sowie das ozonte Abwasser gegensätzliche Eigenschaften hinsichtlich ihres Verhaltens im Toxizitätstest und beim biologischen Abbau besaßen. In einem ersten Experiment wurde der cometabolische Abbau bei Anwesenheit von synthetischem Abwasser (SAW) näher betrachtet. Diente nur das ozonte Abwasser ohne SAW als Nährmedium, entsprach der Anteil des eliminierbaren DOC ungefähr dem aus dem BSB-Versuch (30 % in einer 1:50-Verdünnung). Wurde SAW zugegeben, erhöhte sich der anteilige DOC-Abbau des ozonten Abwassers auf 75 %. Ebenso konnte mit Hilfe der CTC/DAPI-Färbung die hohe Aktivität der Mikroorganismen bestätigt werden. Beim unbehandelten Abwasser 5 war der Effekt der SAW-Zugabe ebenso stark ausgeprägt, da ohne SAW kein DOC-Abbau stattfand, mit SAW aber ein Abbau von ca. 50 % erreicht wurde. Das ozonte Abwasser wurde bei der Passage des Biofilmreaktors vollständig detoxifiziert. Diese Ergebnisse zeigten, wie wichtig bei der Beurteilung der biologischen Abbaubarkeit folgende Faktoren sind:

- Verdünnungsverhältnisse von Abwasserteilströmen bei Zusammenführung in der Kläranlage,
- Anwesenheit biologisch leicht abbaubarer Verbindungen,
- Zusammenspiel verschiedener Bakterienarten (Cometabolismus, Synergismus),



- Adaptation des Systems.

Zusätzlich wurde in einem weiteren Experiment die Auswirkung von **Abwasser 5** vor und nach Ozonung auf die bakterielle Nitrifikation untersucht. Die Nitrifikation stellt einen wichtigen Prozess für die Stickstoffelimination in Kläranlagen dar. Da die meisten Nitrifikanten einen autotrophen Stoffwechsel besitzen ( $\text{CO}_2$  als C-Quelle, Sauerstoff als Elektronenakzeptor), stehen sie in Konkurrenz zu den aeroben, heterotrophen Bakterien, die organische C-Quellen nutzen und über höhere Wachstumsraten verfügen. Es zeigte sich, dass die Zugabe des ozonten Abwassers trotz der erhöhten Toxizität keinen negativen Effekt auf die Nitrifikation besaß, sondern diese sogar stabilisierte. Gleichzeitig wurde eine hohe DOC-Elimination von über 80 % erzielt. Das bedeutete, dass hier nicht die Anwesenheit biologisch leicht abbaubarer C-Quellen nötig war, sondern das Zusammenspiel autotropher und heterotropher Bakterienpopulationen sowohl die Nitrifikation als auch die DOC-Elimination förderte. Demgegenüber konnte zu Beginn des Experiments bei Zugabe des unbehandelten Abwassers eine Störung der Ammonium-Oxidation beobachtet werden. Jedoch zeigte sich im Verlauf des Versuchs, dass bei Etablierung einer heterotrophen Bakterienpopulation und damit einhergehend einer erhöhten DOC-Elimination (ca. 70 %) die Nitrifikation wieder vollständig verlief und auch bei Erhöhung der DOC-Konzentration stabil blieb. Ähnliche Auswirkungen besaß die Zugabe biologisch leicht abbaubarer C-Quellen (Acetat und Pyruvat). Hier wurde die Nitrifikation, v.a. die Ammonium-Oxidation, ebenfalls zeitweise gehemmt, was hier aber mit der direkten Konkurrenz der Nitrifikanten mit den schnell wachsenden heterotrophen Bakterien begründet werden konnte.

**Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung** Im Verlauf der Untersuchungen in den Festbettbiofilmreaktoren wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Biofilmproben entnommen und hinsichtlich ihrer Bakterienzusammensetzung mit Hilfe der Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) untersucht. Für das Abwassersystem mit SAW und **Abwasser 5** nach Ozonung als C-Quelle wurden die Untergruppen der Proteobakterien untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in mit SAW-betriebenen Reaktoren die  $\beta$ -Untergruppe den Großteil der mit FISH nachweisbaren Bakterien darstellte, jedoch die  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Untergruppen weniger stark repräsentiert waren. Der Anteil der  $\gamma$ -Untergruppe ging bei zusätzlicher Dosierung vom ozonten Abwasser 5 zurück. Weitere Effekte in der Populationszusammensetzung konnten mit den eingesetzten Gensonden nicht detektiert werden. Der Einsatzbereich der Methode der FISH erwies sich für diese allgemeine Populationsanalyse als begrenzt, was auf folgende Effekte zurückgeführt werden konnte:

- Der Anteil der mit einem beschränkten Set von Gensonden detektierbaren Bakterien ist zu niedrig (keine Erfassung z.B. anderer Untergruppen der Proteobakterien oder der gram-positiven Bakterien),

- Änderungen innerhalb einer Untergruppe können nicht erkannt werden,
- die Anzahl der verschiedenen verwertbaren Stoffen in einem Mischabwasser ist hoch und bewirkt keine oder nur eine geringe Selektion einer Bakterienart,
- die Fähigkeit zur Verstoffwechslung von C-Quellen ist nur selten an die Phylogenie der Bakterien gebunden, worauf die FISH-Analyse jedoch beruht.

Ist in einem Abwasser also nicht von der Selektion bestimmter Bakterienarten auszugehen, die z.B. auf den Abbau einer wichtigen organischen Abwasserkomponente spezialisiert sind (z.B. Schadstoffabbau), so kann die FISH-Analyse auf diejenigen Bakteriengruppen angewendet werden, die entweder neben der DOC-Elimination weitere, für den Abwasserbereich wichtige Stoffwechselleistungen erbringen (Nitrifikation, Phosphatelimination) oder unerwünschte Eigenschaften besitzen (z.B. Blähschlamm Bildung) und deren Vertreter größtenteils oder zumindest teilweise bekannt sind.

Die in dieser Arbeit durchgeführte Populationsanalyse der Nitrifikanten bei Dosierung von Abwasser 5 vor und nach Ozonung basierte auf einem hierarchischen SONDENSET zur Identifizierung der Ammonium-oxidierenden Bakterien (AOB) sowie dem Nachweis von *Nitrospira* als Vertreter der Nitrit-Oxidierer. Hierbei zeigte sich ein deutlicher Effekt bei Zugabe des ozonten Abwassers. Während die Nitrifikationsleistung wie oben erwähnt nach außen hin stabil blieb, konnte eine Verschiebung innerhalb der Populationszusammensetzung der AOB festgestellt werden. Es entwickelte sich eine große Anzahl von AOB, die nicht zu den halotoleranten Arten von *Nitrosomonas* gehörten und die weniger dichte und sphärisch ausgebildete Zellhaufen formten. Der Anteil dieser AOB betrug je nach untersuchtem Bildausschnitt zwischen 20 und 60 % und war damit signifikant höher als in den Kontrollreaktoren sowie bei Zugabe des unbehandelten Abwassers. Eine genaue Zuordnung dieser AOB wurde nicht durchgeführt, möglich ist eine Zugehörigkeit zur Gruppe der *Nitrospira*, die in Abwassersystemen allerdings selten auftreten, oder z.B. zu *Nitrosomonas ureae*. Abwasser 5 bewirkte keine Änderung in der Populationsstruktur der AOB, was dem Ergebnis bei Zugabe der biologisch leicht eliminierbaren Substanzen Acetat und Pyruvat entsprach. *Nitrospira* konnte in allen Reaktoren als wichtigster Vertreter der NOB identifiziert werden. Der Anteil von  $\alpha$ -Proteobakterien war in allen Fällen sehr gering, so dass nicht von einem relevanten Auftreten von *Nitrobacter* auszugehen war. Insbesondere bei Zugabe von Abwasser 5 (unbehandelt und ozont) war eine hohe Abundanz von *Nitrospira* festzustellen. Die wichtigsten allgemeinen Aussagen lassen sich somit wie folgt formulieren:

- ein im Leuchtbakterienhemmtest als toxisch eingestuftes Abwasser muss nicht zwangsläufig einen negativen Effekt auf die Nitrifikationsleistung bewirken,

- eine nach außen unbeeinflusste Nitrifikationsleistung kann von einer deutlichen Verschiebung der Populationszusammensetzung der AOB begleitet sein,
- die Hemmwirkung organischer C-Quellen auf die Nitrifikanten ergibt sich einmal aus der direkten Konkurrenz mit heterotrophen Bakterien bei Zugabe leicht abbaubarer C-Quellen, andererseits kann bei schwer abbaubaren Verbindungen die Nitrifikationsleistung nach einer anfänglichen Störung durch die Etablierung einer heterotrophen Population und damit der Elimination hemmender Substanzen wieder verbessert werden,
- Die Fähigkeit zum mixotrophen Stoffwechsel kann für *Nitrospira* als Wettbewerbsvorteil in Abwassersystemen angesehen werden.

Die Populationanalyse der AOB zeigt die Komplexität der beteiligten Bakteriengruppen an. In der Zukunft ist hier durch den Einsatz weiterer Methoden zur Funktionsaufklärung und Bakterienidentifizierung eine verbesserte Kenntnis der Stoffwechselforgänge in Abwassersystemen zu erwarten. Auf der Grundlage klassischer Beurteilungsparameter wie CSB- oder Stickstoff-Elimination, BSB-Messung und Toxizität ermöglicht die Populationsanalyse die Untersuchung der Vorgänge, die sich in der für die Abbauvorgänge verantwortlichen Mikroorganismenpopulation abspielen. Somit muss ein Bioreaktor oder eine Kläranlage nicht mehr als *black-box* angesehen werden. Denkbar ist vielmehr, dass durch Einstellung der Verfahrensparameter gezielt auf die Bakterienzusammensetzung eingewirkt und eine Verbesserung des Prozesses erreicht werden kann.



# Literaturverzeichnis

- [1] M. JEWORSKI UND E. HEINZLE: *Combined chemical-biological treatment of wastewater containing refractory pollutants*. Biotechnol. Annu. Rev., 6:163–196, 2000.
- [2] P. NISIPEANU: *Wasserrechtliche Grundlagen*. In: J. BEVER, A. STEIN UND H. TEICHMANN (Herausgeber): *Weitergehende Abwasserreinigung*, Seiten 1–22. R. Oldenbourg Verlag, München Wien, 1995.
- [3] J. P. SCOTT UND D. F. OLLIS: *Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: review and recommendations*. Environ. Prog., 14(2):88–103, 1995.
- [4] J. BEVER, A. STEIN UND H. TEICHMANN: *Allgemeine Grundlagen der biologischen Abwasserreinigungsverfahren*. In: J. BEVER, A. STEIN UND H. TEICHMANN (Herausgeber): *Weitergehende Abwasserreinigung*, Seiten 23–38. R. Oldenbourg Verlag, München Wien, 1995.
- [5] K. MUDRACK UND S. KUNST: *Biologie der Abwasserreinigung*. Gustav Fischer, Jena, 1994.
- [6] G. STUCKI: *Zur Aussagekraft des biologischen Abbautests nach Zahn-Wellens zum Schicksal von chemischen Abwässern in Industriekläranlagen*. GWF Wasser Abwasser, 141(10):662–669, 2000.
- [7] N. CHRISTOFI, E. ASPICHUETA, D. DALZELL, A. DE LA SOTA, J. ETXEBARRIA, T. FERNANDES, M. GUTIERREZ, J. MORTON, U. OBST UND P. SCHMELLENKAMP: *Congruence in the performance of model nitrifying activated sludge plants located in Germany, Scotland and Spain*. Wat. Res., 37:177–187, 2003.
- [8] S. HESSE: *Anwendung von Biofilm-Reaktoren für die Charakterisierung der biologischen Eliminierbarkeit von Abwasserinhaltsstoffen*. Dissertation Universität Karlsruhe (TH), 2001.

- [9] P. A. WILDERER, H.-J. BUNGARTZ, H. LEMMER, M. WAGNER, J. KELLER UND S. WUERTZ: *Modern scientific methods and their potential in wastewater science and technology*. Wat. Res., 36:370–393, 2002.
- [10] Z. YUAN UND L. L. BLACKALL: *Sludge population optimisation: a new dimension for the control of biological wastewater treatment systems*. Wat. Res., 36:482–490, 2002.
- [11] R. I. AMANN, L. KRUMHOLZ UND D. A. STAHL: *Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology*. J. Bacteriol., 172(2):762–770, 1990.
- [12] E. F. DELONG, G. S. WICKHAM UND N. R. PACE: *Phylogenetic stains: ribosomal RNA-based probes for the identification of single cells*. Science, 243:1360–1363, 1989.
- [13] M. WAGNER: *Molekulare Funktionsanalyse von Mikroorganismen*. In: BAYERISCHE AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN (Herausgeber): *Rundgespräche der Kommission für Ökologie. Band 23: Bedeutung der Mikroorganismen für die Umwelt*, Seiten 41–54. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, 2002.
- [14] A. HUG, J. HARF, F. VOGEL UND P. R. VON ROHR: *Deactivation of sewage sludge by wet oxidation (WO) using LOPROX process: a complete wastewater plant/WO system with an analysis of wet oxidation products*. Chem. Eng. Technol., 21(11):880–885, 1998.
- [15] K.-E. KÖPPKE: *Industrielle Abwasserbehandlung mit chemischer Nassoxidation - ein Verfahrensüberblick*. Korrespondenz Abwasser, 40(1):62–67, 1993.
- [16] F. VOGEL: *Nassoxidation von Phenol mit Sauerstoff bei milden Bedingungen*. Fortschrittsberichte VDI, Nr. 533, VDI-Verlag, Düsseldorf, 1998.
- [17] A. HUG: *Nassoxidation mit Sauerstoff im Pilotmaßstab*. Fortschrittsberichte VDI, Nr. 517, VDI-Verlag, Düsseldorf, 1998.
- [18] K. BELKACEMI, F. LARACHI, S. HAMOUDI UND A. SAYARI: *Catalytic wet oxidation of high-strength alcohol-distillery liquors*. Appl. Catal. A, 199(2):199–209, 2000.
- [19] Y. MATSUMURA, T. NUNOURA, T. URASE UND K. YAMAMOTO: *Supercritical water oxidation of high concentrations of phenol*. J. Hazard. Mater., 73(3):245–254, 2000.
- [20] P. HÖRSCH UND F. H. FRIMMEL: *Oxidation eines industriellen Mischabwassers mit Ozon und UV/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*. Vom Wasser, 95:119–130, 2000.

- [21] R. G. RICE: *Applications of ozone for industrial wastewater treatment - a review*. Ozone Sci. Eng., 18:477–515, 1997.
- [22] H. GULYAS: *Chemical oxidation process combined with biological wastewater treatment*. Hamb. Ber. Siedlungswasserwirtsch., 28:90–100, 1999.
- [23] S. BAIG UND P. A. LIECHTI: *Ozone treatment for biorefractory COD removal*. Wat. Sci. Tech., 43(2):197–204, 2001.
- [24] J. B. CARBERRY UND T. M. BENZING: *Peroxide pre-oxidation of recalcitrant toxic waste to enhance biodegradation*. Wat. Sci. Tech., 23:367–376, 1991.
- [25] E. GILBERT: *Einsatz von Wasserstoffperoxid zur Behandlung hochbelasteter Industrieabwässer*. Vom Wasser, 62:307–320, 1984.
- [26] I. TRÖSTER, M. FRYDA, D. HERRMANN, L. SCHÄFER, W. HÄNNI, A. PERRET, M. BLASCHKE, A. KRAFT UND M. STADELMANN: *Electrochemical advanced oxidation process for water treatment using DiaChem electrodes*. Diam. Relat. Mater., 11(3):640–645, 2002.
- [27] J. INIESTA, P. A. MICHAUD, M. PANIZZA UND C. COMNINELLIS: *Electrochemical oxidation of 3-methylpyridine at a boron-doped diamond electrode: application to electroorganic synthesis and wastewater treatment*. Electrochem. Comm., 3:346–351, 2001.
- [28] P. LUBICKI, J. D. CROSS UND S. JAYARAM: *Removal of volatile organic compounds in water using low-energy electron beam*. IEEE Trans. Diel. Electr. Insul., 5(2):219–224, 1998.
- [29] I. A. BALCIOGLU UND M. ÖTKER: *Treatment of pharmaceutical wastewater containing antibiotics by  $O_3$  and  $O_3/H_2O_2$  processes*. Chemosphere, 50:85–95, 2003.
- [30] C. D. ADAMS, P. A. SCANLAN UND N. D. SECRIST: *Oxidation and biodegradability enhancement of 1,4-dioxane using hydrogen peroxide and ozone*. Environ. Sci. Technol., 28:1812–1818, 1994.
- [31] S. LEDAKOWICZ UND M. SOLECKA: *Impact of advanced oxidation processes on the biodegradation kinetics of industrial wastewater*. Wat. Sci. Tech., 41(12):157–164, 2000.
- [32] P. F. BARBIER UND C. PETRIER: *Study at 20 kHz and 500 kHz of the ultrasound-ozone advanced oxidation system: 4-nitrophenol degradation*. J. Adv. Oxid. Technol., 1(2):154–159, 1996.

- [33] B. LEGUBE UND N. KARPEL VEL LEITNER: *Catalytic ozonation. A promising advanced oxidation technology for water treatment.* Catal. Today, 53(1):61–72, 2000.
- [34] J. CHEN, W. H. RULKENS UND H. BRUNING: *Photochemical elimination of phenols and COD in industrial wastewaters.* Wat. Sci. Tech., 35(4):231–238, 1997.
- [35] B.-D. LEE UND M. HOSOMI: *Fenton oxidation of ethanol-washed distillation-concentrated benzo(A)pyrene: reaction product identification and biodegradability.* Wat. Res., 35(9):2314–2319, 2001.
- [36] H. F. SCHRÖDER: *Non-biodegradable wastewater compounds treated by ozone or ozone/UV - conversion monitoring by substance-specific analysis and biotoxicity testing.* Wat. Sci. Tech., 33(6):331–338, 1996.
- [37] I. A. BALCIOGLU UND I. A. ALATON: *Treatment of textile industry wastewater by enhanced photocatalytic oxidation reaction.* J. Adv. Oxid. Technol., 4(2):189–195, 1999.
- [38] X. Z. LI UND M. ZHANG: *Decolorization and biodegradation of dyeing wastewater treated by a TiO<sub>2</sub>-sensitized photo-oxidation process.* Wat. Sci. Tech., 34(9):49–55, 1996.
- [39] H. FREUDENHAMMER, D. BAHNEMANN, L. BOUSSEMI, S.-U. GEISSEN, A. GHIRABI, F. SALEH, A. SI-SALAH, U. SIEMON UND A. VOGELPOHL: *Detoxification and recycling of wastewater by solar-catalytic treatment.* Wat. Sci. Tech., 35(4):149–156, 1997.
- [40] M. RODRIGUEZ, V. SARRIA, S. ESPLUGAS UND C. PULGARIN: *Photo-Fenton treatment of a biorecalcitrant wastewater generated in textile activities. Biodegradability of the photo-treated solution.* J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 151:129–135, 2002.
- [41] D. M. STANBURY: *Reduction potentials involving inorganic free radicals in aqueous solution.* Adv. Inorg. Chem., 33:69–138, 1989.
- [42] O. LEGRINI, E. OLIVEROS UND A. M. BRAUN: *Photochemical processes for water treatment.* Chem. Rev., 93:671–698, 1993.
- [43] G. RUPPERT UND R. BAUER: *UV-O<sub>3</sub>, UV-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, UV-TiO<sub>2</sub> and the photo-Fenton reaction - comparison of advanced oxidation processes for wastewater treatment.* Chemosphere, 28(8):1447–1454, 1994.



- [44] I. A. ALATON, I. A. BALCIOGLU UND D. W. BAHNEMANN: *Advanced oxidation of a relative dyebath effluent: comparison of  $O_3$ ,  $H_2O_2/UV-C$  and  $TiO_2/UV-A$  processes*. *Wat. Res.*, 36:1143–1154, 2002.
- [45] J. HOIGNE: *Chemistry of aqueous ozone and transformation of pollutants by ozonation and advanced oxidation processes*. In: J. HRUBEC (Herausgeber): *The handbook of environmental chemistry. Vol. 5 part C: Quality and treatment of drinking water*, Seiten 83–143. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1998.
- [46] U. VON GUNTEN: *Ozonation of drinking water: part I. Oxidation kinetics and product formation*. *Wat. Res.*, 37:1443–1467, 2003.
- [47] M. STERN, E. HEINZLE, O. M. KUT UND K. HUNGERBÜHLER: *Removal of substituted pyridines by combined ozonation/fluidized bed biofilm treatment*. *Wat. Sci. Tech.*, 35(4):329–335, 1997.
- [48] A. MARCO, S. ESPLUGAS UND G. SAUM: *How and why combine chemical and biological processes for wastewater treatment*. *Wat. Sci. Tech.*, 35(4):321–327, 1997.
- [49] S. LIAKOU, S. PAVLOU UND G. LYBERATOS: *Ozonation of azo dyes*. *Wat. Sci. Tech.*, 35(4):279–286, 1997.
- [50] F. H. FRIMMEL UND A. WOLF: *Zur Anwendung von Wasserstoffperoxid in der Trinkwasseraufbereitung*. *GWf Wasser Abwasser*, 137(5):266–270, 1996.
- [51] W. H. GLAZE, J.-W. KANG UND D. H. CHAPIN: *The chemistry of water treatment processes involving ozone, hydrogen peroxide and ultraviolet radiation*. *Ozone Sci. Eng.*, 9:335–352, 1987.
- [52] C. VON SONNTAG UND H.-P. SCHUCHMANN: *The elucidation of peroxy radical reactions in aqueous solution with the help of radiation-chemical methods*. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 30:1229–1253, 1991.
- [53] R. BAUER, G. WALDNER, H. FALLMANN, S. HAGER, M. KLARE, T. KRUTZLER, S. MALATO UND P. MALETZKY: *The photo-Fenton reaction and the  $TiO_2/UV$  process for waste water treatment - novel developments*. *Catal. Today*, 53(1):131–144, 1999.
- [54] S. H. BOSSMANN, E. OLIVEROS, S. GÖB, S. SIEGWART, E. P. DAHLEN, L. PAYAWAN JR., M. STRAUB, M. WÖRNER UND A. M. BRAUN: *New evidence against hydroxyl radicals as reactive intermediates in the thermal and photochemically enhanced Fenton reaction*. *J. Phys. Chem. A*, 102:5542–5550, 1998.

- [55] W. GERNJAK, T. KRUTZLER, A. GLASER, S. MALATO, J. CACERES, R. BAUER UND A. R. FERNANDEZ-ALBA: *Photo-Fenton treatment of water containing natural phenolic pollutants*. Chemosphere, 50:71–78, 2003.
- [56] J. P. SCOTT UND D. F. OLLIS: *Integration of chemical and biological oxidation processes for water treatment: II. Recent illustrations and experiences*. J. Adv. Oxid. Technol., 2(3):374–381, 1997.
- [57] R. KRULL, M. HEMMI, P. OTTO UND D. C. HEMPEL: *Combined biological and chemical treatment of highly concentrated residual dyehouse liquors*. Wat. Sci. Tech., 38(4-5):339–346, 1998.
- [58] A. LOPEZ, G. RICCO, R. CIANNARELLA, A. ROZZI, A. C. DI PINTO UND R. PASSINO: *Textile wastewater reuse: ozonation of membrane concentrated secondary effluent*. Wat. Sci. Tech., 40(4-5):99–105, 1999.
- [59] J. C. JOCHIMSEN UND M. R. JEKEL: *Partial oxidation effects during combined oxidative and biological treatment of separated streams of tannery wastewater*. Wat. Sci. Tech., 35(4):337–345, 1997.
- [60] A. HELBLE, W. SCHLAYER, P.-A. LIECHTI, R. JENNY UND C. H. MÖBIUS: *Advanced effluent treatment in the pulp and paper industry with a combined process of ozonation and fixed bed biofilm reactors*. Wat. Sci. Tech., 40(11-12):343–350, 1999.
- [61] E. HEINZLE, F. GEIGER, M. FAHMY UND O. M. KUT: *Integrated ozonation-biotreatment of pulp bleaching effluents containing chlorinated phenolic compounds*. Biotechnol. Prog., 8:67–77, 1992.
- [62] C. H. MÖBIUS, D. CORDIER, A. HELBLE, R. KAULBACH UND M. CORDESTOLLE: *Elimination persistenter Verbindungen in biologisch gereinigtem Abwasser mit Ozon und weitergehender biologischer Reinigung*. GWF Wasser Abwasser, 137(12):646–651, 1996.
- [63] P. GEHRINGER, W. SZINOVATZ, H. ESCHWEILER UND R. HABERL: *Oxidative treatment of a wastewater stream from a molasses processing using ozone and advanced oxidation technologies*. Ozone Sci. Eng., 19(2):157–168, 1997.
- [64] F. J. BENITEZ, J. BELTRAN-HEREDIA, J. TORREGROSA UND J. R. DOMINGUEZ: *Aerobic treatment of black olive wastewater and the effect of an ozonation stage*. Bioprocess Eng., 20:355–361, 1999.
- [65] B. M. JONES, R. H. SAKAJI UND C. G. DAUGHTON: *Effects of ozonation and ultraviolet irradiation on biodegradability of oil shale wastewater organic solutes*. Wat. Res., 19(11):1421–1428, 1985.

- [66] H. STOCKINGER, E. HEINZLE UND O. M. KUT: *Removal of chloro and nitro aromatic wastewater pollutants by ozonation and biotreatment*. Environ. Sci. Technol., 29:2016–2022, 1995.
- [67] R. ANDREOZZI: *Paracetamol oxidation from aqueous solutions by means of ozonation and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>/UV system*. Wat. Res., 37:993–1004, 2003.
- [68] S. ESPLUGAS, J. GIMENEZ, S. CONTRERAS, E. PASCUAL UND M. RODRIGUEZ: *Comparison of different advanced oxidation processes for phenol degradation*. Wat. Res., 36(4):1034–1042, 2002.
- [69] M. ALBORZ FAR, K. ESCANDE UND S. J. ALLEN: *Removal of 3,4-dichlorobut-1-ene using ozone oxidation*. Wat. Res., 34(11):2963–2970, 2000.
- [70] H. WADA UND T. NAOI: *Recycling of cyanide wastewater by ozone oxidation combined with UV radiation and ion exchange*. J. Chem. Eng. Jpn., 27(2):262–264, 1994.
- [71] R. G. RICE: *Ozone in the United States of America - state-of-the-art*. Ozone Sci. Eng., 21:99–118, 1999.
- [72] A. BÖHME: *Ozone technology of German industrial enterprises*. Ozone Sci. Eng., 21:163–176, 1999.
- [73] M. PEREZ, F. TORRADES, X. DOMENECH UND J. PERAL: *Fenton und photo-Fenton oxidation of textile effluents*. Wat. Res., 36:2703–2710, 2002.
- [74] N. J. KARRER, G. RYHINER UND E. HEINZLE: *Applicability test for combined biological-chemical treatment of wastewaters containing biorefractory compounds*. Wat. Res., 31(5):1013–1020, 1997.
- [75] R. ANLIKER: *History of whitening*. In: R. ANLIKER UND G. MÜLLER (Herausgeber): *Fluorescent whitening agents*, Seiten 12–18. Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
- [76] T. ROICK UND M. KÖCHER: *Optical brighteners for fine papers*. Das Papier, 6A:114–117, 1997.
- [77] O. JOKINEN, R. BAAK, G. TRASER UND P. ROHRINGER: *Optical brighteners for high white coated papers*. Wochenbl. Papierfabr., 128(9):590–593, 2000.
- [78] S. DALLACQUA: *Ökoinventare für die Produktion von Waschmittel-Inhaltsstoffen*. EMPA Rep., 244:59–115, 1999.

- [79] S. CANONICA, J. B. KRAMER, D. REISS UND H. GYGAX: *Photoisomerization kinetics of stilbene-type fluorescent whitening agents*. Environ. Sci. Technol., 31:1754–1760, 1997.
- [80] J.-M. A. STOLL UND W. GIGER: *Determination of detergent-derived fluorescent whitening agent isomers in lake sediments and surface waters by liquid chromatography*. Anal. Chem., 69:2594–2599, 1997.
- [81] A. RACHEL, B. LAVEDRINE, J.-P. AGUER UND P. BOULE: *Photochemical study of 4,4-dinitrostilbene-2,2-disulfonate (DSD) degradation in water*. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., 151:137–143, 2002.
- [82] R. ZINKERNAGEL: *Fluorescent whitening agents in the environment*. In: R. ANLIKER UND G. MÜLLER (Herausgeber): *Fluorescent whitening agents*, Seiten 129–142. Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
- [83] T. POIGER, J. A. FIELD, T. M. FIELD, H. SIEGRIST UND W. GIGER: *Behavior of fluorescent whitening agents during sewage treatment*. Wat. Res., 32(6):1939–1947, 1998.
- [84] J. B. KRAMER, S. CANONICA, J. HOIGNE UND J. KASCHIG: *Degradation of fluorescent whitening agents in sunlit natural waters*. Environ. Sci. Technol., 30:2227–2234, 1996.
- [85] P. WONG-WAH-CHUNG, G. MAILHOT UND M. BOLTE: *4,4-Dinitrostilbene-2,2-disulfonate (DSD) behaviour: under irradiation in water. Decrease of its activity as a fluorescent whitening agent*. Environ. Sci. Technol., 138:275–280, 2001.
- [86] L. GUGLIEMETTI: *Photochemical and biological degradation of water-soluble FWAs*. In: R. ANLIKER UND G. MÜLLER (Herausgeber): *Fluorescent whitening agents*, Seiten 181–190. Thieme Verlag, Stuttgart, 1975.
- [87] J. BANDARA, J. KIWI, R. HUMPHRY-BAKER UND C. PULGARIN: *Oxidative degradation and fluorescence of a non-biodegradable brightener via titania suspensions: implications for the natural cycle*. J. Adv. Oxid. Technol., 1(2):126–137, 1996.
- [88] S. LEMEUNE, J. M. BARBE, A. TRICHET UND R. GUILARD: *Fluorescent brightener 28 removal by ozonation or advanced oxidation processes ( $O_3/H_2O_2$ )*. Ozone Sci. Eng., 19(2):129–144, 1997.
- [89] C. GOTTSCHALK, J. A. LIBRA UND A. SAUPE: *Ozonation of water and waste water*. Wiley VCH, Weinheim, 2000.

- [90] P. JANKNECHT, P. A. WILDERER, C. PICARD, A. LARBOT UND J. SARAZIN: *Investigations on ozone contacting by ceramic membranes*. *Ozone Sci. Eng.*, 22:379–392, 2000.
- [91] N. KARPEL VEL LEITNER, E. LE BRAS, E. FOUCAULT UND J.-L. BOUSGARBIES: *A new photochemical reactor design for the treatment of absorbing solutions*. *Wat. Sci. Tech.*, 35(4):215–222, 1997.
- [92] D. D. DIONYSIOS , G. BALASUBRAMANIAN, M. T. SUIDAN, A. P. KHODADOUST, I. BAUDIN UND J.-M. LAINE: *Rotating disk photocatalytic reactor: development, characterization, and evaluation for the destruction of organic pollutants in water*. *Wat. Res.*, 34(11):2927–2940, 2000.
- [93] N. Y. O. MUYIMA, M. N. B. MOMBA UND T. E. CLOETE: *Biological methods for the treatment of wastewaters*. In: T. E. CLOETE UND N. Y. O. MUYIMA (Herausgeber): *Microbial community analysis: the key to the design of biological wastewater treatment systems*, Seiten 1–24. IAWQ, London, 1997.
- [94] R. J. SEVIOUR, K. C. LINDREA, P. C. GRIFFITHS UND L. L. BLACKALL: *The activated sludge process*. In: R. J. SEVIOUR UND L. L. BLACKALL (Herausgeber): *The microbiology of activated sludge*, Seiten 44–75. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, 1999.
- [95] H. G. SCHLEGEL: *Allgemeine Mikrobiologie*. Thieme, Stuttgart, 1992.
- [96] U. OBST UND F. SEIBEL: *Biologische und ökotoxikologische Grundlagen*. In: FACHGRUPPE WASSERCHEMIE IN DER GDCH (Herausgeber): *Chemie und Biologie der Altlasten*, Seiten 43–88. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1997.
- [97] W. FRITSCHKE: *Umwelt-Mikrobiologie*. Gustav Fischer, Jena, 1998.
- [98] J. BEVER, A. STEIN UND H. TEICHMANN: *Verfahrenstechnische Aspekte von Abwasserreinigungsverfahren 2. Teil: Festbettverfahren; kombinierte Verfahren*. In: J. BEVER, A. STEIN UND H. TEICHMANN (Herausgeber): *Weitergehende Abwasserreinigung*, Seiten 61–79. R. Oldenbourg Verlag, München Wien, 1995.
- [99] J. BEVER, A. STEIN UND H. TEICHMANN: *Biologische Filter und Fließbettverfahren*. In: J. BEVER, A. STEIN UND H. TEICHMANN (Herausgeber): *Weitergehende Abwasserreinigung*, Seiten 81–93. R. Oldenbourg Verlag, München Wien, 1995.

- [100] M. MARTIENSSEN: *Simultaneous catalytic detoxification and biodegradation of organic peroxides during the biofilm process*. *Wat. Res.*, 34(16):3917–3926, 2000.
- [101] K. MISEREZ, S. PHILIPS UND W. VERSTRAETE: *New biology for advanced wastewater treatment*. *Wat. Sci. Tech.*, 40(4-5):137–144, 1999.
- [102] A. WOBUS UND I. RÖSKE: *Reactors with membrane-grown biofilms: their capacity to cope with fluctuating inflow conditions and with shock loads of xenobiotics*. *Wat. Res.*, 34(1):279–287, 1999.
- [103] R. M. ATLAS: *Biodiversity and microbial interactions in the biodegradation of organic compounds*. In: T. E. CLOETE UND N. Y. O. MUYIMA (Herausgeber): *Microbial community analysis: the key to the design of biological wastewater treatment systems*, Seiten 25–34. IAWQ, London, 1997.
- [104] H.-C. FLEMMING UND T. GRIEBE: *Mikrobiologische Grundlagen der Biofilm-Technik*. In: P. A. WILDERER UND I. C. NERGER (Herausgeber): *Biofilm-Technologie zur Reinigung kommunaler Abwässer: Mode oder Moderne?*, Seiten 1–24. Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft TU München, Nr. 130, München, 1997.
- [105] P. REUSCHENBACH, U. PAGGA UND U. STROTMANN: *A critical comparison of respirometric biodegradation tests based on OECD 301 and related test methods*. *Wat. Res.*, 37:1571–1582, 2003.
- [106] A. HUFSCHMID, K. BECKER-VAN SLOOTEN, A. STRAWCZYNSKI, P. VIOGET, S. PARRA, P. PERINGER UND C. PULGARIN: *BOD<sub>5</sub> measurements of water presenting inhibitory Cu<sup>2+</sup>. Implications in using of BOD to evaluate biodegradability of industrial wastewaters*. *Chemosphere*, 50:171–176, 2003.
- [107] R. J. SEVIOUR UND L. L. BLACKALL: *Introduction to the microorganisms found in activated sludge processes*. In: R. J. SEVIOUR UND L. L. BLACKALL (Herausgeber): *The microbiology of activated sludge*, Seiten 1–43. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, 1999.
- [108] H. WELLENS: *Bestimmung und Bewertung der biologischen Abbaubarkeit*. *Vom Wasser*, 63:191–198, 1984.
- [109] S. GARTISER, M. MEYER UND I. JÄGER: *Zur Interpretation des Zahn-Wellens-Tests bei der Untersuchung von Abwasserproben*. *GWf Wasser Abwasser*, 137(7):345–352, 1996.

- [110] P. HÖRSCH, A. SPECK UND F. H. FRIMMEL: *Combined advanced oxidation and biodegradation of industrial effluents from the production of stilbene-based fluorescent whitening agents*. *Wat. Res.*, 37(11):2748–2756, 2003.
- [111] S. GARTISER, M. MEYER UND I. JÄGER: *Abbau ökotoxischer und mutagener Abwasserinhaltsstoffe im Zahn-Wellens-Test und Labor- bzw. technischen Kläranlagen*. *GWF Wasser Abwasser*, 138(1):28–34, 1997.
- [112] H. STOCKINGER, O. M. KUT UND E. HEINZLE: *Ozonation of wastewater containing N-methylmorpholine-N-oxide*. *Wat. Res.*, 30(8):1745–1748, 1996.
- [113] A. SCHMID: *Methode zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität auf Basis einer zeitlichen Sauerstoffzehrungsmessung*. *GWF Wasser Abwasser*, 141(12):861–864, 2000.
- [114] M. GUTIERREZ, J. ETXEBARRIA UND L. DE LAS FUENTES: *Evaluation of wastewater toxicity: comparative study between Microtox and activated sludge oxygen uptake inhibition*. *Wat. Res.*, 36(4):919–924, 2002.
- [115] G. LANGERGRABER, M. WUCHTY, N. FLEISCHMANN UND M. LECHNER: *Rapid automated detection of nitrification kinetics using respirometry*. *Wat. Sci. Tech.*, 47(2):149–155, 2003.
- [116] F. MALZ: *Instrumente und Methoden zur Erkennung und Messung von Intoxikationen und anderen Störungen der Abwasser- und Schlammbehandlung : Aachener Werkstattgespräch am 16. u. 17. Sept. 1982 in Roetgen (Gewässerschutz, Wasser, Abwasser; 63)*. TH Aachen, B. Böhnke, Aachen, 1983.
- [117] R. KANNE: *Aquatische Ökotoxikologie*. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.*, 3(1):16–18, 1991.
- [118] R. KANNE: *Gegenwärtig zur Verfügung stehende Testverfahren*. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.*, 3:23–26, 1991.
- [119] K. G. STEINHÄUSER: *Konzeption der Anwendung von Biotests im wasserrechtlichen Vollzug*. *GWF Wasser Abwasser*, 137(6):310–315, 1996.
- [120] C. HELMA, S. KNASMÜLLER UND R. SCHULTE-HERMANN: *Die Belastung von Wässern mit genotoxischen Substanzen*. *UWSF - Z. Umweltchem. Ökotox.*, 6(5):277–288, 1994.
- [121] Y. ONO, I. SOMIYA UND T. KAWAGUCHI: *Genotoxicity of substances in the nightsoil and its biologically treated water*. *Wat. Res.*, 30(3):569–576, 1996.

- [122] BUNDESMINISTERIUM FÜR BILDUNG UND FORSCHUNG (BMBF): *Forschungsverbundvorhaben Erprobung, Vergleich, Weiterentwicklung und Beurteilung von Gentoxizitätstests für Oberflächengewässer, Abschlussbericht 1999*. Forschungszentrum Karlsruhe GmbH im Auftrag des BMBF, Dresden, 2000.
- [123] A. MÜNZINGER UND J. LOWIS: *Untersuchungen von Wasserproben unterschiedlicher Herkunft mit dem Leuchtbakterienhemmtest*. GWF Wasser Abwasser, 137(6):302–309, 1996.
- [124] G. GELLERT, A. STOMMEL UND D. PAULUS: *Vergleichende Untersuchung von Industrieabwasser mit Fisch-, Daphnien-, Algen- und Leuchtbakterientests*. GWF - Wasser Abwasser, 138(11):556–558, 1997.
- [125] A. R. FERNANDEZ-ALBA, D. HERNANDO, A. AGUERA, J. CACERES UND S. MALATO: *Toxicity assays: a way for evaluating AOPs efficiency*. Wat. Res., 36:4255–4262, 2002.
- [126] S. REN UND P. D. FRYMIER: *Estimating the toxicities of organic chemicals to bioluminescent bacteria and activated sludge*. Wat. Res., 36:4406–4414, 2002.
- [127] S. REN UND P. D. FRYMIER: *Use of multidimensional scaling in the selection of wastewater toxicity test battery components*. Wat. Res., 37:1655–1661, 2003.
- [128] V. L. K. JENNINGS, M. H. RAYNER-BRANDES UND D. J. BIRD: *Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (vibrio fischeri): a comparison of three commercial systems*. Wat. Res., 35(14):3448–3456, 2001.
- [129] A. R. BOWERS, P. GADDIPATI, W. W. ECKENFELDER JR. UND R. M. MONSEN: *Treatment of toxic or refractory wastewaters with hydrogen peroxide*. Wat. Sci. Tech., 21:477–486, 1989.
- [130] V. B. MANILAL, A. HARIDAS, R. ALEXANDER UND G. D. SURENDER: *Photocatalytic treatment of toxic organics in wastewater: toxicity of photodegradation products*. Wat. Res., 26(8):1035–1038, 1992.
- [131] W. S. KUO: *Effects of photolytic ozonation on biodegradability and toxicity of industrial wastewater*. J. Environ. Sci. Heal. A, 34(4):919–934, 1999.
- [132] R. ANDREOZZI, M. S. LO CASALE, R. MAROTTA, G. PINTO UND A. POLLIO: *N-Methyl-P-aminophenol (metol) ozonation in aqueous solution: kinetics, mechanism and toxicological characterization of ozonized samples*. Wat. Res., 34(18):4419–4429, 2000.



- [133] O. FIEHN, L. VIGELAHN, G. KALNOWSKI, T. REEMTSMA UND M. JEKEL: *Toxicity-directed fractionation of tannery wastewater using solid-phase extraction and luminescence inhibition in microtiter plates*. Acta hydrochim. hydrobiol., 25:11–16, 1997.
- [134] T. REEMTSMA, O. FIEHN UND M. JEKEL: *A modified method for the analysis of organics in industrial wastewater as directed by their toxicity to vibrio fischeri*. Fresenius J. Anal. Chem., 363:771–776, 1999.
- [135] T. REEMTSMA, A. PUTSCHEW UND M. JEKEL: *Industrial wastewater analysis: a toxicity-directed approach*. Waste Manage., 19:181–188, 1999.
- [136] N. KLINKOW, J. OLESKY-FRENZEL UND M. JEKEL: *Toxicity-directed fractionation of organic compounds in tannery wastewater with regard to their molecular weight and polarity*. Wat. Res., 32(9):2583–2592, 1998.
- [137] D. R. MOUNT UND J. R. HOCKETT: *Use of identification evaluation methods to characterize, identify, and confirm hexavalent chromium toxicity in an industrial effluent*. Wat. Res., 34(4):1379–1385, 2000.
- [138] R. AMANN: *Molekulare Populationsanalyse von Mikroorganismen*. In: BAYERISCHE AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN (Herausgeber): *Rundgespräche der Kommission für Ökologie. Band 23: Bedeutung der Mikroorganismen für die Umwelt*, Seiten 31–40. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, 2002.
- [139] D. H. EIKELBOOM UND H. J. J. VAN BUIJSEN: *Handbuch für die mikroskopische Schlammuntersuchung*. Hirthammer, München, 1983.
- [140] D. H. EIKELBOOM: *Filamentous organisms observed in activated sludge*. Wat. Res., 9:365–388, 1975.
- [141] H. LEMMER: *Ursachen und Bekämpfung von Blähschlamm*. In: H. LEMMER, T. GRIEBE UND H.-C. FLEMMING (Herausgeber): *Ökologie der Abwasserorganismen*, Seiten 247–257. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996.
- [142] J. J. VAN DER WAARDE, B. GEURKINK, M. HENSSEN UND G. HEIJNEN: *Detection of filamentous and nitrifying bacteria in activated sludge with 16S rRNA probes*. Wat. Sci. Tech., 37(4-5):475–479, 1998.
- [143] M. WAGNER, R. AMANN, H. LEMMER UND K.-H. SCHLEIFER: *Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure*. Appl. Environ. Microbiol., 59(5):1520–1525, 1993.

- [144] P. KÄMPFER, R. ERHART, C. BEIMFOHR, J. BÖHRINGER, M. WAGNER UND R. AMANN: *Characterization of bacterial communities from activated sludge: culture-dependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligonucleotide probes*. Microb. Ecol., 32:101–121, 1996.
- [145] D. D. MUDALY, B. W. ATKINSON UND F. BUX: *16S rRNA in situ probing for the determination of the family level community structure implicated in enhanced biological nutrient removal*. Wat. Sci. Tech., 43(1):91–98, 2001.
- [146] M. WAGNER UND R. AMANN: *Die Anwendung von in situ-Hybridisierungssonden zur Aufklärung von Struktur und Dynamik der mikrobiellen Biozönose in der Abwasserreinigung*. In: H. LEMMER, T. GRIEBE UND H.-C. FLEMMING (Herausgeber): *Ökologie der Abwasserorganismen*, Seiten 93–110. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996.
- [147] R. I. AMANN, W. LUDWIG UND K.-H. SCHLEIFER: *Phylogenetic identification and detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbiol. Rev., 59(1):143–169, 1995.
- [148] BRODA, E.: *Two kinds of lithotrophs missing in nature*. Z. Allg. Mikrobiol., 17:491–493, 1977.
- [149] M. SCHMID, U. TWACHTMANN, M. KLEIN, M. STROUS, S. JURETSCHKO, M. JETTEN, J. W. METZGER, K.-H. SCHLEIFER UND M. WAGNER: *Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation*. System. Appl. Microbiol., 23:93–106, 2000.
- [150] M. STROUS, J. A. FUERST, E. H. M. KRAMER, S. LOGEMANN, G. MUYZER, K. T. VAN DE PAS-SCHOONEN, R. I. WEBB, J. G. KUEHNEN UND M. S. M. JETTEN: *Missing lithotroph identified as new planctomycete*. Nature, 400:446–449, 1999.
- [151] M. S. M. JETTEN, M. STROUS, K. T. VAN DE PAS-SCHOONEN, J. SCHALK, U. G. J. M. VAN DONGEN, A. VAN DE GRAAF, S. LOGEMANN, G. MUYZER, M. C. M. VAN LOOSDRECHT UND J. G. KUEHNEN: *The anaerobic oxidation of ammonium*. FEMS Microbiol. Rev., 22:421–437, 1999.
- [152] M. SCHMID, S. SCHMITZ-ESSER, M. JETTEN UND M. WAGNER: *16S-23S rDNA intergenic spacer and 23S rDNA of anaerobic ammonium-oxidizing bacteria: implications for phylogeny and in situ detection*. Environ. Microbiol., 3(7):450–459, 2001.

- [153] A. O. SLIEKERS, N. DERWORT, J. L. C. GOMEZ, M. STROUS, J. G. KUENEN UND M. S. M. JETTEN: *Completely autotrophic nitrogen removal over nitrite in one single reactor*. *Wat. Res.*, 36:2475–2482, 2002.
- [154] W. LUDWIG: *Ribosomale Ribonukleinsäure als Grundlage für die molekulare Identifizierung der Mikroorganismen*. In: BAYERISCHE AKADEMIE DER WISSENSCHAFTEN (Herausgeber): *Rundgespräche der Kommission für Ökologie. Band 23: Bedeutung der Mikroorganismen für die Umwelt*, Seiten 17–30. Verlag Dr. Friedrich Pfeil, München, 2002.
- [155] C. R. WOESE: *Bacterial evolution*. *Microbiol. Rev.*, 51:221–271, 1987.
- [156] S. J. GIOVANNONI, E. F. DELONG, G. J. OLSEN UND N. R. PACE: *Phylogenetic group-specific oligonucleotide probes for identification of single microbial cells*. *J. Bacteriol.*, 170(2):720–726, 1988.
- [157] B. ZARDA, R. AMANN, G. WALLNER UND K.-H. SCHLEIFER: *Identification of single bacterial cells using digoxigenin-labelled, rRNA-targeted oligonucleotides*. *J. Gen. Microbiol.*, 137:2823–2830, 1991.
- [158] R. I. AMANN, B. J. BINDER, R. J. OLSEN, S. W. CHISHOLM, R. DEVEREUX UND D. A. STAHL: *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6):1919–1925, 1990.
- [159] C. R. WOESE, O. KANDLER UND M. L. WHEELIS: *Towards a natural system of organisms: proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eukarya*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:4576–4579, 1990.
- [160] D. A. STAHL, B. FLESHER, H. R. MANSFIELD UND L. MONTGOMERY: *Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology*. *Appl. Env. Microbiol.*, 54:1079–1084, 1988.
- [161] R. K. SAIKI, D. H. GELFAND, S. STOFFEL, S. J. SCHARF, R. HIGUCHI, G. T. HORN, K. B. MULLIS UND H. A. EHRLICH: *Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase*. *Science*, 239:487–491, 1988.
- [162] R. J. STEFFAN UND R. M. ATLAS: *Polymerase chain reaction - applications in environmental microbiology*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 45:137–161, 1991.
- [163] R. AMANN, N. SPRINGER, W. LUDWIG, H.-D. GÖRTZ UND K.-H. SCHLEIFER: *Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts*. *Nature*, 351:161–164, 1991.

- [164] S. SPRING, R. AMANN, W. LUDWIG, K.-H. SCHLEIFER UND N. PETERSEN: *Phylogenetic diversity and identification of nonculturable magnetotactic bacteria*. Syst. Appl. Microbiol., 15:116–122, 1992.
- [165] G. WALLNER UND R. AMANN: *Durchflußzytometrische Untersuchung*. In: H. LEMMER, T. GRIEBE UND H.-C. FLEMMING (Herausgeber): *Ökologie der Abwasserorganismen*, Seiten 81–92. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996.
- [166] R. AMANN: *In situ identification of micro-organisms by whole cell hybridization with rRNA-targeted nucleic acid probes*. In: A. D. C. AKKEMAN, J. D. VAN ELSAS UND F. J. DE BRUIGIN (Herausgeber): *Molecular Microbial Ecology Manual*, Seiten 1–15. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht Boston London, 1995.
- [167] W. LUDWIG, R. AMANN, E. MARTINEZ-ROMERO, W. SCHÖNHUBER, S. BAUER, A. NEEF UND K.-H. SCHLEIFER: *rRNA based identification and detection systems for rhizobia and other bacteria*. Plant and Soil, 204:1–19, 1998.
- [168] P. HUGENHOLTZ, G. W. TYSON UND L. L. BLACKALL: *Design and evaluation of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes for fluorescence in situ hybridization*. Methods Mol. Biol., 179:29–42, 2002.
- [169] B. M. FUCHS, F. O. GLÖCKNER, J. WULF UND R. AMANN: *Unlabeled helper oligonucleotides increase the in situ accessibility to 16S rRNA of fluorescently labeled oligonucleotide probes*. Appl. Environ. Microbiol., 66(8):3603–3607, 2000.
- [170] D. FRIGON, D. B. OERTHER, E. MORGENROTH UND L. RASKIN: *Oligonucleotide probe hybridization and modeling results suggest that populations consuming readily biodegradable substrate have high cellular RNA levels*. Wat. Sci. Tech., 45(6):115–126, 2002.
- [171] R. MACDONALD UND V. S. BRÖZEL: *Community analysis of bacterial biofilms in a simulated recirculating cooling-water system by fluorescent in situ hybridization with rRNA-targeted oligonucleotide probes*. Wat. Res., 34(9):2439–2446, 2000.
- [172] H. DAIMS, P. H. NIELSEN, J. L. NIELSEN, S. JURETSCHKO UND M. WAGNER: *Novel nitrospira-like bacteria as dominant nitrite-oxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ physiology*. Wat. Sci. Tech., 41(4-5):85–90, 2000.

- [173] H. DAIMS, A. BRÜHL, R. AMANN, K.-H. SCHLEIFER UND M. WAGNER: *The domain-specific probe Eub338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set.* Syst. Appl. Microbiol., 3:434–444, 1999.
- [174] M. WAGNER, , B. ASSMUS, A. HARTMANN, P. HUTZLER UND R. AMANN: *In situ analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy.* J. Microsc., 176(3):181–187, 1994.
- [175] M. WAGNER, D. R. NOGUERA, S. JURETSCHKO, G. RATH UND K.-H. SCHLEIFER: *Combining fluorescent in situ hybridization (FISH) with cultivation and mathematical modeling to study population structure and function of ammonia-oxidizing bacteria in activated sludge.* Wat. Sci. Tech., 37(4-5):441–449, 1998.
- [176] M. T. MADIGAN: *Brock Mikrobiologie.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin, 2001.
- [177] P. HUGENHOLTZ, B. M. GOEBEL UND N. R. PACE: *Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity.* J. Bacteriol., 180(18):4765–4774, 1998.
- [178] R. E. HICKS, R. I. AMANN UND D. A. STAHL: *Dual staining of natural bacterioplankton with 4,6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16SrRNA sequences.* Appl. Environ. Microbiol., 58(7):2158–2163, 1992.
- [179] K. G. PORTER UND Y. S. FEIG: *The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora.* Limnol. Oceanogr., 25:943–948, 1980.
- [180] K.-H. SCHLEIFER UND M. HORN: *Mikrobielle Vielfalt - die unsichtbare Biodiversität.* Biologen heute, VdBiol, 452(6):1–5, 2000.
- [181] R. I. AMANN, J. STROMLEY, R. DEVEREUX, R. KEY UND D. A. STAHL: *Molecular and microscopic identification of sulfate-reducing bacteria in multispecies biofilms.* Appl. Environ. Microbiol., 58(2):614–623, 1992.
- [182] G. MUYZER, E. C. DE WAAL UND A. G. UITTERLINDEN: *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.* Appl. Environ. Microbiol., 59(3):695–700, 1993.

- [183] F. KURISU, H. SATOH, T. MINO UND T. MATSUO: *Microbial community analysis of thermophilic contact oxidation process by using ribosomal RNA approaches and the quinone profile method.* Wat. Res., 36:429–438, 2002.
- [184] T. M. LAPARA, C. H. NAKATSU, L. M. PANTEA UND J. E. ALLEMAN: *Stability of the bacterial communities supported by a seven-stage biological process treating pharmaceutical wastewater as revealed by PCR-DGGE.* Wat. Res., 36:638–646, 2002.
- [185] H.-D. PARK, J. M. REGAN UND D. R. NOGUERA: *Molecular analysis of ammonia-oxidizing bacterial populations in aerated-anoxic Orbal processes.* Wat. Sci. Tech., 46(1-2):273–280, 2002.
- [186] R. NOGUEIRA, L. F. MELO, U. PURKHOLD, S. WUERTZ UND M. WAGNER: *Nitrifying and heterotrophic population dynamics in biofilm reactors: effects of hydraulic retention time and the presence of organic carbon.* Wat. Res., 36:469–481, 2002.
- [187] U. PURKHOLD, A. POMMERENING-RÖSER, S. JURETSCHKO, M. C. SCHMID, H.-P. KOOPS UND M. WAGNER: *Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys.* Appl. Environ. Microbiol., 66(12):5368–5382, 2000.
- [188] Y. AOI, S. TSUNEDA, A. HIRATA, A. KITAYAMA UND T. NAGAMUNE: *Real-time monitoring of ammonia-oxidizing activity in a nitrifying biofilm by amoA mRNA analysis.* Wat. Sci. Tech., 46(1-2):439–442, 2002.
- [189] N. LEE, P. H. NIELSEN, K. H. ANDREASEN, S. JURETSCHKO, J. L. NIELSEN, K.-H. SCHLEIFER UND M. WAGNER: *Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology.* Appl. Environ. Microbiol., 65(3):1289–1297, 1999.
- [190] H. DAIMS, J. L. NIELSEN, P. H. NIELSEN, K.-H. SCHLEIFER UND M. WAGNER: *In situ characterization of nitrospira-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants.* Appl. Environ. Microbiol., 67(11):5273–5284, 2001.
- [191] J. L. NIELSEN UND P. H. NIELSEN: *Enumeration of acetate-consuming bacteria by microautoradiography under oxygen and nitrate respiring conditions in activated sludge.* Wat. Res., 36:421–428, 2002.

- [192] J. L. NIELSEN UND P. H. NIELSEN: *Quantification of functional groups in activated sludge by microautoradiography*. Wat. Sci. Tech., 46(1-2):389–395, 2002.
- [193] S. JURETSCHKO, G. TIMMERMANN, M. SCHMID, K.-H. SCHLEIFER, A. POMMERENING-RÖSER, H.-P. KOOPS UND M. WAGNER: *Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: nitrosococcus mobilis and nitrospira-like bacteria as dominant populations*. Appl. Environ. Microbiol., 64(8):3042–3051, 1998.
- [194] G. WOLF, J. G. CRESPO UND M. A. M. REIS: *Optical and spectroscopic methods for biofilm examination and monitoring*. Rev. Environ. Sci. Biotech., 1:227–251, 2002.
- [195] L. L. BLACKALL, P. C. BURRELL, H. GWILLIAM, D. BRADFORD, P. L. BOND UND P. HUGENHOLTZ: *The use 16S rDNA clone libraries to describe the microbial diversity of activated sludge communities*. Wat. Sci. Tech., 37(4-5):451–454, 1998.
- [196] I. RÖSKE, K. RÖSKE UND D. UHLMANN: *Gradients in the taxonomic composition of different microbial systems: comparison between biofilms for advanced waste treatment and lake sediment*. Wat. Sci. Tech., 37(4-5):159–166, 1998.
- [197] K. SIMEK, J. VRBA, J. PERNTHALER, T. POSCH, P. HARTMAN, J. NEDOMA UND R. PSENNER: *Morphological and compositional shifts in an experimental bacterial community influenced by protists with contrasting feeding models*. Appl. Environ. Microbiol., 63(2):587–595, 1997.
- [198] W. MANZ, R. AMANN, W. LUDWIG, M. WAGNER UND K.-H. SCHLEIFER: *Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions*. System. Appl. Microbiol., 15:593–600, 1992.
- [199] M. WAGNER, R. AMANN, H. LEMMER, W. MANZ UND K.-H. SCHLEIFER: *Probing activated sludge with fluorescently labeled rRNA targeted oligonucleotides*. Wat. Sci. Tech., 29(7):15–24, 1994.
- [200] T. SCHWARTZ, S. HOFFMANN UND U. OBST: *Der Einfluss verschiedener Trinkwassergewinnungs- und Aufbereitungsmethoden auf die natürliche Biofilmentwicklung in einem Trinkwasserverteilungssystem*. Vom Wasser, 89:125–138, 1997.
- [201] W. MANZ, M. WAGNER, R. AMANN UND K.-H. SCHLEIFER: *In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants*. Wat. Res., 28(8):1715–1723, 1994.

- [202] K. KAEWPIPAT UND C. P. L. GRADY JR.: *Microbial population dynamics in laboratory-scale activated sludge reactors*. Wat. Sci. Tech., 46(1-2):19–27, 2002.
- [203] S. J. BALLINGER, I. M. HEAD, T. P. CURTIS UND A. R. GODLEY: *The effect of C/N ratio on ammonia oxidising bacteria community structure in a laboratory nitrification-denitrification reactor*. Wat. Sci. Tech., 46(1-2):543–550, 2002.
- [204] J. SNAIDR, R. AMANN, I. HUBER, W. LUDWIG UND K.-H. SCHLEIFER: *Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge*. Appl. Environ. Microbiol., 63(7):2884–2896, 1997.
- [205] A. HIRAISHI, Y. UEDA UND J. ISHIHARA: *Quinone profiling of bacterial communities in natural and synthetic sewage activated sludge for enhanced phosphate removal*. Appl. Environ. Microbiol., 64(3):992–998, 1998.
- [206] C. M. FALKENTOFT, E. MÜLLER, P. ARNZ, P. HARREMOËS, H. MOSBAEK, P. A. WILDERER UND S. WUERTZ: *Population changes in a biofilm reactor for phosphorus removal as evidenced by the use of FISH*. Wat. Res., 36:491–500, 2002.
- [207] M. WAGNER, R. ERHART, W. MANZ, R. AMANN, H. LEMMER, D. WEDI UND K.-H. SCHLEIFER: *Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus Acinetobacter and its application for in situ monitoring in activated sludge*. Appl. Environ. Microbiol., 60(3):792–800, 1994.
- [208] M. WAGNER, R. AMANN, P. KÄMPFER, B. ASSMUS, A. HARTMANN, P. HUTZLER, N. SPRINGER UND K.-H. SCHLEIFER: *Identification and in situ detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge*. Syst. Appl. Microbiol., 17:405–417, 1994.
- [209] D. B. OERTHER, F. L. DE LOS REYES, M. F. DE LOS REYES UND L. RASKIN: *Quantifying filamentous microorganisms in activated sludge before, during, and after an incident of foaming by oligonucleotide probe hybridizations and antibody staining*. Wat. Res., 35(14):3325–3336, 2001.
- [210] R. ERHART, D. BRADFORD, R. J. SEVIOUR, R. AMANN UND L. L. BLACKALL: *Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of microthrix parvicella in activated sludge*. Syst. Appl. Microbiol., 20:310–318, 1997.



- [211] H. LEMMER, G. LIND, E. MÜLLER, M. SCHADE UND B. ZIEGELMAYER: *Scum in activated sludge plants: impact of non-filamentous and filamentous bacteria*. Acta hydrochim. hydrobiol., 28:34–40, 2000.
- [212] M. STOFFELS, R. AMANN, W. LUDWIG, D. HEKMAT UND K.-H. SCHLEIFER: *Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds*. Appl. Environ. Microbiol., 64(3):930–939, 1998.
- [213] Y. SEKIGUCHI, Y. KAMAGATA, K. NAKAMURA, A. OHASHI UND H. HARADA: *Fluorescence in situ hybridization using 16S rRNA-targeted oligonucleotides reveals localization of methanogens and selected uncultured bacteria in mesophilic and thermophilic sludge granules*. Appl. Environ. Microbiol., 65(3):1280–1288, 1999.
- [214] K. SYUTSUBO, N. SINTHURAT, A. OHASHI UND H. HARADA: *Population dynamics of anaerobic microbial consortia in thermophilic granular sludge in response to feed composition change*. Wat. Sci. Tech., 43(1):59–66, 2001.
- [215] L. RASKIN, R. I. AMANN, L. K. POULSEN, B. E. RITTMANN UND D. A. STAHL: *Use of ribosomal RNA-based molecular probes for characterization of complex microbial communities in anaerobic biofilms*. Wat. Sci. Tech., 31(1):261–272, 1995.
- [216] A. TESKE, E. ALM, J. M. REGAN, S. TOZE, B. E. RITTMANN UND D. A. STAHL: *Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria*. J. Bacteriol., 176(21):6623–6630, 1994.
- [217] M. HENZE: *Basic biological processes*. In: M. HENZE, P. HARREMOES, J. LA COUR JANSEN UND E. ARVIN (Herausgeber): *Wastewater treatment*, Seiten 55–112. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1995.
- [218] W. A. J. VAN BENTHUM, M. D. M. VAN LOOSDRECHT UND J. J. HEIJNEN: *Control of heterotrophic layer formation on nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor*. Biotech. Bioeng., 53(4):397–405, 1997.
- [219] S. ROSENBERGER, U. KRÜGER, R. WITZIG, W. MANZ, U. SZEWZYK UND M. KRAUME: *Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water*. Wat. Res., 36:413–420, 2002.
- [220] L. A. NUNEZ UND B. MARTINEZ: *Evaluation of an anaerobic/aerobic system for carbon and nitrogen removal in slaughterhouse wastewater*. Wat. Sci. Tech., 44(4):271–277, 2001.

- [221] E. BOCK UND H.-P. KOOPS: *The genus Nitrobacter and related genera*. In: A. BALOWS, H. G. TRÜPER, M. DWORKIN, W. HARDER UND K.-H. SCHLEIFER (Herausgeber): *The Prokaryotes*, Seiten 2302–2309. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1991.
- [222] H.-P. KOOPS UND U. C. MÖLLER: *The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria*. In: A. BALOWS, H. G. TRÜPER, M. DWORKIN, W. HARDER UND K.-H. SCHLEIFER (Herausgeber): *The Prokaryotes*, Seiten 2625–2637. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1991.
- [223] A. POMMERENING-RÖSER, G. RATH UND H.-P. KOOPS: *Phylogenetic diversity within the genus nitrosomonas*. *System. Appl. Microbiol.*, 19:344–351, 1996.
- [224] I. M. HEAD, W. D. HIORNS, T. M. EMBLEY, A. J. MCCARTHY UND J. R. SAUNDERS: *The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences*. *J. Gen. Microbiol.*, 139(6):1147–1153, 1993.
- [225] J. B. UTAKER UND I. F. NES: *A qualitative evaluation of the published oligonucleotides specific for the 16S rRNA gene sequences of the ammonia-oxidizing bacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 21:72–88, 1998.
- [226] I. M. HEAD, J. R. SAUNDERS UND R. W. PICKUP: *Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms*. *Microb. Ecol.*, 35:1–21, 1998.
- [227] S. EHRLICH, D. BEHRENS, E. LEBEDEVA, W. LUDWIG UND E. BOCK: *A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, nitrospira moscoviensis sp. nov. and its phylogenetic relationship*. *Arch. Microbiol.*, 164:16–23, 1995.
- [228] F. PERSSON, T. WIK, F. SÖRENSSON UND M. HERMANSSON: *Distribution and activity of ammonia oxidizing bacteria in a large full-scale trickling filter*. *Wat. Res.*, 36:1439–1448, 2002.
- [229] B. K. MOBARRY, M. WAGNER, V. URBAIN, B. E. RITTMANN UND D. A. STAHL: *Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62(6):2156–2162, 1996.
- [230] A. K. ROWAN, J. R. SNAPE, D. FEARNSIDE, T. P. CURTIS, M. R. BARER UND I. M. HEAD: *A comparison of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria in full- and laboratory-scale wastewater treatment reactors*. *Wat. Sci. Tech.*, 46(1-2):319–322, 2002.

- [231] A. SCHRAMM, D. DE BEER, M. WAGNER UND R. AMANN: *Identification and activities in situ of nitrosospira and nitrospira ssp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor*. Appl. Environ. Microbiol., 64(9):3480–3485, 1998.
- [232] S. OKABE, H. NAITOH, H. SATOH UND Y. WATANABE: *Structure and function of nitrifying biofilms as determined by molecular techniques and the use of microelectrodes*. Wat. Sci. Tech., 46(1-2):233–241, 2002.
- [233] S. J. BALLINGER, I. M. HEAD, T. P. CURTIS UND A. R. GODLEY: *Molecular microbial ecology of nitrification in an activated sludge process treating refinery wastewater*. Wat. Sci. Tech., 37(4-5):105–108, 1998.
- [234] D. DE BEER UND A. SCHRAMM: *Micro-environments and mass transfer phenomena in biofilms studied with microsensors*. Wat. Sci. Tech., 39(7):173–178, 1999.
- [235] C. HELMER-MADHOK, M. SCHMID, E. FILIPOV, T. GAUL, A. HIPPEN, K.-H. ROSENWINKEL, C. F. SEYFRIED, M. WAGNER UND S. KUNST: *Deammonification in biofilm systems: population structure and function*. Wat. Sci. Tech., 46(1-2):223–231, 2002.
- [236] D. GEENENS, C. JONKERS UND C. THOEYE: *Go or no go for gel entrapped nitrifiers? A Belgian case study*. Wat. Sci. Tech., 46(1-2):465–471, 2002.
- [237] D. W. HAN, J. S. CHANG UND D. J. KIM: *Nitrifying microbial community analysis of nitrite accumulating biofilm reactor by fluorescence in situ hybridization*. Wat. Sci. Tech., 47(1):97–104, 2003.
- [238] A. SCHRAMM, L. H. LARSEN, N. P. REVSBECH, N. B. RAMSING, R. AMANN UND K.-H. SCHLEIFER: *Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes*. Appl. Environ. Microbiol., 62(12):4641–4647, 1996.
- [239] A. SCHRAMM, D. DE BEER, J. C. VAN DEN HEUVEL, S. OTTENGRAF UND R. AMANN: *Microscale distribution of populations and activities of nitrosospira and nitrospira ssp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors*. Appl. Environ. Microbiol., 65(8):3690–3696, 1999.
- [240] J. MONOD: *The growth of bacterial cultures*. Anu. Rev. Microbiol., 3:371–394, 1949.

- [241] A. OHASHI, D. G. V. DE SILVA, B. MOBARRY, J. A. MANEM, D. A. STAHL UND B. E. RITTMANN: *Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs*. *Wat. Sci. Tech.*, 32(8):75–84, 1995.
- [242] H. SATOH, S. OKABE, N. NORIMATSU UND Y. WATANABE: *Significance of substrate C/N ratio on structure and activity of nitrifying biofilms determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes*. *Wat. Sci. Tech.*, 41(4-5):317–322, 2000.
- [243] L. TIJHUIS, E. REKSWINKEL, M. C. M. VAN LOOSDRECHT UND J. J. HEIJNEN: *Dynamics of population and biofilm structure in the biofilm airlift suspension reactor for carbon and nitrogen removal*. *Wat. Sci. Tech.*, 29(10-11):377–384, 1994.
- [244] M. WAGNER, G. RATH, R. AMANN, H.-P. KOOPS UND K.-H. SCHLEIFER: *In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 18:251–264, 1995.
- [245] E. MORGENROTH, A. OBERMAYER, E. ARNOLD, A. BRÜHL, M. WAGNER UND P. A. WILDERER: *Effect of long-term idle periods on the performance of sequencing batch reactors*. *Wat. Sci. Tech.*, 41(1):105–113, 2000.
- [246] Y. AOI, T. MIYOSHI, T. OKAMOTO, S. TSUNEDA, A. HIRATA, A. KITAYAMA UND T. NAGAMUNE: *Microbial ecology of nitrifying bacteria in wastewater treatment process examined by fluorescence in situ hybridization*. *J. Biosci. Bioeng.*, 90(3):234–240, 2000.
- [247] A. PRINCIC, I. MAHNE, F. MEGUSAR, E. A. PAUL UND J. M. TIEDJE: *Effects of pH and oxygen and ammonium concentration on the community structure of nitrifying bacteria from wastewater*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64(10):3584–3590, 1998.
- [248] S. A. HUBER UND F. H. FRIMMEL: *Gelchromatographische Bestimmung mit Kohlenstoffdetektion (LC-OCD): Ein rasches und aussagekräftiges Verfahren zur Charakterisierung hydrophiler organischer Wasserinhaltsstoffe*. *Vom Wasser*, 86:277–290, 1996.
- [249] A. M. BRAUN, M. T. MAURETTE UND E. OLIVEROS: *Photochemical Technology*. Wiley, Chichester, 1991.
- [250] L. F. KOSAK-CHANNING UND G. R. HELZ: *Solubility of ozone in aqueous solutions of 0-0.6 M ionic strength at 5-30 °C*. *Environ. Sci. Technol.*, 17(3):145–149, 1983.

- [251] J. L. SOTELO, F. J. BELTRAN, F. J. BENITEZ UND J. BELTRAN-HEREDIA: *Henry's law constant for the ozone-water system*. *Wat. Res.*, 23(10):1239–1246, 1989.
- [252] T. GRIEBE, G. SCHAULE, J. SECKER UND H.-C. FLEMMING: *Bestimmung der stoffwechselaktiven Bakterien im Belebtschlamm*. In: H. LEMMER, T. GRIEBE UND H.-C. FLEMMING (Herausgeber): *Ökologie der Abwasserorganismen*, Seiten 155–168. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1996.
- [253] T. BRINKMANN: *Alkalischer und solarinduzierter Abbau von natürlicher organischer Materie*. In: F. H. FRIMMEL (Herausgeber): *Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH)*, Band 37. 2003.
- [254] S. HESSE UND F. H. FRIMMEL: *Biochemical characterization of refractory organic substances*. *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 27(2):94–97, 1999.



# Abbildungsverzeichnis

2.1	Resonanzstrukturen von Ozon . . . . .	8
2.2	Ozonzerfall und -reaktionen in wässriger Lösung . . . . .	9
2.3	Ribosomzusammensetzung . . . . .	27
2.4	Vorgehensweise bei FISH . . . . .	28
2.5	Stammbaum der <i>Bacteria</i> . . . . .	32
2.6	Stammbaum der Nitrifikanten . . . . .	40
3.1	Oxidationsreaktor . . . . .	53
3.2	Details des Oxidationsreaktors . . . . .	54
3.3	$K_{La}$ -Wert . . . . .	56
3.4	Aufbau Biofilmreaktor . . . . .	60
4.1	CSB-Verringerung bei AbWa1 . . . . .	79
4.2	Toxizitätsverlauf bei AbWa1 . . . . .	79
4.3	BSB bei AbWa1 nach chemischer Oxidation . . . . .	80
4.4	LC-DOC von AbWa1 . . . . .	82
4.5	CSB-Verringerung bei AbWa2 . . . . .	83
4.6	Toxizitätsverlauf bei AbWa2 . . . . .	86
4.7	Abbau des AOX bei AbWa2 . . . . .	86
4.8	HPLC-Analyse von AbWa2 . . . . .	88
4.9	CSB-Verringerung bei AbWa3 . . . . .	91
4.10	Toxizitätsverlauf bei AbWa3 . . . . .	91
4.11	HPLC-Analyse von AbWa3 . . . . .	93
4.12	CSB- und DOC-Abbau bei inverser Behandlung von AbWa3 . . . . .	94
4.13	CSB-Verringerung bei AbWa4 . . . . .	96
4.14	Toxizitätsverlauf bei AbWa4 . . . . .	96
4.15	Absorptionsspektren für AbWa4 . . . . .	98
4.16	HPLC-Analyse von AbWa4 und Tinopal DMS . . . . .	99
4.17	HPLC-Analyse von AbWa4 nach Oxidation . . . . .	100
4.18	CSB-Verringerung und Toxizität bei AbWa5 . . . . .	103
4.19	Abbau der Einzelsubstanzen bei AbWa5 . . . . .	104
4.20	Abbau der Einzelsubstanzen und des DOC . . . . .	105

4.21	Toxizität der Einzelsubstanzen nach Oxidation . . . . .	107
4.22	LC-DOC der Einzelsubstanzen von AbWa5 . . . . .	108
4.23	DOC-Elimination von AbWa5 in Festbettbiofilmreaktoren . . . . .	111
4.24	LC-DOC von AbWa5 ozont, Biofilmreaktorversuch . . . . .	112
4.25	CTC-Messung AbWa5 ozont, Biofilmreaktorversuch . . . . .	114
4.26	Biofilmreaktorversuch, FISH mit der Sonde EUB338 . . . . .	115
4.27	Biofilmreaktorversuch, FISH bei SAW-Dosierung . . . . .	116
4.28	Biofilmreaktorversuch, FISH bei SAW und AbWa5 ozont-Dosierung .	117
4.29	Nitrifikation AbWa5 (ozont), Biofilmreaktorversuch . . . . .	120
4.30	Nitrifikation AbWa5 (ozont und unbeh.), Biofilmreaktorversuch . . .	121
4.31	autotrophe Nitrifikation, Biofilmreaktorversuch . . . . .	124
4.32	Nitrifikation mit Acetat und Pyruvat, Biofilmreaktorversuch . . . . .	125
4.33	LC-DOC von AbWa5 (ozont) mit $\text{NH}_4^+$ , Biofilmreaktorversuch . . . .	127
4.34	FISH-Analyse Nitrifikation, Kontrollreaktor . . . . .	134
4.35	FISH-Analyse Nitrifikation, Acetatdosierung . . . . .	135
4.36	FISH-Analyse Nitrifikation, Acetat- und Pyruvatdosierung . . . . .	136
4.37	FISH-Analyse Nitrifikation, Dosierung von AbWa5 ozont . . . . .	137
4.38	FISH-Analyse Nitrifikation, Dosierung von AbWa5 . . . . .	138
B.1	Ozonproduktion des Ozongenerators . . . . .	183
B.2	Emissionsspektren der eingesetzten UV-Strahler . . . . .	184
B.3	Durchfluss und Durchmischungszeit . . . . .	185
B.4	Förderleistung Wasserstoffperoxid-Dosierpumpe . . . . .	185
C.1	Inhaltsstoffe Abwasser 1 . . . . .	187
C.2	Inhaltsstoff Abwasser 2 . . . . .	188
C.3	Inhaltsstoff Abwasser 3 . . . . .	188
C.4	Inhaltsstoff Abwasser 4 . . . . .	189
C.5	Einzelsubstanzen aus Abwasser 3 und Abwasser 4 . . . . .	189
C.6	Inhaltsstoffe Abwasser 5 . . . . .	190
F.1	Kalibrierung der Mikroskopaufnahmen . . . . .	210



# Tabellenverzeichnis

2.1	Reaktorcharakterisierung . . . . .	16
2.2	Kultivierbare Bakterien . . . . .	25
2.3	Gruppen der Proteobakterien . . . . .	35
2.4	Einfluss äußerer Faktoren auf die Nitrifikation . . . . .	45
3.1	Zusammensetzung SAW . . . . .	61
3.2	Zusammensetzung Nitrifikationsmedium . . . . .	62
3.3	Zusammensetzung Hybridisierungspuffer . . . . .	63
3.4	Zusammensetzung Waschpuffer . . . . .	63
3.5	Zusammensetzung Phosphatpuffer . . . . .	64
3.6	Fluoreszenzfarbstoffe . . . . .	65
3.7	Gensonden für System 1 . . . . .	65
3.8	Gensonden für System 2 . . . . .	66
3.9	Fluoreszenzfilter . . . . .	69
3.10	Daten Abwasser 1 . . . . .	70
3.11	Daten Abwasser 2 . . . . .	71
3.12	Daten Abwasser 3 . . . . .	71
3.13	Daten Abwasser 4 . . . . .	71
3.14	Daten Abwasser 5 . . . . .	72
3.15	Oxidationsexperimente . . . . .	73
3.16	Oxidationsexperimente Einzelsubstanzen . . . . .	74
3.17	Populationsanalyse System 1, Medien . . . . .	75
3.18	Populationsanalyse System 2, Medien . . . . .	76
4.1	Oxidation AbWa1 . . . . .	78
4.2	Oxidation AbWa2 . . . . .	84
4.3	Oxidation AbWa3 . . . . .	90
4.4	Oxidation AbWa4 . . . . .	95
4.5	Oxidation AbWa5 . . . . .	102
4.6	BSB von AbWa5 nach Ozonung . . . . .	109
D.1	Daten zu den Oxidationsversuchen Abwasser 1 . . . . .	191

D.2	Daten zu den Oxidationsversuchen Abwasser 2 . . . . .	192
D.3	Daten zu den Oxidationsversuchen Abwasser 3 . . . . .	193
D.4	Daten zur veränderten Verfahrensführung Abwasser 3 . . . . .	194
D.5	Daten zu den Oxidationsversuchen Abwasser 4 . . . . .	194
D.6	Daten zu den Oxidationsversuchen Abwasser 5 . . . . .	195
D.7	Daten zur Einzelstoffanalytik der Oxidationsversuche Abwasser 5 . .	196
D.8	Analytik zu den Oxidationsversuchen der Einzelsubstanzen von Abwasser 5 . . . . .	196
D.9	DOC-Werte zu den Oxidationsversuchen der Einzelsubstanzen von Abwasser 5 . . . . .	197
D.10	Toxizitätswerte zu den Oxidationsversuchen der Einzelsubstanzen von Abwasser 5 . . . . .	197
E.1	DOC-Werte für Biofilmreaktorversuch von Abwasser 5 ozont mit SAW	199
E.2	DOC-Werte für Biofilmreaktorversuch von Abwasser 5 mit SAW . . .	200
E.3	Daten Biofilmreaktorversuch Nitrifikation, BFR 1 . . . . .	200
E.4	Daten Biofilmreaktorversuch Nitrifikation und DOC-Abbau, BFR 2 .	201
E.5	Daten Biofilmreaktorversuch Nitrifikation und DOC-Abbau, BFR 3 .	202
E.6	Daten Biofilmreaktorversuch Nitrifikation und DOC-Abbau, BFR 4 .	203
E.7	Daten Biofilmreaktorversuch Nitrifikation und DOC-Abbau, BFR 5 .	204
E.8	Daten Biofilmreaktorversuch Nitrifikation und DOC-Abbau, BFR 6 .	205
E.9	Daten Biofilmreaktorversuch Nitrifikation, BFR 7 . . . . .	206
E.10	Daten Biofilmreaktorversuch Nitrifikation und DOC-Abbau, BFR 8 .	207

# Anhang A

## Symbol- und Chemikalienverzeichnis

### Symbole

Symbol	Bedeutung	Einheit
a	volumenbezogene Grenzfläche A/V	$\text{m}^2/\text{m}^3$
A	Grenzfläche	$\text{m}^2$
$c_0$	molare Ausgangskonzentration	mol/L
$c_L$	Stoffmengenkonzentration in der Flüssigkeit	mol/L
$c_{L^*}$	Gleichgewichtskonzentration	mol/L
$c_{L_a^*}$	Gleichgewichtskonzentration    Reaktorausgang	mol/L
$c_{L_e^*}$	Gleichgewichtskonzentration    Reaktoreingang	mol/L
d	Tag	
$E^0$	Normalpotenzial	V
$G_L$	Verdünnungsstufe G, bei der die Hemmung der Leuchtintensität $L < 20\%$ beträgt	
h	<i>Plancksche</i> Konstante	$6,6 \cdot 10^{-34} \text{ Js}$
H	<i>Henry</i> Konstante	atm L mol <sup>-1</sup> bzw. kPa mol fr <sup>-1</sup>
I	Ionenstärke	mol/L
$k_{La}$	Stoffübergangskoeffizient	s <sup>-1</sup>

Symbol	Bedeutung	Einheit
$\dot{n}$	Photonenstrom	Einstein $\text{s}^{-1} = 1$ mol Photonen $\text{s}^{-1}$
$N_a$	<i>Loschmidt</i> -Zahl	$6 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$
P	elektrische Leistung	W
Q	Gasvolumenstrom	mol/L
SAK	spektraler Absorptionskoeffizient	$\text{m}^{-1}$
T	Temperatur	K
V	Volumen	L
$\Gamma$	Abnahme der Leuchtintensität nach Inkubation	
$\epsilon$	Extinktionskoeffizient	$\text{L mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$
$\kappa$	el. Leitfähigkeit	$\mu\text{S/cm}$
$\lambda$	Wellenlänge	nm
$\nu$	Frequenz	$\text{s}^{-1}$
$\phi$	Quantenausbeute	
$\rho$	Massekonzentration	mg/L
$\rho(O_3)_a$	Ozonkonzentration im Reaktionsgas (aus)	mg/L
$\rho(O_3)_e$	Ozonkonzentration im Reaktionsgas (ein)	mg/L

## Akronyme

Akronym	Bedeutung
AOB	Ammonium-oxidierende Bakterien
AOX	an Aktivkohle adsorbierbare organische Halogene
BA	Butyraldehyd
BD	Butendiol
BDOC	Biologisch eliminierbarer DOC
BFR	(Festbett-)Biofilmreaktor
BSB <sub>n</sub>	Biochemischer Sauerstoffbedarf in <i>n</i> Tagen
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
CTC	5-Cyano-2,3-di-4-tolyl-tetrazoliumchlorid
DAD	Dioden Array-Detektor
DAPI	4'6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DAS	4,4-Diaminostilben-2,2-disulfonsäure
DGGE	Denaturierende Gradientengel-Elektrophorese
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNS	4,4-Dinitrostilben-2,2-disulfonsäure
DO	Gelöstsauerstoff-Konzentration ( <i>dissolved oxygen</i> )
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff ( <i>dissolved organic carbon</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung
GC	Gaschromatographie
HPLC	hochauflösende Flüssigkeitschromatographie ( <i>high performance liquid chromatography</i> )
HRT	hydraulische Retentionszeit ( <i>hydraulic retention time</i> )
LC	Flüssigkeitschromatographie ( <i>liquid chromatography</i> )
LC-DOC	Gelchromatographie zur DOC-Fraktionierung
MD	Mitteldruck-Strahler
mRNA	<i>messenger</i> RNA (Ribonukleinsäure)
n.b.	nicht bestimmt
ND	Niederdruck-Strahler
NOB	Nitrit-oxidierende Bakterien
n.t.	nicht toxisch
p.A.	pro analysi (zur Analyse)

Akronym	Bedeutung
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PD	Propyldioxepen
P.F.	Photo-Fenton-Verfahren
PFA	Paraformaldehyd
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SAK	spektraler Absorptionskoeffizient
SAW	synthetisches Abwasser
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecylsulfate</i> )
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
WW	Wechselwirkung
WWTP	<i>Waste water treatment plant</i>
z.S.	zur Synthese

## Chemikalien

Chemikalie, Reinheit	Hersteller
Acetat, Na-Salz ( $\text{CH}_3\text{COONa}$ ), p.A.	Merck
Acetonitril (LiChrosolv), für die HPLC	Merck
Ammoniumacetat ( $\text{NH}_4\text{C}_2\text{H}_3\text{O}_2$ ), p.A.	Merck
Ammoniumchlorid ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ), p.A.	Merck
Ammoniummolybdat-Tetrahydrat ( $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ )	Aldrich
Ammoniumsulfat ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), p.A.	Merck
Bimsstein, gekörnt, p.A.	Merck
Borsäure ( $\text{H}_3\text{BO}_3$ ), p.A.	Merck
cis-2-Buten-1,4-diol ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}_2$ ), 95 %	Merck
Butyraldehyd ( $\text{C}_4\text{H}_8\text{O}$ ), > 99 %	Merck
Calciumchlorid-Dihydrat ( $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), p.A.	Merck
Citifluor AF1 (Glycerol/PBS-Lösung)	Citifluor Ltd.
5-Cyano-2,3-di-4-tolyl-tetrazoliumchlorid (CTC)	Polysciences
demineralisiertes Wasser (Enthärtungsanlage VMK20)	SG Wasserauf- bereitung GmbH
4'6 Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Merck
Dichlorisocyanurat ( $\text{C}_3\text{Cl}_2\text{N}_3\text{NaO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), > 99 %	Fluka
2,4-Dinitrophenylhydrazin (DNPH, $\text{C}_6\text{H}_6\text{N}_4\text{O}_4$ ), p.A.	Fluka
Eisenchlorid-Hexahydrat ( $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), p.A.	Merck
Eisensulfat-Heptahydrat ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), p.A.	Fluka
Entionisiertes Wasser (Milli-Q Plus),	Millipore
Ethanol ( $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ ), absolut, p.A.	Merck
Ethylendiamintetraacetat-Dinatriumsalz (Titriplex III, $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), p.A.	Merck
Fleischextrakt, für die Mikrobiologie	Merck
Formamid ( $\text{CH}_3\text{NO}$ ), für die Mikrobiol.	Calbiochem
Gelatine, Mol. Biol. Grade	Calbiochem
Harnstoff ( $\text{H}_2\text{NCONH}_2$ ), p.A.	Merck
1,6-Hexandiol ( $\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_2$ ), z.S.	Merck
Immersionsöl, ohne Eigenfluoreszenz	Leica Microsy- stems
Indigotrisulfonat-Kaliumsalz ( $\text{C}_{16}\text{H}_7\text{K}_3\text{N}_2\text{O}_{11}\text{S}_3$ )	Riedel-de Haën

Chemikalie, Reinheit	Hersteller
Kaliumchlorid (KCl), p.A.	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ), p.A.	Merck
di-Kaliumhydrogenphosphat (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ), p.A.	Merck
di-Kaliumoxalat-Monohydrat (K <sub>2</sub> C <sub>2</sub> O <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O), p.A.	Merck
Kupfersulfat-Pentahydrat (CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O), p.A.	Merck
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O), p.A.	Merck
Manganoxid (MnO <sub>2</sub> ), p.A. (gefällt, aktiv)	Merck
Mangansulfat-Monohydrat (MnSO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O), rein	Merck
Methanol (LiChrosolv), für die HPLC	Merck
Natriumchlorid (NaCl), p.A.	Merck
tri-Natriumcitrat-Dihydrat (C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> Na <sub>3</sub> O <sub>7</sub> · 2H <sub>2</sub> O), p.A.	Merck
di-Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> · 2H <sub>2</sub> O), p.A.	Merck
Natriumhydroxid (NaOH), p.A.	Merck
Natrium-n-Dodecylsulfat, Mol. Biol. Grade	Calbiochem
Natriumsalicylat (C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> NaO <sub>3</sub> ), p.A.	Merck
Natriumsulfat (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), p.A.	Merck
Natronkalk-Plätzchen mit Indikator (enthält NaOH, KOH), p.A.	Merck
2-Nitroprussidnatrium-Dihydrat (Na <sub>2</sub> [Fe(CN) <sub>5</sub> NO] · 2H <sub>2</sub> O), p.A.	Merck
Paraformaldehyd ((CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> ), für die Mikrobiol.	Sigma
Pepton aus Casein, für die Mikrobiol.	Merck
Phthalsäure (C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> (COOH) <sub>2</sub> ), p.A.	Merck
Propyldioxepen (C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub> ), > 97 %	Roche
Pyruvat, Na-Salz (C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>3</sub> ), für biochem. Zwecke	Merck
Salzsäure (HCl), 25 %, p.A.	Merck
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ), 95-97 %, p.A.	Merck
Tinopal DMS	Ciba
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris, C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> ), Mol. Biol. Grade	Calbiochem
Wasserstoffperoxid-Lösung (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ), 35 %	Biesterfeld
Zinksulfat-Heptahydrat (ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O), p.A.	Fluka



## Anhang B

### Angaben zum Oxidationsreaktor

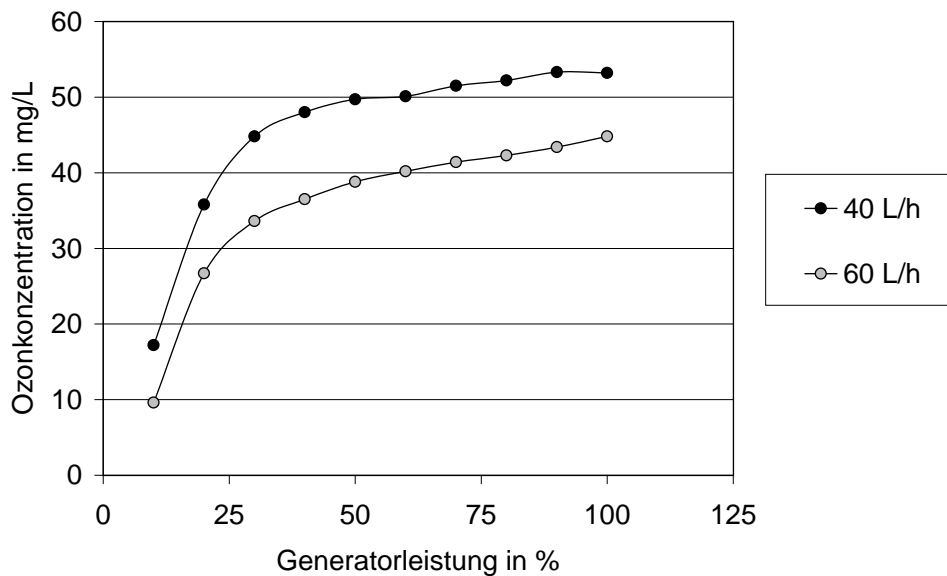


Abbildung B.1: Ozonproduktion des Ozongenerators (Anseros, Ozomat COM) aus Sauerstoff bei verschiedenen Gasvolumenströmen. Einstellung bei den Oxidationsversuchen: Generatorleistung: 100 %, Gasvolumenstrom  $Q = 40 \text{ L/h}$ .

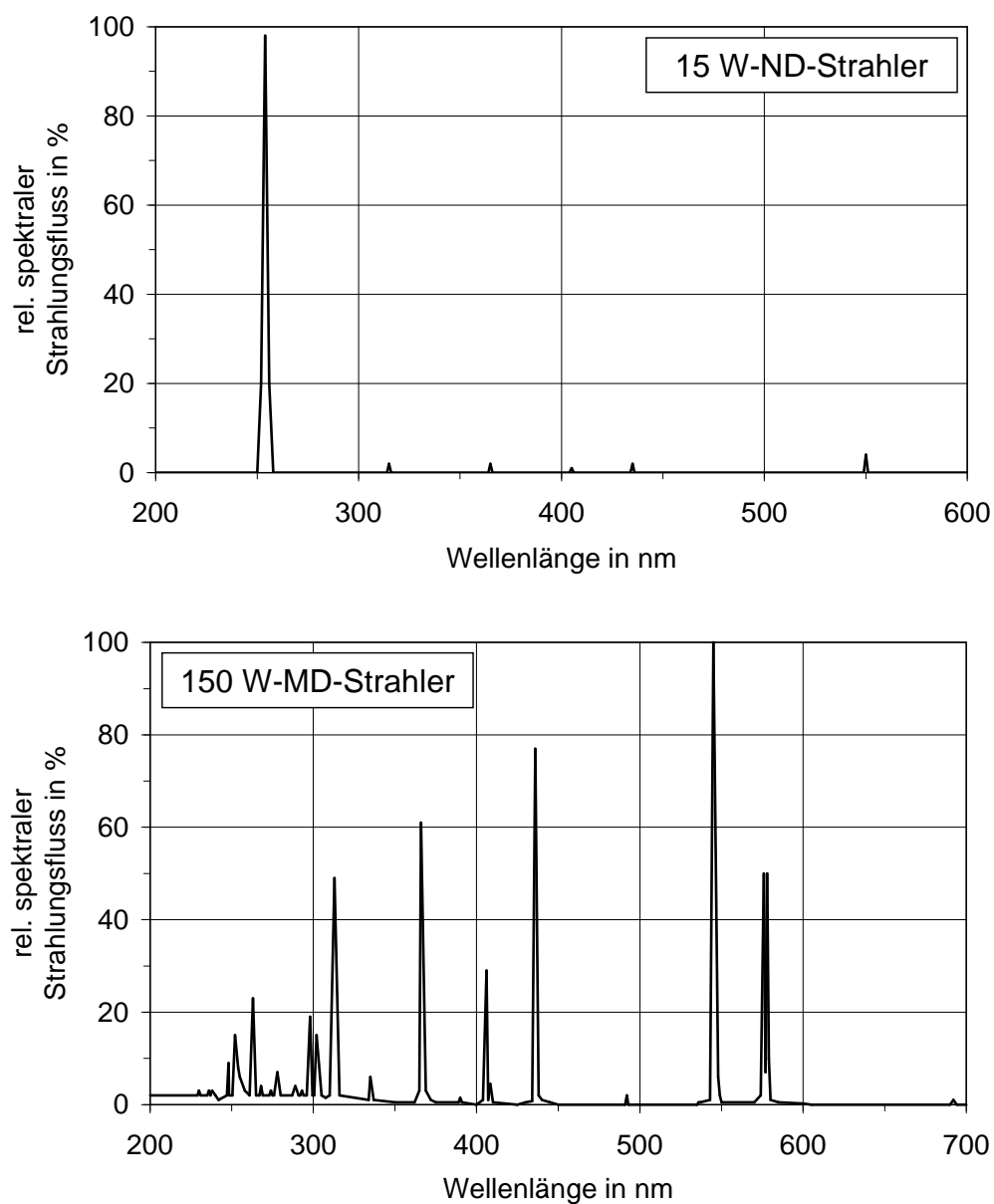


Abbildung B.2: Emissionsspektren der eingesetzten UV-Strahler, oben: 15 W-Niederdruck-Strahler, unten: 150 W-Mitteldruck-Strahler.

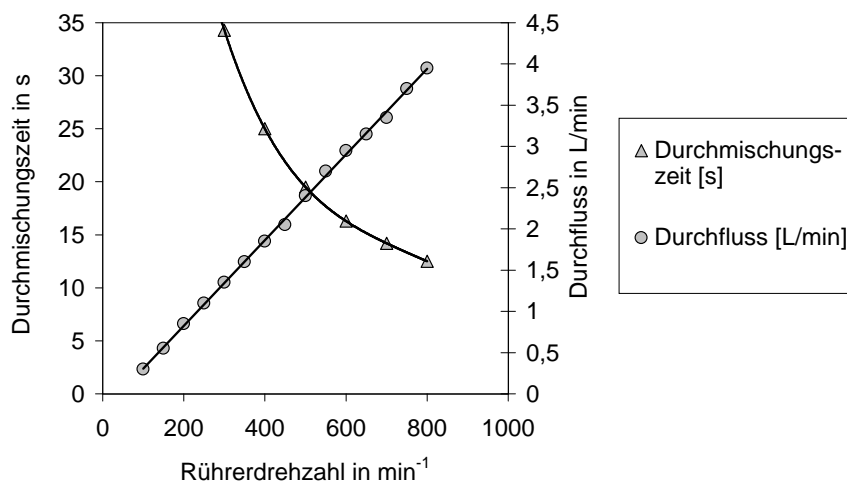


Abbildung B.3: Durchfluss und Durchmischungszeit des Oxidationsreaktors bei verschiedenen Rührerdrehzahlen. Einstellung bei den Oxidationsversuchen: 350-375 min<sup>-1</sup>.

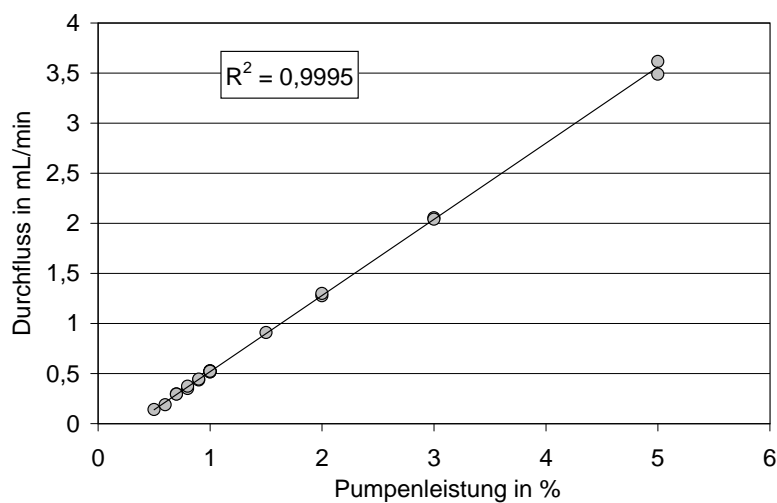


Abbildung B.4: Förderleistung der Wasserstoffperoxid-Dosierpumpe unter realen Einsatzbedingungen, gravimetrische Bestimmung.



## Anhang C

### Angaben zu den untersuchten Abwässern

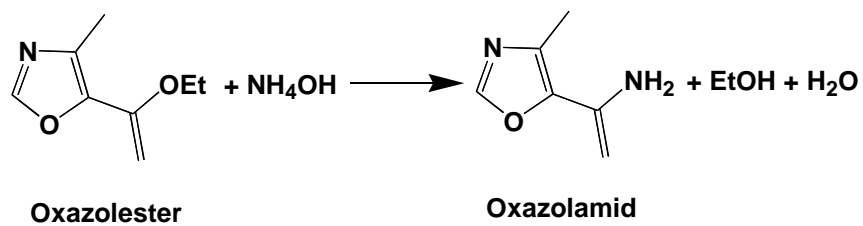


Abbildung C.1: Abwasser 1: Produktion des Oxazolamids aus dem Oxazolester. Das Produkt Ethanol (EtOH) wird in einer Kolonne ausgetrieben. Ungefähr 10 % des Oxazolesters bildet Nebenprodukte, hauptsächlich N-haltige Heterocyclen.

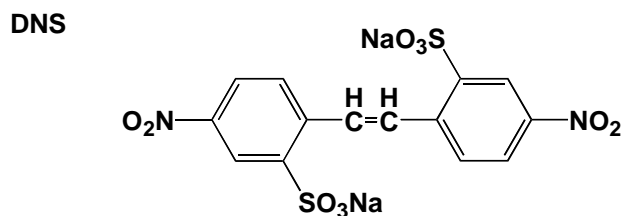


Abbildung C.2: Abwasser 2: Produktion der Vorläufersubstanz der optischen Aufheller DNS (4,4-Dinitrostilben-2,2-disulfonsäure).

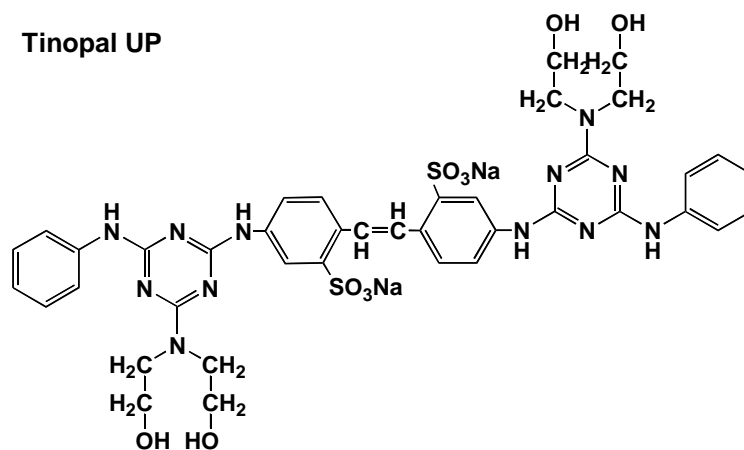


Abbildung C.3: Abwasser 3: Produktion des optischen Aufhellers Tinopal UP (4,4-Bis[(4-anilino-6-bis(2-hydroxyethyl)amino-1,3,5-triazin-2-yl)amino] stilben-2,2-disulfonat).

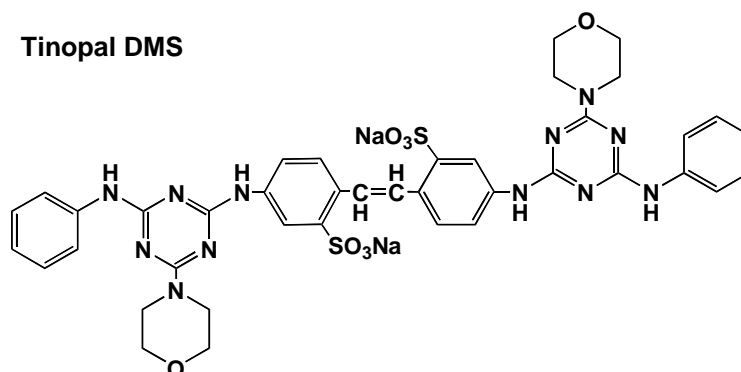


Abbildung C.4: Abwasser 4: Produktion des optischen Aufhellers Tinopal DMS (4,4-Bis[(4-anilino-6-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)amino]stilben-2,2-disulfonat).

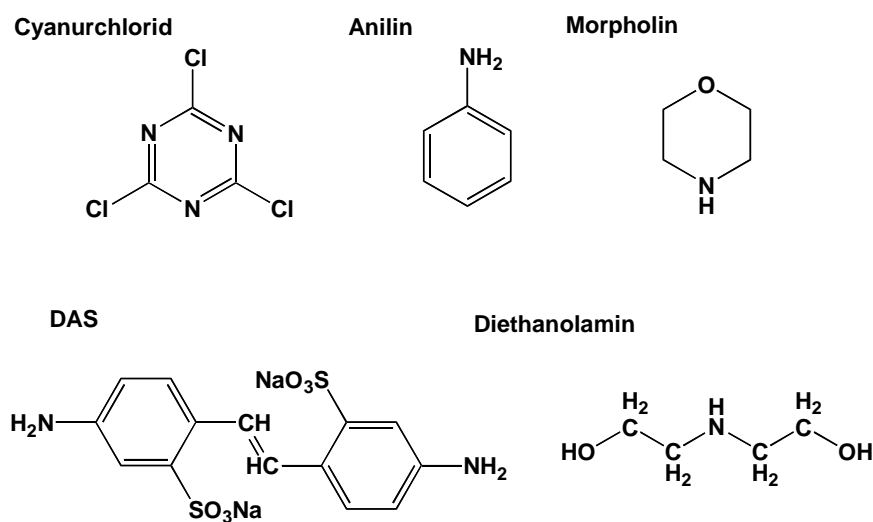


Abbildung C.5: Mögliche Substanzen in den Abwässern 3 und 4 aus den Syntheseschritten der optischen Aufheller. DAS = 4,4-Diaminostilben-2,2-disulfonsäure.

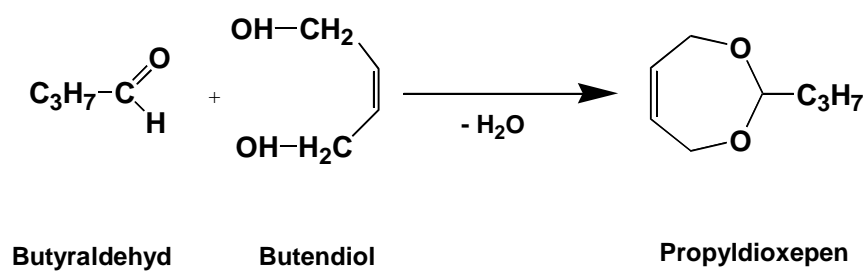


Abbildung C.6: Abwasser 5: Herstellung des Propyldioxepens aus Butyraldehyd und Butendiol (Kondensationsreaktion). Alle drei Substanzen sind Hauptinhaltsstoffe von Abwasser 5.



# Anhang D

## Daten zu den Oxidationsversuchen

Tabelle D.1: Daten zu den Oxidationsversuchen von Abwasser 1, unbehandeltes Abwasser (Original, Arbeitslösung 1:10), nach Oxidation und nach BSB-Messung (1:10 Verdünnung, 28 Tage, Werte auf Arbeitslösung berechnet).

	CSB mg/L	in	DOC mg/L	in	SAK <sub>436</sub> m <sup>-1</sup>	in	SAK <sub>254</sub> m <sup>-1</sup>	in	G <sub>L</sub> -Wert
Original	7225		2925		26,7		10360		64
nach BSB (1560 mg/L)	6400		3386		20		9835		30
Ozonung	5723		2766		1		1820		71
nach BSB (4080 mg/L)	2250		790		5		1715		0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (150 W)	7020		3213		30		8680		99
nach BSB (1870 mg/L)	6000		2395		30		8375		18
Peroxon	5873		2735		1		2070		240
nach BSB (3480 mg/L)	2250		835		5		1835		0

Tabelle D.2: Daten zu den Oxidationsversuchen von Abwasser 2, unbehandeltes Abwasser (Original, Arbeitslösung 1:10), nach Oxidation und nach BSB-Messung (1:5 Verdünnung, 28 Tage, Werte auf Arbeitslösung berechnet). Werte in Klammern jeweils Ausgangswerte (je Versuch neu gemessen).

	CSB mg/L	in	DOC mg/L	in	SAK <sub>436</sub> m <sup>-1</sup>	in	SAK <sub>254</sub> m <sup>-1</sup>	in	AOX mg/L	in	G <sub>L</sub> - Wert
Original	2840		990		558		5680		23,2		14
nach BSB (135 mg/L)	2660		1008		588		5660				6
Ozonung pH 3,0	2208		866		10		4585		16,5		
Ozonung pH 9,0	(2625) 2005		(989) 794		(580) 33		(5240) 3553		15,6		3
nach BSB (285 mg/L)	1620		642		45		3050				0
O <sub>3</sub> /UV (15 W)	(3103) 2266		(1123) 968		(602) 30		(5725) 4085		11,9		100
nach BSB (225 mg/L)	1633		714		20		3728				0
O <sub>3</sub> /UV (150 W)	(2966) 1783		(1068) 865		(562) 32		(5260) 2985		12,2		107
nach BSB (230 mg/L)	1320		644		53		2825				0
Peroxon 1	(2816) 1816		(1068) 784		(560) 30		(5225) 2757		9,4		230
nach BSB (105 mg/L)	1380		673		35		2543				0
Peroxon 2	(2840) 973		(1017) 549		(590) 7		(5532) 852		10,3		3
nach BSB (330 mg/L)	540		286		20		823				0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (15 W)	(2913) 2695		(1122) 1034		(492) 502		(5470) 5297		21,4		6
nach BSB (160 mg/L)	1947		848		375		4882				0
P.F. UV 150 W (1/100)	(2840) 1765		(1058) 688		(558) 112 (pH3)		(5710) 3725		20,3		60
nach BSB (113 mg/L)	1478		668		242 (pH7)		3165				
P.F. UV 150 W/O <sub>3</sub> (1/20)	(2795) 867		(1042) 370		(558) 83 (pH3)		(5465) 2203				94
nach BSB (425 mg/L)	506		262		68 (pH7)		1275				

Tabelle D.3: Daten zu den Oxidationsversuchen von Abwasser 3, unbehandeltes Abwasser (Original, Arbeitslösung 1:5), nach Oxidation und nach BSB-Messung (1:5 Verdünnung, 28 Tage, Werte auf Arbeitslösung berechnet). Werte in Klammern jeweils Ausgangswerte (je Versuch neu gemessen).

	CSB mg/L	in	DOC mg/L	in	SAK <sub>254</sub> m <sup>-1</sup>	in	G <sub>L</sub> -Wert
Original	1980		490		2400		1
nach BSB (1030 mg/L)	725		156		1878		0
Ozongung	(1895)	1620	(492)	471	(2197)	1496	53
nach BSB (645 mg/L)	705		230		1226		20
O <sub>3</sub> /UV (15 W)	(2116)	1636	(565)	530	(2549)	1526	341
nach BSB (610 mg/L)	1228		398		1156		3
O <sub>3</sub> /UV (150 W)	(1963)	1446	(534)	503	(2629)	1401	58
nach BSB (485 mg/L)	820		372		1007		3
Peroxon 1	(1960)	1286	(572)	521	(2472)	1471	
nach BSB (259 mg/L)	1066		398		1057		
Peroxon 2	(1911)	960	(534)	371	(2501)	897	30
nach BSB (495 mg/L)	520		163		238		0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (15 W)	(1923)	1668	(520)	537	(2525)	2419	4
nach BSB (505 mg/L)	973		274		2317		1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (150 W)	(1970)	1646	(627)	522	(2428)	2248	3
nach BSB (815 mg/L)	660		186		2034		1
P.F. UV 150 W/O <sub>3</sub> (1/20)	(1935)	1308	(461)	322	(2411)	1155	17
nach BSB (685 mg/L)	360		135		487		

Tabelle D.4: Daten zur veränderten Verfahrensführung von Abwasser 3, unbehandeltes Abwasser (Original, Arbeitslösung 1:5), nach biologischem Abbau (1), nach Peroxon 2 und nach biologischem Abbau (2) (BSB-Messung, 1:5 Verdünnung, 28 Tage, Werte auf Arbeitslösung berechnet).

	CSB in mg/L	DOC in mg/L
Original	1890	492
nach Bioabbau (1)	757	221
nach Peroxon 2	310	159
nach BSB (13 mg/L)	308	144

Tabelle D.5: Daten zu den Oxidationsversuchen von Abwasser 4, unbehandeltes Abwasser (Original, Arbeitslösung 1:2 bzw. 1:25 (mit Ozon)), nach Oxidation und nach BSB-Messung (1:5 Verdünnung bzw. unverdünnt (mit Ozon), 28 Tage, Werte auf Arbeitslösung berechnet). Werte in Klammern jeweils Ausgangswerte (je Versuch neu gemessen).

	CSB in mg/L	$G_L$ -Wert
Original (1:2)	2946	3
nach BSB (350 mg/L)	3416	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (15 W)	(2946) 2621	2
nach BSB (325 mg/L)	1793	3
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (150 W)	(3576) 2921	2
nach BSB (350 mg/L)	1837	6
Original (1:25)	256	0
nach BSB (27 mg/L)	286	0
O <sub>3</sub> /UV (150 W)	(146) 113	52
nach BSB (44 mg/L)	71	
Peroxon 2	(256) 84	2
nach BSB (44 mg/L)	78	
P.F. UV 150 W/O <sub>3</sub> (1/20)	(238) 56	0
nach BSB (35 mg/L)	36	
Ozonung 2	(91) 54	

Tabelle D.6: Daten zu den Oxidationsversuchen von Abwasser 5, unbehandeltes Abwasser (Original, Arbeitslösung 1:40), nach Oxidation und nach BSB-Messung (1:10 Verdünnung, 28 bzw. 47 Tage, Werte auf Arbeitslösung berechnet). Werte in Klammern jeweils Ausgangswerte (je Versuch neu gemessen).

	CSB mg/L	in	DOC mg/L	in	SAK <sub>254</sub> m <sup>-1</sup>	in	G <sub>L</sub> -Wert
Original	7760		1900		9,7		24
nach BSB <sub>47</sub> (1420 mg/L)	6300		1748		34,0		0
Ozomung	(7760)	6170	(1900)	1865	(9,7)	34,6	1333
nach BSB <sub>47</sub> (330 mg/L)	5020		2042		18		76
O <sub>3</sub> /UV (15 W)	(7903)	6213	(1852)	1987	(12,3)	42,5	2615
nach BSB <sub>28</sub> (140 mg/L)	5245		1824		51,0		1896
O <sub>3</sub> /UV (150 W)	(7907)	5197	(1952)	1902	(11,6)	32,9	1303
nach BSB <sub>28</sub> (500 mg/L)	4588		1490		43		45
Peroxon	(7890)	6493	(1875)	2042	(12,6)	65,6	4380
nach BSB <sub>28</sub> (230 mg/L)	5350		1752		60		2130
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (15 W)	(7760)	7450	(1900)	1747	(9,7)	74,7	2084
nach BSB <sub>47</sub> (530 mg/L)	6650				56		>128
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (150 W)	(7760)	6890	(1900)	1948	(9,7)	79	1259
nach BSB <sub>47</sub> (260 mg/L)	6490				72		>128

Tabelle D.7: Analytik der Substanzen Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepen (PD) nach Oxidation von Abwasser 5. Unbehandeltes Abwasser (Original, Arbeitslösung 1:40) und nach Oxidation. Bei BD und PD Doppelbestimmung, in Klammern Standardabweichung in %.

	BD in mg/L	BA in mg/L	PD in mg/L
Original	(1762; 2267) 2014,5 (100±17,7)	1115,2	(29; 38) 33,5 (100±19,0)
Ozonung	0	0	0
O <sub>3</sub> /UV (15 W)	0	449,5	0
O <sub>3</sub> /UV (150 W)	0	0	0
Peroxon	0	307,8	0
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (15 W)	(715; 437) 576 (100±34,1)	677,7	(23; 28) 25,5 (100±13,9)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> /UV (150 W)	0	70,4	0

Tabelle D.8: Analytik zu den Oxidationsversuchen der Einzelsubstanzen von Abwasser 5. Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepen (PD) nach Ozonung bzw. Peroxon-Behandlung (nach 0, 25 und 50 % Oxidationsmitteleintrag. Bei 100 % Eintrag vollständiger Abbau aller drei Substanzen). Teilweise Doppelbestimmung, in Klammern Standardabweichung in %.

	Ozonung pH 3,0			Peroxon pH 8,5		
	0 %	25 %	50 %	0 %	25 %	50 %
BD in mg/L	1205	0	0	1205	(104; 370) 237,0 (100±79,4)	0
BA in mg/L	(561,6; 564,1) 562,9 (100±0,3)	(104,1; 112,6) 108,4 (100±5,5)	0	(534,0; 478,9) 506,5 (100±7,7)	253,4	124,6
PD in mg/L	933	0	0	933	(0,0; 3,0) 1,5 (100±100)	0

Tabelle D.9: DOC-Werte zu den Oxidationsversuchen der Einzelsubstanzen von Abwasser 5. Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepe (PD) nach Ozonung bzw. Peroxon-Behandlung.

	Original		Ozonung pH 3,0		Peroxon pH 8,5	
	vor BSB	nach BSB	nach Ox.	nach BSB	nach Ox.	nach BSB
BD $\rho(\text{DOC})$ in mg/L	606	523	556	550	515	481
BA $\rho(\text{DOC})$ in mg/L	666	355	528	394	368	316
PD $\rho(\text{DOC})$ in mg/L	649	466	632	552	543	477

Tabelle D.10: Toxizitätswerte ( $G_L$ -Werte) zu den Oxidationsversuchen der Einzelsubstanzen von Abwasser 5. Butendiol (BD), Butyraldehyd (BA) und Propyldioxepe (PD) nach Ozonung bzw. Peroxon-Behandlung.

		Original	Ozonung pH 3,0		Peroxon pH 8,5	
			nach Ox.	nach BSB	nach Ox.	nach BSB
BD	$G_L$ -Wert	1	36	19	26	18
BA	$G_L$ -Wert	25	2163	1	36	3
PD	$G_L$ -Wert	13	1412	27	268	13





# Anhang E

## Daten zu den Experimenten in Biofilmreaktoren

Tabelle E.1: DOC-Werte für Biofilmreaktorversuch von Abwasser 5 ozont mit SAW, Zulauf- und Ablaufwerte der verschiedenen Reaktoren. BFR 1 und BFR 2: SAW, BFR 3 und BFR 4: SAW + AbWa5 ozont, BFR 5 und BFR 6: AbWa5 ozont.

Tag	Zulauf			Ablauf					
	BFR 1, 2	BFR 3, 4	BFR 5, 6	BFR 1	BFR 2	BFR 3	BFR 4	BFR 5	BFR 6
0	9,03	35,66	28,80	5,40	5,40	37,64	36,00	28,43	27,91
1	11,35	46,17	37,53	1,51	1,40	31,38	37,55	30,23	31,12
3	9,09	53,60	34,30	1,14	2,86	29,55	31,93	27,92	26,55
9	9,22	48,32	40,30	0,95	0,79	15,82	14,10	33,41	27,51
14	8,43	51,70	34,35	0,95	1,28	10,55	19,78	30,07	30,11
17	9,76	57,00	41,48	1,55	1,21	12,41	16,17	31,57	29,14
24	11,08	58,33	32,93	1,75	1,69	24,73	19,03	25,88	24,45
29	11,43	41,05	41,07	2,50	1,75	7,48	10,20	29,57	27,55

Tabelle E.2: DOC-Werte für Biofilmreaktorversuch von Abwasser 5 mit SAW, Zulauf- und Ablaufwerte der verschiedenen Reaktoren. BFR 1 und BFR 2: SAW, BFR 3 und BFR 4: SAW + AbWa5, BFR5 und BFR 6: AbWa5.

Tag	Zulauf			Ablauf					
	BFR 1, 2	BFR 3, 4	BFR 5, 6	BFR 1	BFR 2	BFR 3	BFR 4	BFR 5	BFR 6
7	13,9	43,45	37,10	2,26	2,68	24,35	20,45	43,40	34,00
14	8,80	38,75	33,00	2,42	2,22	17,80	13,90	35,55	31,95
22	6,08	42,20	35,35	2,28	1,86	16,40	11,75	34,65	39,75
26	8,48	37,67	35,52	1,80	1,83	16,33	14,28	35,67	38,35
29	15,29	49,32	37,22	2,37	3,02	28,15	23,20	39,52	38,03
34	11,70	48,10	37,45	1,10	1,26	18,88	22,80	40,30	39,95

Tabelle E.3: Analysenwerte zur Nitrifikation in Biofilmreaktor 1, Ablaufwerte. Ohne organische C-Quelle,  $\text{N-NH}_4^+$  (Zulauf) = 30 mg/L.

Tag	$\text{N-NH}_4^+$ in mg/L	$\text{N-NO}_2^-$ in mg/L	$\text{N-NO}_3^-$ in mg/L	Summe N in mg/L
0	2,44	4,25	4,22	10,91
3	3,14	4,06	19,87	27,07
6	1,92	0,96	23,37	26,25
10	7,39	2,49	16,85	26,73
13	10,10	2,34	21,29	33,73
17	6,60	2,36	17,10	26,06
20	6,58	1,97	16,79	25,34
24	0,75	0,03	24,89	25,67
27	16,70	3,13	5,37	25,20
33	20,00	0,00	6,03	26,03
42	22,95	0,24	5,91	29,10
54	16,53	0,00	10,91	27,44
61	18,08	0,34	4,09	22,50
75	10,99	0,00	17,00	27,99
82	2,70	0,00	26,45	29,15
89	1,66	0,00	28,34	30,00
96	2,25	0,00	31,54	33,79
102	1,55	0,00	22,87	24,42
110	6,99	0,00	21,04	28,03

Tabelle E.4: Analysenwerte zur Nitrifikation und DOC-Abbau in Biofilmreaktor 2, Ablaufwerte. Organische C-Quelle: Acetat  $\rho(\text{DOC}) = 10,32 \text{ mg/L}$  (bis Tag 73),  $\rho(\text{DOC}) = 41,28 \text{ mg/L}$  (Tag 73-110), DOC-Zulaufwerte nur teilweise gemessen, ansonsten theoretischer Wert verwendet.  $\text{N-NH}_4^+$  (Zulauf) =  $30 \text{ mg/L}$ .

Tag	$\text{N-NH}_4^+$ in mg/L	$\text{N-NO}_2^-$ in mg/L	$\text{N-NO}_3^-$ in mg/L	Summe N in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{zu}$ in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{ab}$ in mg/L
0		3,17	13,14		10,00	0,55
3	15,00	3,68	9,76	28,44	10,00	1,00
6	12,90	3,06	9,63	25,59	10,00	1,92
10	14,20	4,42	6,58	25,20	11,02	0,88
13	20,30	5,30	6,44	32,03	10,00	1,00
17	6,49	2,22	16,86	25,57	10,00	0,91
20	2,46	0,43	21,48	24,38	10,64	0,56
24	1,50	0,03	21,83	23,36	10,37	0,74
27	6,56	4,59	11,56	22,70	10,32	0,75
33	6,25	0,00	20,88	27,13	10,32	1,32
42	19,34	0,00	13,27	32,61	10,32	1,40
54	6,69	0,00	21,61	28,30	10,32	1,07
61	1,04	0,00	16,85	17,89	10,32	1,18
75	0,43	0,00	21,35	21,78	41,28	1,47
82	1,12	0,00	18,54	19,66	41,28	1,38
89	0,61	0,00	22,01	22,62	41,28	1,45
96	2,70	0,00	22,09	24,79	41,28	0,95
102	0,90	0,00	17,59	18,49	41,28	1,03
110	22,72	0,00	3,75	26,47	41,28	1,62

Tabelle E.5: Analysenwerte zur Nitrifikation und DOC-Abbau in Biofilmreaktor 3, Ablaufwerte. Organische C-Quelle: Acetat/Pyruvat  $\rho(\text{DOC}) = 11,82 \text{ mg/L}$  (bis Tag 73),  $\rho(\text{DOC}) = 47,28 \text{ mg/L}$  (Tag 73-110), DOC-Zulaufwerte nur teilweise gemessen, ansonsten theoretischer Wert verwendet.  $\text{N-NH}_4^+$  (Zulauf) =  $30 \text{ mg/L}$ .

Tag	$\text{N-NH}_4^+$ in mg/L	$\text{N-NO}_2^-$ in mg/L	$\text{N-NO}_3^-$ in mg/L	Summe N in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{zu}$ in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{ab}$ in mg/L
0		0,75	24,13		1,29	0,77
3	1,62	1,30	22,80	25,72	11,00	1,32
6	0,75	0,03	23,54	24,32	13,83	1,19
10	4,23	0,37	23,35	27,95	15,59	0,76
13	10,90	2,10	20,53	33,53	9,09	1,22
17	9,01	1,76	15,06	25,83	9,11	0,71
20	7,51	1,07	15,36	23,93	11,26	0,39
24	7,34	1,54	14,02	22,90	10,55	0,42
27	9,60	2,30	11,07	22,97	12,22	0,47
33	1,91	0,00	26,09	28,00	11,82	1,34
42	8,85	0,32	23,08	32,25	11,82	2,39
54	1,41	0,00	33,45	34,86	11,82	1,22
61	0,84	0,00	26,46	27,30	11,82	1,63
75	4,70	0,00	26,66	31,36	47,28	1,76
82	13,28	0,00	10,08	23,36	47,28	1,91
89	7,30	0,00	15,68	22,98	47,28	1,57
96	6,99	0,00	18,06	25,05	47,28	1,73
102	15,68	0,00	6,59	22,27	47,28	0,94
110	2,44	0,00	24,84	27,28	47,28	2,50

Tabelle E.6: Analysenwerte zur Nitrifikation und DOC-Abbau in Biofilmreaktor 4, Ablaufwerte. Organische C-Quelle: Abwasser 5 ozont  $\rho(\text{DOC}) = 10,12 \text{ mg/L}$  (bis Tag 73),  $\rho(\text{DOC}) = 40,48 \text{ mg/L}$  (Tag 73-110), DOC-Zulaufwerte nur teilweise gemessen, ansonsten theoretischer Wert verwendet.  $\text{N-NH}_4^+$  (Zulauf) =  $30 \text{ mg/L}$ .

Tag	$\text{N-NH}_4^+$ in mg/L	$\text{N-NO}_2^-$ in mg/L	$\text{N-NO}_3^-$ in mg/L	Summe N in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{zu}$ in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{ab}$ in mg/L
0		0,81	26,84		9,08	3,20
3	0,21	0,03	26,46	26,70	10,00	1,32
6	1,34	0,03	24,11	25,48	15,06	3,17
10	0,20	0,03	2,63	2,86	8,53	2,15
13	2,78	0,51	30,08	33,38	9,91	2,41
17	0,20	0,03	26,08	26,31	7,52	1,32
20	0,20	0,03	25,20	25,43	10,29	1,74
24	0,20	0,03	24,95	25,18	9,83	1,91
27	0,41	0,03	24,20	24,64	9,74	1,64
33	0,20	0,00	29,92	30,12	10,12	2,40
42	0,22	0,00	26,96	27,18	10,12	2,89
54	4,63	0,00	11,77	16,40	10,12	2,10
61	4,67	0,00	20,46	25,13	10,12	2,20
75	0,29	0,00	28,41	28,70	40,48	6,50
82	0,11	0,00	23,13	23,24	40,48	6,75
89	0,18	0,00	21,70	21,88	40,48	4,74
96	2,31	0,00	21,04	23,35	40,48	4,78
102	0,96	0,00	24,62	25,58	40,48	4,40
110	2,67	0,00	23,65	26,32	40,48	6,65

Tabelle E.7: Analysenwerte zur Nitrifikation und DOC-Abbau in Biofilmreaktor 5, Ablaufwerte. Organische C-Quelle: Abwasser 5 ozont  $\rho(\text{DOC}) = 5,06 \text{ mg/L}$  (bis Tag 73),  $\rho(\text{DOC}) = 20,24 \text{ mg/L}$  (Tag 73-110), DOC-Zulaufwerte nur teilweise gemessen, ansonsten theoretischer Wert verwendet.  $\text{N-NH}_4^+$  (Zulauf) =  $30 \text{ mg/L}$ .

Tag	$\text{N-NH}_4^+$ in mg/L	$\text{N-NO}_2^-$ in mg/L	$\text{N-NO}_3^-$ in mg/L	Summe N in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{zu}$ in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{ab}$ in mg/L
0		2,96	21,65		3,84	2,09
3	1,88	3,50	19,74	25,12	5,00	2,06
6	3,17	1,41	21,86	26,44	5,53	2,92
10	0,20	0,03	26,14	26,37	5,04	1,29
13	0,40	0,64	33,20	34,25	5,59	2,06
17	0,20	0,54	16,42	17,16	2,43	0,98
20	0,20	0,03	26,02	26,25	4,90	1,82
24	0,20	0,03	25,63	25,86	4,76	1,58
27	2,87	2,15	18,77	23,79	4,55	1,78
33	0,04	0,00	24,64	24,68	5,06	1,95
42	4,62	0,00	4,28	8,90	5,06	2,12
54	4,55	0,00	22,91	27,46	5,06	1,59
61	0,04	0,00	25,27	25,31	5,06	1,47
75	0,14	0,00	30,77	30,91	20,24	3,23
82	0,07	0,00	27,57	27,64	20,24	3,08
89	0,09	0,00	27,14	27,23	20,24	2,70
96	2,51	0,00	25,21	27,72	20,24	2,42
102	1,22	0,00	24,45	25,67	20,24	2,49
110	3,18	0,00	23,93	27,11	20,24	2,92

Tabelle E.8: Analysenwerte zur Nitrifikation und DOC-Abbau in Biofilmreaktor 6, Ablaufwerte. Organische C-Quelle: Abwasser 5  $\rho(\text{DOC}) = 8,14 \text{ mg/L}$  (bis Tag 73),  $\rho(\text{DOC}) = 32,56 \text{ mg/L}$  (Tag 73-110), DOC-Zulaufwerte nur teilweise gemessen, ansonsten theoretischer Wert verwendet.  $\text{N-NH}_4^+$  (Zulauf) =  $30 \text{ mg/L}$ .

Tag	$\text{N-NH}_4^+$ in mg/L	$\text{N-NO}_2^-$ in mg/L	$\text{N-NO}_3^-$ in mg/L	Summe N in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{zu}$ in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{ab}$ in mg/L
0		0,03	23,25		5,84	5,76
3	0,20	0,03	26,13	26,36	10,00	5,36
6	0,20	0,03	24,93	25,16	9,67	4,53
10	16,10	1,21	10,06	27,37	8,77	4,36
13	21,00	1,07	12,60	34,67	8,36	4,06
17	0,20	1,17	8,35	9,72	6,26	3,75
20	12,82	0,71	11,76	25,28	8,61	4,42
24	11,21	0,03	13,19	24,43	8,66	3,97
27	12,40	0,03	9,90	22,33	8,74	3,56
33	12,38	0,00	14,26	26,64	8,14	3,02
42	17,41	0,00	14,02	31,43	8,14	6,44
54	5,31	0,00	22,95	28,26	8,14	3,48
61	2,24	0,00	22,51	24,75	8,14	3,30
75	0,49	0,00	33,37	33,86	32,56	15,75
82	1,79	0,00	22,36	24,15	32,56	11,70
89	1,03	0,00	23,51	24,54	32,56	7,50
96	5,68	0,00	18,46	24,14	32,56	9,88
102	5,88	0,00	17,22	23,10	32,56	8,85
110	1,59	0,00	19,62	21,21	32,56	8,60

Tabelle E.9: Analysenwerte zur Nitrifikation in Biofilmreaktor 7, Ablaufwerte. Ohne organische C-Quelle, N-NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Zulauf) = 30 mg/L.

Tag	N-NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> in mg/L	N-NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> in mg/L	N-NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> in mg/L	Summe N in mg/L
0	0,00	0,03	28,11	28,14
3	0,20	0,03	28,37	28,61
6	0,20	0,03	26,14	26,37
10	0,20	0,03	27,32	27,55
13	0,20	0,03	29,61	29,84
17	0,20	0,03	20,79	21,02
20	0,20	0,03	26,02	26,25
24	0,20	0,03	26,00	26,23
27	0,02	0,03	25,83	26,06
33	0,00	0,00	24,95	24,95
42	0,01	0,00	20,59	20,60
54	0,00	0,00	25,88	25,88
61	0,01	0,00	35,54	35,55
75	0,12	0,00	25,06	25,18
82	0,01	0,00	26,68	26,69
89	0,78	0,00	27,92	28,70
96	0,02	0,00	28,26	28,28
102	4,62	0,00	24,75	29,37
110	0,01	0,00	27,80	27,81



Tabelle E.10: Analysenwerte zur Nitrifikation und DOC-Abbau in Biofilmreaktor 8, Ablaufwerte. Organische C-Quelle: Abwasser 5 ozont  $\rho(\text{DOC}) = 10,12 \text{ mg/L}$  (bis Tag 73),  $\rho(\text{DOC}) = 40,48 \text{ mg/L}$  (Tag 73-110), DOC-Zulaufwerte nur teilweise gemessen, ansonsten theoretischer Wert verwendet.  $\text{N-NH}_4^+$  (Zulauf) =  $30 \text{ mg/L}$ .

Tag	$\text{N-NH}_4^+$ in mg/L	$\text{N-NO}_2^-$ in mg/L	$\text{N-NO}_3^-$ in mg/L	Summe N in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{zu}$ in mg/L	$\rho(\text{DOC})_{ab}$ in mg/L
0		0,03	26,70		10,95	5,80
3	0,20	0,03	25,29	25,53	10,00	3,30
6	0,20	0,03	23,13	23,36	9,41	2,44
10	0,20	0,03	28,28	28,51	11,53	2,13
13	0,20	0,03	27,52	27,75	10,31	1,94
17	0,20	0,03	17,38	17,61	8,98	1,11
20	0,20	0,03	22,86	23,09	9,08	2,14
24	0,20	0,03	23,02	23,25	9,43	1,82
27	0,20	0,03	24,13	24,36	9,98	1,55
33	0,20	0,00	23,30	23,32	10,12	2,47
42	0,01	0,00	30,81	30,82	10,12	2,60
54	0,00	0,00	25,19	25,19	10,12	1,91
61	0,01	0,00	22,82	22,83	10,12	1,80
75	0,05	0,00	22,39	22,44	40,48	4,83
82	0,31	0,00	20,43	20,74	40,48	4,46
89	0,15	0,00	20,27	20,42	40,48	4,08
96	0,03	0,00	19,37	19,40	40,48	3,64
102	0,03	0,00	19,35	19,38	40,48	0,93
110	0,03	0,00	22,34	22,37	40,48	3,74



## Anhang F

### Angaben zur Fluoreszenz *in-situ* Hydridisierung

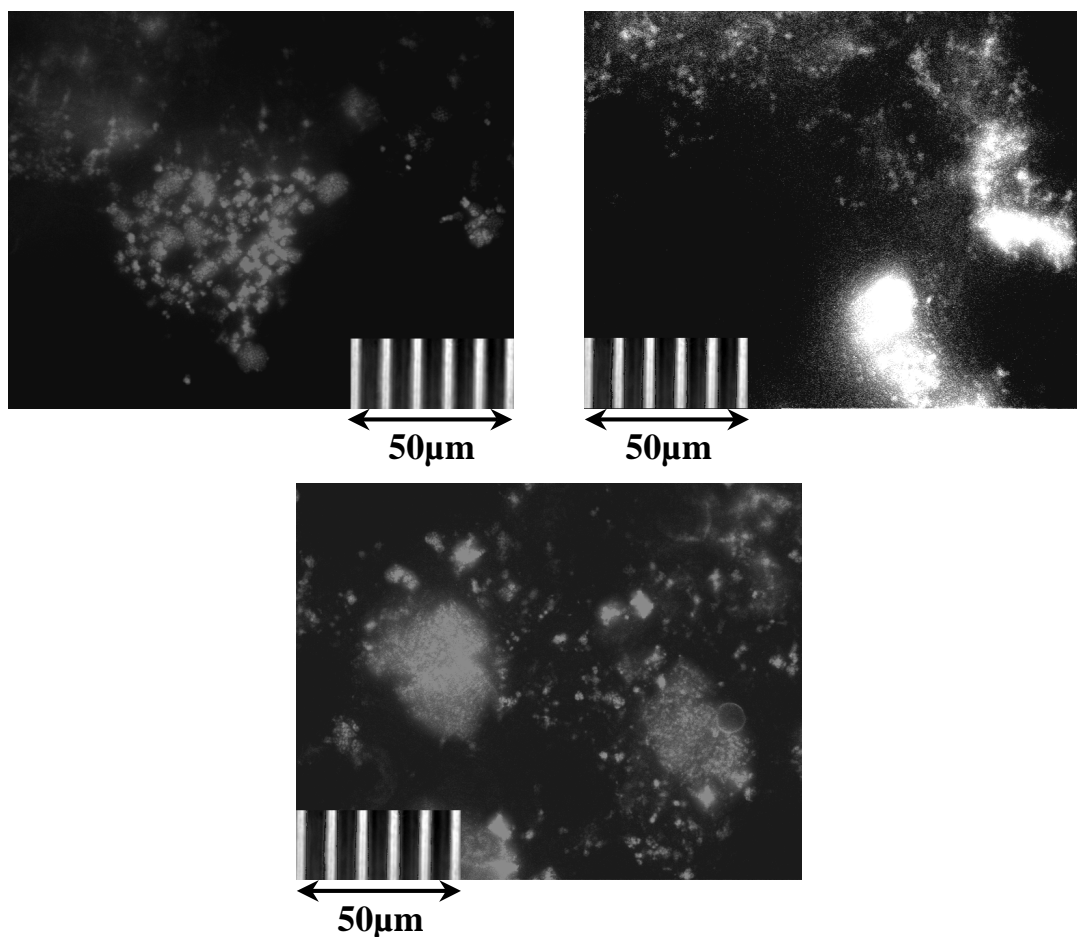


Abbildung F.1: Darstellung der Größenverhältnisse der FISH-Mikroskopaufnahmen bei der verwendeten 630-fachen Vergrößerung. Links oben: AOB-Aufnahme (Sonde Nso190, s. Abbildung 4.36, Mitte rechts), Zellhaufen im Größenbereich von ca. 2-10  $\mu\text{m}$ . Rechts oben: *Nitrospira*-Aufnahme (Sonde Ntspa712, s. Abbildung 4.35, links unten), Zellhaufen im Größenbereich von ca. 2-20  $\mu\text{m}$ , teilweise auch netzartige Strukturen. Unten: AOB-Aufnahme (Sonde Nso190, s. Abbildung 4.37, Mitte rechts), große Zellhaufen, die nicht mit der NEU-Sonde gebunden haben, im Größenbereich von bis zu 40  $\mu\text{m}$ .

# Lebenslauf



## Persönliche Daten

Philip Hörsch  
geb. am 22. September 1971  
deutsch  
ledig

## Beruflicher Werdegang

- |               |  |
|---------------|--|
| 25.06.1991    | Allgemeine Hochschulreife (Dillmann-Gymnasium in Stuttgart)  |
| 08/91 – 10/92 | Zivildienst, Gartenbauamt der Stadt Stuttgart, Arbeiter-Samariter-Bund Stuttgart   |
| 10/92 – 1/98  | Studium der Technischen Biologie an der Universität Stuttgart (Abschluss: Dipl.-Biol. t. o.)   |
| 10/95 – 2/96  | Praktikum bei der Bayer AG/Wuppertal in der Forschungsabteilung Pharma Research Antiinfektiva II   |
| seit 04/98    | Promotion am Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe (TH)   |
| 04/98 – 04/01 | Promotionsstipendium im DFG-Graduiertenkolleg „Grenzflächenphänomene in aquatischen Systemen und wässrigen Phasen“                       |
| seit 04/01    | Wissenschaftlicher Angestellter am Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe                                    |
| seit 11/01    | Hochschulassistent am Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe, Projektleiter für gentechnische Arbeiten (S 1) |



Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und  
der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut  
der Universität Karlsruhe (TH)

**Band 35:** Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment -  
ROSE, 1997, 248 S., 12,80 Euro.

**Band 36:** Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment -  
ROSE II, 2000, 265 S., 12,80 Euro.

**Band 37:** Thomas Brinkmann: Alkalischer und solarinduzierter Abbau von  
natürlicher organischer Materie, 2003, 212 S., 15,00 Euro.

**Band 38:** Andreas Gorenflo: Rückhalt und Fouling von natürlichen organischen  
Substanzen bei der Nano- und Ultrafiltration, 2003, 219 S., 18,00 Euro.

**Band 39:** Philip Hörsch: Einfluss der chemischen Oxidation auf das toxische  
Potenzial und das biologische Abbauverhalten von Industrieabwässern,  
2004, 210 S., 20,00 Euro.

Preise verstehen sich zzgl. der gesetzlichen Mehrwertsteuer und Versandkosten.

Bestellungen über:

Lehrstuhl für Wasserchemie und DVGW-Forschungsstelle  
am Engler-Bunte-Institut der Universität Karlsruhe (TH)

Engler-Bunte-Ring 1

D-76131 Karlsruhe

Tel.: +49-(0)721-608-2580

Fax: +49-(0)721-699154

E-mail: [fritz.frimmel@ciw.uni-karlsruhe.de](mailto:fritz.frimmel@ciw.uni-karlsruhe.de)