

**Hochschule für Angewandte Wissenschaften Hamburg**  
**Fakultät Life Sciences**  
**Department Biotechnologie**

# Verweilzeiten und diurnale Schwankungen von Benzoat in bepflanzten Festbettreaktoren

Bachelorarbeit im Studiengang Biotechnologie

vorgelegt von Fabio Kraft  
am 31.08.2012

***Erstgutachter:*** Dr. Oliver Ullrich  
Hochschule für angewandte Wissenschaften Hamburg

***Zweitgutachter:*** Dr. Hermann J. Heipieper  
Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung GmbH - UFZ

## Danksagung

Zuerst möchte ich mich bei Dr. Hermann-Josef Heipieper, Dr. Uwe Kappelmeyer, Dr. Jochen Müller und Dr. Jana Seifert bedanken, die mir die Möglichkeit gaben, meine Bachelorarbeit am UFZ zu schreiben und mir stets mit Rat und kritischen Diskussionen während der Bearbeitung geholfen haben.

Ein zweiter Dank geht an Dr. Oliver Ullrich und nochmals an Dr. Hermann-Josef Heipieper, die sich bereit erklärt haben, diese Bachelorarbeit zu betreuen und zu bewerten.

Des Weiteren möchte ich mich bei meinen Kollegen und Kolleginnen in der Abteilung der Umweltbiotechnologie und Metaproteomics bedanken, die mir mit ihrer Hilfsbereitschaft und Freundlichkeit ungemein geholfen haben.

Ein rechtherzliches Dankeschön an Anja Taubert, mit der ich zusammen an diesem Projekt gearbeitet habe und die mir bei Laborarbeiten behilflich war.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinen Eltern, die mich während des gesamten Studiums unterstützt und mir ermöglicht haben, wertvolle Erfahrungen während dieser Zeit zu sammeln.

Zu guter Letzt möchte ich ein warmes Dankeschön meiner Freundin gegenüber aussprechen, die mit mir nach Leipzig gezogen ist, wodurch das halbe Jahr umso schöner war.

## Inhaltsverzeichnis

Danksagung .....	2
1 Einleitung.....	4
1.1 Rhizosphäre .....	4
1.2 Mikroorganismen .....	5
1.3 Pflanzenkläranlagen (constructed wetlands).....	6
1.4 Zielsetzung.....	9
2 Material und Methoden .....	10
2.1 Geräte.....	10
2.2 Chemikalien .....	11
2.3 Pflanzenfestbettreaktoren (PFR).....	12
2.4 Methoden.....	14
Versuchsaufbau der Verweilzeit- und Durchmischungsversuche.....	14
Analyse der Durchmischungs- und Verweilzeitversuche .....	16
Messung der Benzoatkonzentrationen .....	17
ESI-MS Messung (UPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS).....	18
Messung der Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentration .....	21
3 Ergebnisse.....	22
3.1 Verweilzeiten und Durchmischungsversuche .....	22
3.2 Benzoatkonzentrationsschwankungen .....	24
3.3 Mikrobiologische Zusammensetzung.....	29
4 Diskussion .....	33
4.1 Durchmischungs- und Verweilzeitversuche .....	33
4.2 Benzoatkonzentrationsschwankungen .....	35
4.3 Ammonium- und Nitritwerte.....	37
4.4 Mikrobielle Diversität .....	38
5 Fazit .....	42
6 Zusammenfassung.....	43
7 Literaturverzeichnis .....	44
8 Anhang.....	47
Abbildungsverzeichnis.....	47
Tabellenverzeichnis .....	48
Abkürzungsverzeichnis.....	48

## 1 Einleitung

Pflanzenkläranlagen - im Englischen *constructed wetlands*- sind seit den 60er Jahren eine etablierte Methode, um kontaminierte Abwässer aufzureinigen und für die weitere Verwendung vorzubereiten. Für die Erstellung solcher Kläranlagen gibt es eine Vielzahl an Erfahrungen und Publikationen. Da es sich um eine verfahrenstechnische Anwendung handelt, werden die Pflanzenkläranlagen meistens nach eintretenden und austretenden Massen- und Volumenströmen bilanziert. Das ist jedoch eine Schwachstelle vieler Veröffentlichungen, die die Kläranlage als "Black Box" betrachten und lediglich Ein- und Ausflüsse bilanzieren, ohne dabei auf die mannigfachen Faktoren innerhalb der Rhizosphäre einzugehen (Kappelmeyer et al., 2001).

Der neuralgische Punkt für das bessere Verständnis von Pflanzenkläranlagen liegt jedoch in der meist nicht analysierten Zusammensetzung der mikrobiologischen Diversität im Wurzelgeflecht. Ohne eine bessere Auflösung der in der Rhizosphäre vorherrschenden Verteilungs- und Transportprozesse sowie der vorkommenden mikrobiellen Diversität ist es nicht möglich, die Abbaumechanismen in den Kläranlagen gezielter zu steuern. Abbauvorgänge finden in der Natur zwar nahezu ubiquitär statt, jedoch wird meistens nur eine Transformation anstatt einer kompletten Mineralisierung vollzogen, wodurch nicht das gesamte Potential von schadstoffabbauenden Mikroorganismen ausgeschöpft wird (Staak, 2008). Ein detaillierteres Wissen über diese Parameter würde die Sanierungsverfahren um ein vielfaches in ihrer Effektivität steigern. Vor allem vor dem Hintergrund immer stärkerer Umweltauflagen ist eine effizientere und somit kostengünstigere Verfahrensweise zu begrüßen. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sich neue Publikationen mit dieser Thematik beschäftigen (Braeckevelt et al., 2011).

### 1.1 Rhizosphäre

Wie vorher erwähnt, liegt der Schlüssel für das bessere Verständnis in der Zusammensetzung der beteiligten Mikroorganismen in der Rhizosphäre und den hierin ablaufenden Prozessen. Der Begriff Rhizosphäre beschreibt dabei die unmittelbare Umgebung im Boden, die durch die Wurzel beeinflusst wird. Die Wurzel ist für die Pflanze der wichtigste Aufnahmeweg von Mikro- und Makroelementen, die sie nur durch in Wasser gelöste Elemente aufnehmen kann. Zu den Mikroelementen gehören Nährsalze wie Fe, Cl, B, Mn, Zn, Ca, Mo, Ni und zu den Makroelementen gehören N, S, P, K, Mg (Schopfer et al., 2006).

Die genaue räumliche Abgrenzung der Rhizosphäre ist schwierig, da die Übergänge zu anderen Schichten fließend sind. Vielschichtige chemische Wechselwirkungen zwischen der Wurzel und den organischen und anorganischen Bestandteilen im Boden sind der Grund dafür (Schopfer et al., 2006).

Man kann sie jedoch gemäß Giri et al. (2005) in Endorhizosphäre (Wurzelinnere) und Ektorhizosphäre unterteilen. Den Schnittpunkt zwischen diesen beiden Sphären bezeichnet man als Rhizoplane und er liegt direkt auf der Oberfläche der Wurzel. Die Rhizoplane ist der Ort, wo eine Vielzahl der Interaktionen zwischen Mikroorganismen und Wurzel stattfinden. Die größte Anzahl an Mikroorganismen kann in der unmittelbaren Nähe der Rhizoplane gefunden werden. Das heißt, dass in der Endorhizosphäre und Ektorhizosphäre Mikroorganismen anzutreffen sind, wobei in ersterer eine leicht höhere Konzentration vorliegt (Bazin et al., 1990).

Wie bereits erwähnt, kann die Wurzel nur gelöste Nährelemente aufnehmen, weswegen absorptiv gebundene Ionen vorher durch Austauschabsorption freigesetzt werden müssen. Um dies zu bewerkstelligen, hat die Pflanze verschiedene Möglichkeiten entwickelt. Eine davon sind die Exsudate. Unter dem Begriff Exsudate versammelt sich eine Gruppe von Molekülen und Ionen, die aus der Wurzel ausgeschieden werden und eine erleichterte Aufnahme von Nährstoffen ermöglichen. Durch die Absonderung dieser Moleküle hat die Pflanze die Möglichkeit, metabolische Vorgänge in ihrem Sinne zu verändern. Ein wichtiger Bestandteil dieser Exsudate sind  $H^+$  und  $HCO_3^-$ . Durch die Ausscheidung dieser Ionen wird die Löslichkeit von Phosphaten und Carbonaten erhöht, wodurch eine erleichterte Aufnahme möglich ist (Schopfer et al, 2006).

Die Pflanze exkretiert jedoch auch andere Moleküle, sogenannte Wurzelexudate, wie zum Beispiel organische Säuren, Aminosäuren, Zucker, Enzyme und Vitamine. Durch diese Ausscheidungen moduliert die Pflanze die Rhizosphäre, wodurch die Aktivität und Diversität der Bakterien und Pilze im Wurzelgeflecht stark beeinflusst werden (Schopfer et al., 2006). Diese Beeinflussung hat wiederum zur Folge, dass sich die Zusammensetzung der Rhizosphäre verändert, da nun andere Bedingungen herrschen. So können sich dann Mikroorganismen vermehren, für die diese Bedingungen günstiger sind (Nikolausz et al., 2008).

Es gibt bereits Hinweise, dass die Sauerstoffkonzentration eine Funktion der Tageszeit ist. In Veröffentlichungen wird dargelegt, dass die Sauerstoffeintragung in der Nacht geringer ist als am Tage (Nikolausz et al., 2008). Dadurch weist auch die Rhizosphäre sowohl aerobe als auch anaerobe Gebiete auf (Kuschik et al., 2008).

Die Bakterien und Pilze sind dabei im hohen Maße für die Umsetzung der Bodenmineralien und den Abbau des organischen Materials verantwortlich (Sitte et al., 1991).

## 1.2 Mikroorganismen

In Pflanzenkläranlagen sind die Hauptakteure für die Mineralisierung und Transformation nicht die Pflanzen, sondern die im Boden vorkommenden Mikroorganismen. Die Pflanzen spielen eine untergeordnete Rolle. Der Abbau der Schadstoffe wird dabei durch die vorhandene Menge Sauerstoff gelenkt. Mit fluktuierendem Sauerstoffgehalt benutzen die Mikroorganismen unterschiedliche Stoff-

wechselwege. So werden aerob ablaufende Prozesse vorzugsweise in der nahen Peripherie der Rhizosphäre und an der Grenzfläche zwischen Wasser und Atmosphäre stattfinden (Kuschik et al., 2008). Die anaeroben Zonen findet man in weiterer Entfernung von der Wurzel und Oberfläche. Dort laufen Prozesse wie Denitrifikation, Sulfatreduzierung und Methanogenese ab (Stottmeister et al., 2000).

Abgesehen von der Nitrifikation / Denitrifikation, bei denen man die agierenden Mikroorganismen (*Nitrobacter* und *Nitrosomonas / Paracoccus*) sowie den genauen Abbaumechanismus kennt und der bereits oftmals untersucht wurde (Bachand et al., 1998; Reilly et al., 1998), gibt es immer noch große Unklarheiten darüber, welche mikrobiologische Zusammensetzung innerhalb der Böden, bzw. in der Rhizosphäre vorherrschen. Oftmals ist die Menge der Mikroorganismen in direkter Nähe der Wurzel um ein Vielfaches höher als in weiter entfernten Gebieten (Lalke-Porczyk et al., 2005).

Aufgrund der oben genannten Prozesse und den vorherrschenden Bedingungen im Boden, ist es nicht überraschend, dass schwefelreduzierende und schwefeloxidierende, methanogene, methanotrophe, denitrifizierende und nitrifizierende Mikroorganismen anzutreffen sind (Nikolausz et al., 2008). Interessanter ist jedoch, welche Klassen, Ordnungen und Familien man vorfindet. In der letzten Zeit vermehrten sich Veröffentlichungen, die die Zusammensetzung der mikrobiellen Gemeinschaft in komplexen Umweltsystemen untersuchten (Schneider et al., 2010).

### 1.3 Pflanzenkläranlagen (constructed wetlands)

Im Folgenden möchte ich kurz auf den Aufbau und die Struktur von Pflanzenkläranlagen und Feuchtgebieten, bzw. im Englischen *constructed wetlands* eingehen. Für die genaue Funktionsweise der PFR verweise ich auf den Teil Material und Methoden.

Pflanzenkläranlagen werden genutzt, um Abwässer von Städten, der Industrie, Bergbau, Ackerbau, Regenfälle oder anderen Quellen zu prozessieren und für die weitere Behandlung vorzubereiten (Stottmeister et al., 2000). Nach dem Durchlaufen der Kläranlage wird das Wasser wieder natürlichen Wasserführungen (Flüssen, Seen, etc.) zugeführt.

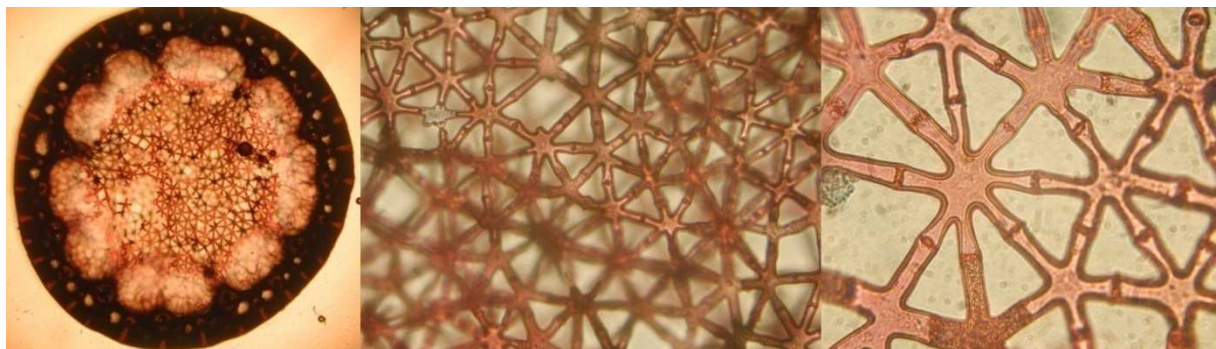
Wie bereits erwähnt, werden mit der Anlage des bepflanzten Festbettreaktors (PFR) Pflanzenkläranlagen nachgeahmt, um Prozessparameter wie Abbaukinetiken, mikrobiologische Diversität sowie deren Schadstofftoleranz zu verstehen und um auf der Grundlage dieser Daten eine Optimierung der Behandlungseffizienz zu erreichen. Generell ist zu sagen, dass Pflanzenkläranlagen komplexe Systeme sind, in denen eine Vielzahl an Interaktionen zwischen Pflanzen, Mikroorganismen, Tieren sowie der Umgebung stattfinden.

Der wohl wichtigste Einflussfaktor beim Entwurf einer Pflanzenkläranlage ist die Strömung (Kadlec, 1995). Durch die Strömung werden alle Einflussfaktoren miteinander verbunden, sodass eine Veränderung hier auch unmittelbar andere Faktoren beeinflusst. An sich unterscheiden sich die strömungs-

technischen Eigenschaften nicht grundsätzlich von anderen Oberflächengewässern. Bedingt jedoch durch die große Fläche von Pflanzenkläranlagen und die geringe Wassertiefe wird eine Anlage stark durch Transeaporation der Pflanzen (evaporisiertes Wasser über die Pflanze und Wurzel), bzw. Regenfälle in ihrem Wassergehalt beeinflusst, wodurch es zur Aufkonzentrierung, bzw. Verdünnung von Schadstoffen kommen kann. Die Verteilung der Schadstoffe, bzw. von Molekülen wird durch die Ausbreitung eines Wurzelgeflechts beeinflusst, da das Geflecht Auswirkungen auf die strömungstechnischen Eigenschaften der Kläranlage ausübt (Kadlec, 1995).

Der Sauerstoff gelangt über 2 Wege in den Boden. Zum einen wird Sauerstoff über das Aerenchym in den Boden transportiert. Beim zweiten Weg gelangt Sauerstoff durch Turbulenzen, die an der Grenzfläche zwischen Wasser und Atmosphäre herrschen, ins Wasser. Durch Konvektion wird dieser Sauerstoff verteilt. Die Pflanze transportiert den Sauerstoff in die tieferen Zonen des Bodens, da nur die obere Schicht des Bodens über die Luft gesättigt werden kann.

Bei Pflanzenkläranlagen nutzt man meistens Schilfrohre, Binsen, Seggen oder ähnliche Pflanzenarten, die über ein Aerenchym verfügen. Unter Aerenchym versteht man ein Leitgewebe für Gase, was den Lufttransport in den Boden ermöglicht (Schopfer et al., 2006) (vgl. Abb. 1).



**Abbildung 1** Querschnitt eines Rohres von *Juncus effusus*. Man kann deutlich die Hohlräume erkennen, die das Aerenchym ausmachen. Quelle: private Korrespondenz

Die Pflanzen können dabei in unterschiedliche Sedimente eingesetzt werden. So sind typische Sedimentarten Sand, Kies, Stein oder Kompost. Je nach Sedimentart ergeben sich wieder unterschiedliche Eigenschaften für die Pflanzenkläranlage. Die Sedimente geben den Pflanzen und anderen Mikroorganismen den nötigen Halt und beeinflussen den Wasserfluss aufgrund unterschiedlicher Porengrößen.

Der überwiegende Teil des Pflanzensediments ist anaerob, da die Mikroorganismen mehr Sauerstoff verbrauchen, als durch Diffusion über die Pflanzen wieder hineingetragen werden kann. Diese Eigenschaft ist von großer Relevanz, da in diesem Milieu nun reduktive Bedingungen herrschen. Dadurch

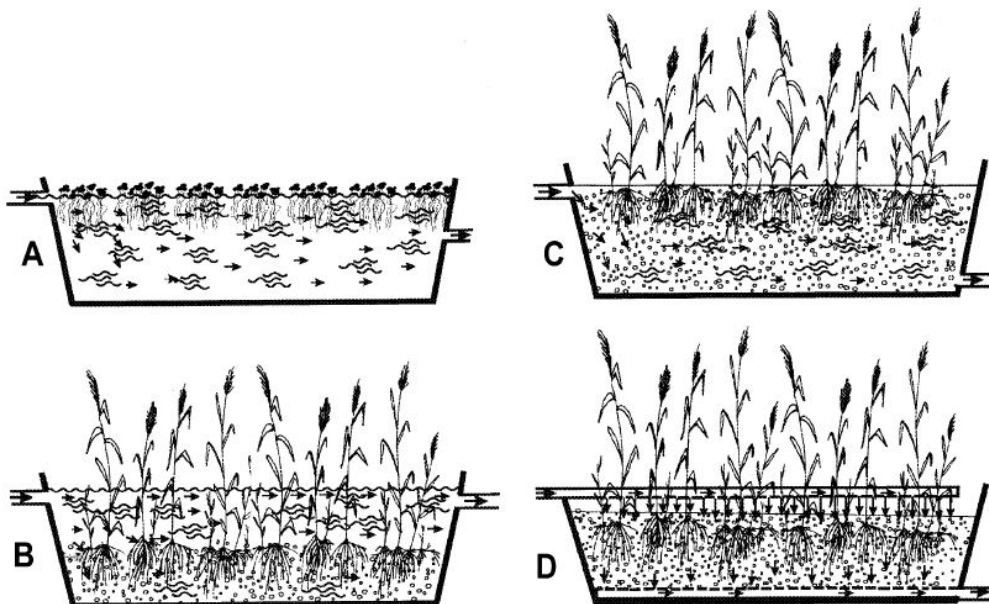
können Stickstoff und andere Verbindungen reduziert und somit abgebaut, bzw. mineralisiert werden (Kadlec, 1995).

Man kann folgende drei Systeme unterscheiden, deren Betriebsweisen durch Kombinatorik mit unterschiedlichen Durchflussarten vergrößert werden kann (vgl. Abb.2)(Wissing, 1995) .

- Wasserkultursysteme: Kommen ohne einen Boden aus und bestehen hauptsächlich aus frei schwimmenden Pflanzen. Meistens sind es Teiche oder Gruben.
- Hydrobotanische Systeme: Pflanzen sind nur ein wenig von Boden umgeben. Die Pflanzen können dabei aufschwimmen oder auf dem Boden der Kläranlage sein. Oft verwendete Pflanzenarten sind Helophyten und aquatische Pflanzen
- Bodensystem: Pflanzen sind komplett von Boden umgeben und sind fest verankert

Dazu kommt, dass man die Durchflussweise des Abwasser noch variieren kann:

- Horizontale Oberflächenströmung: Abwasserströmung befindet sich über der Bodenschicht
- Horizontale Oberflächenströmung: Abwasserströmung befindet sich unter der Bodenschicht
- Vertikale Strömung: Abwasser fließt von oben nach unten durch den mit Pflanzen versetzten Boden der Kläranlage



**Abbildung 2** Schematische Darstellung der unterschiedlichen Betriebsweisen einer Pflanzenkläranlage. A) Teich mit Wasserkultursystem und horizontalem Wasserfluss. B) Hydrobotanisches System mit horizontaler Oberflächenströmung, bei der die Strömung überhalb des Bodens ist. C) Hydrobotanisches System mit horizontaler Flussrichtung, bei der das Wasser unterhalb des Bodens fließt. D) Bodensystem mit vertikaler Flussrichtung Quelle: (Stottmeister et al., 2000)



## 1.4 Zielsetzung

Diese Arbeit ist ein Teil eines Projekts, das sich mit dem Einbau von  $^{13}\text{C}$ - Benzoat in die mikrobiologische Population innerhalb der PFR beschäftigt, um dort mittels molekularbiologischer und proteomischer Methoden Aufschluss über die biologischen Aktivitäten und deren Fluktuationen zu erhalten. Da dieses Projekt erst vor kurzem ins Leben gerufen wurde, sind diverse Vorversuche nötig. In dieser Bachelorarbeit sollen einige dieser Vorversuche abgedeckt werden, um Grundlagen für weitere Untersuchungen zu legen.

Dabei gliedert sich die Arbeit in drei Teilbereiche. Zuerst soll durch ein besseres Verständnis der strömungstechnischen Eigenschaften der PFR geklärt werden, wie diese Reaktoren am besten zu betreiben sind, damit in zukünftigen Einbauversuchen die besten Ergebnisse erzielt werden können. Darüber hinaus soll untersucht werden, ob es zu Schwankungen der Benzoatkonzentrationen innerhalb des Wurzelgeflechts kommt und ob diese Schwankungen durch Tag/Nacht-Zyklen beeinflusst werden können. Im dritten und letzten Teil hat sich diese Arbeit zur Aufgabe genommen, erste Grundsteine im Verständnis der mikrobiellen Gemeinschaft zu legen und aus diesen Daten bereits erste Rückschlüsse auf das Ökosystem innerhalb der PFR zu ziehen.

## 2 Material und Methoden

Im folgenden werden die Materialien und Methoden, die für die Erstellung der Bachelorarbeit genutzt wurden, vorgestellt. Es werden sowohl theoretische Grundlagen als auch die genutzten Protokolle und Arbeitsweisen erklärt.

### 2.1 Geräte

Die im Zuge der Bachelorarbeit benutzten Geräte sind in Tabelle 1 aufgelistet. Im Methodenteil wird genau darauf verwiesen welche Geräte wofür genutzt wurden.

Tabelle 1 Darstellung der genutzten Geräte während des Schreibens der Bachelorarbeit

Bezeichnung	Hersteller	Typ	Seriennummer
<b>Pumpe</b>	Ismatec	Regelo CPF	235264
	Ismatec	MCP Standard V7.02	ISM404-0387
	Ismatec	MCP Standard V8.00	10704-00085
<b>Software</b>	Unicam GmbH	Version 3.40	Y2K00040G
	Thermo	Proteome Discoverer v1.0 build 43	
<b>Zentrifuge</b>	Sigma	3K30	
	UniEquip	Univapo 100H	
	Eppendorf	Centrifuge 518	
<b>Waage</b>	Sartorius	BP 211 D	
	Sartorius		
	Soehnle	S10 2721	
<b>Inkubator</b>	Heraeus Instruments		
<b>Ultraschalldisintegrator</b>	Hielscher	UP50H	
<b>Schüttler</b>	MLW	THYS 2	
<b>Lampen</b>	Philips	Son-PIA	
<b>GC</b>	Agilent Technologies	7890A GC Systems	CN10944088
<b>MS</b>	Agilent Technologies	5975C inter XL MSD	
<b>GC Säule</b>	Zebron	ZB-1	194958
<b>Thermomixer</b>	Eppendorf	Thermomixer Comfort	
<b>Kippschüttler</b>	Stuart	See-Saw Rocker	
<b>Spektrometer</b>	Lange	Cadas 60s	
	ATI Unicam	UV/Vis Spectrum UV4	
	ATI Unicam	UV/VIS Spectrum UV2	
<b>Elektrophorese</b>	Amersham Biosciences	Multiple Gel Caster	
<b>ESI-MS</b>	Thermo Fischer Scientific	UPLC-LTQ Orbitrap MS/MS	

## 2.2 Chemikalien

In diesem Abschnitt werden die Chemikalien vorgestellt, die während der Bachelorarbeit genutzt wurden.

**Tabelle 2 Übersicht der genutzten Chemikalien für die Vorratsgefäße der Reaktoren. Als Grundlage dient das DIN-Abwasser 38412-T24.**

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Na-Benzoesäure	Fluka	20853348
Na-Acetat	Roth	6773.1
MgCl <sub>2</sub> * H <sub>2</sub> O	Merck	1.05833.1000
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	Merck	1.02382.1000
NH <sub>4</sub> Cl	Merck	1.01145.1000
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Roth	P018.12
NaCl	Roth	3957.1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	J.T. Baker	0313

Die in Tabelle 2 aufgeführten Lösungen werden den unterschiedlichen Reaktoren zugeführt. Für die genaue Zuteilung der Einflüsse verweise ich auf Tabelle 4.

Die Grundlage dieser Lösungen ist eine Abwandlung des DIN- Abwassers 38412 T24.

**Tabelle 3 Übersicht der genutzten Chemikalien für den Aufschluss der Reaktorproben und deren anschließenden Messung auf der ESI-MS**

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Glycerine	Merck	1.04092.1000
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Merck	1.08382.1000
Chloramphenicol	Merck	1.02366.0050
Trifluoressigsäure	Applied Biosystems	400028
2-Iodacetamid	Merck	8.04744.0025
DTT	Amersham Biosciences	4.58053.0002
Ammoniumbicarbonat	Sigma Aldrich	A6141-500G
Trypsin	Promega	V5280
Benzonase	Novagen	70664-3
MgCl <sub>2</sub> * 6H <sub>2</sub> O	Merck	1.05833.1000
PMSF	Sigma Aldrich	P7626-5G
Acetonitril	Sigma Aldrich	34851
Ameisensäure	Merck	8.22254.1000
Essigsäure	Merck	1.00063.2511
Salzsäure	Merck	1.00319.1000
Natronlauge	Merck	1.06469.1000
Methanol	Merck	1.06009.2511
SDS	Serva Electrophoresis	20765
Ammoniumpersulfat	Pharmacia Biotech	17.1311-01
Bradford Reagenz	Biorad	500-0114
Tetramethylethyldiamin	Merck	1.10732.0100

## 2.3 Pflanzenfestbettreaktoren (PFR)

Die für die Untersuchung genutzten PFR sind miniaturisierte Pflanzenkläranlagen. Sie wurden in den Laboren des Departments Umweltbiotechnologie entwickelt und fungieren als "universelle Testeinheit für bewachsene Bodenfilter" (Kappelmeyer et al., 2001).

Bei diesen Reaktoren handelt es sich also um Bodenfilter, die mit einem vertikalen Wasserdurchfluss betrieben werden (vgl. Wissing, 1995). Der Boden besteht dabei aus Kies mit einer Korngrößenverteilung von 4 mm bis 6 mm. Die dadurch bedingte Porosität beläuft sich auf  $\epsilon = 0,3$ . Die Reaktoren sind mit der Flatterbinse, *Juncus effusus*, bepflanzt. Bei dieser Art handelt es sich um eine Binse mit einem sehr ausgeprägtem Aerenchym (vgl. Abb. 1). Das Aerenchym fungiert als Kanalsystem und ermöglicht der Pflanze die Einbringung von Sauerstoff in den Boden. Die Pflanzen werden durch Öffnungen im Deckel des Reaktors eingebracht.

Die PFR müssen gewissen Anforderungen gerecht werden. So muss die hydraulische Retentionszeit unabhängig vom inneren Kreislaufstrom sein. Des Weiteren sollten sie nahezu keine Makrogradienten aufweisen, sowie gutes Fließverhalten innerhalb des Kiesbettes ermöglichen.

In dieser Arbeit wurden drei der insgesamt fünf vorhandenen PFR untersucht. Die Reaktoren werden mit einer Lösung beladen, die eine Abwandlung des DIN-Abwassers 38412 T24 ist. Zwei der drei Reaktoren sind bepflanzt. Es wird nicht allen Reaktoren dasselbe Medium hinzu geführt. Reaktor 1 und Reaktor 2 (unbepflanzt) haben die Lösung 1 und Lösung 2 in ihren Vorratsgefäßen. Reaktor 3 hingegen wird Lösung 1 und 3 hinzu geführt. Für eine bessere Übersicht der zugeführten Chemikalien verweise ich auf Tabelle 4.

**Tabelle 4 Darstellung der unterschiedlichen Chemikalienkonzentrationen, mit denen die Reaktoren betrieben wurden. Die dunkelgrau unterlegten Felder mit der fett markierten Schrift verdeutlichen die Unterschiede der zugegebenen Konzentrationen.**

Chemikalie	Reaktor 1	Reaktor 2 (unbepflanzt)	Reaktor 3
<b>Na-Benzoat</b>	0,74 mM	0,74mM	0,74 mM
<b>Na-Acetat</b>	2,5 mM	2,5 mM	2,5 mM
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	28,0 mg/L	28 mg/L	28 mg/L
<b>NaCl</b>	7,0 mg/L	7,0 mg/L	7,0 mg/L
<b>NH<sub>4</sub>Cl</b>	<b>58,9 mg/L</b>	<b>58,9 mg/L</b>	<b>29,4 mg/l</b>
<b>MgCl<sub>2</sub> * 6 H<sub>2</sub>O</b>	1,65 mg/L	1,65 mg/L	1,65 mg/L
<b>CaCl<sub>2</sub> * 2 H<sub>2</sub>O</b>	4,0 mg/L	4,0 mg/L	4,0 mg/L
<b>Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub></b>	<b>8,5 mg/L</b>	<b>8,5 mg/L</b>	<b>22,2 mg/L</b>

Alle drei Reaktoren werden mit denselben Konzentrationen von Benzoat, Acetat, Kaliumdihydrogenphosphat und Natriumchlorid beladen, da diese die Bestandteile der Lösung 1 sind. Die Grundbestandteile von Lösung 2 und 3 sind ebenfalls gleich, nur unterscheiden sich die Konzentrationen von Ammoniumchlorid und Natriumsulfat. Reaktoren 1 und 2 wird eine Konzentration von 58,9 mg/L Ammoniumchlorid zugeführt, aber haben nur 8,5 mg/L Natriumsulfat in ihren Vorlagegefäßen; Reaktor 3 hingegen 29,4 mg/L Ammoniumchlorid, was der Hälfte der Konzentration von Reaktor 1 und 2 entspricht. Dafür wird 22,2 mg/L Natriumsulfat zugegeben. Die Reaktoren 1 und 2 sind also Systeme, die mit einer stärkeren Stickstoffbeladung betrieben werden, wohingegen der Reaktor 3 mit einer stärkeren Schwefelbeladung gefahren wird. Durch diese Betriebsweise kann kontrolliert werden, inwiefern unterschiedliche Umgebungsbedingungen die mikrobiologische Umsetzung beeinflussen.

Die Reaktoren stehen in einem komplett klimatisierten Raum, dem sogenannten Phytotechnikum, der tagsüber eine Temperatur von 22°C aufweist und nachts eine Temperatur von 16°C. Als Tag wird die Zeit von 6:00 Uhr bis 21:00 definiert. Durch Beschattung ist es möglich, die Lichteinstrahlung zu drosseln, bzw. bei Mangel an Licht können Lampen hinzu geschaltet werden, die als Sonnenlichtimitation dienen. Diese Lampen werden hinzu geschaltet, sobald die natürliche Lichtquelle auf unter 10 klx fällt, die Beschattung wird ab einer Lichtintensität von 55 klx eingeschaltet. Bei den Anlagen gibt es eine dauerhafte Analyse des pH-Werts, Redoxpotentials und der Sauerstoffsättigung. Darüber hinaus wird über jedes Wochenende hinweg eine Massenbilanz betrieben, mit dem Ziel herauszufinden, wie viel Wasser die Pflanzen evaporieren. Das Maß an Evaporation ist ein Indikator für die Fitness der Pflanzen.

Die PFR werden mit folgenden Standardbetriebsbedingungen gefahren.

$$\text{Einflussstrom: } \dot{V}_{zu} = 1,4 \frac{mL}{min}$$

$$\text{Zirkulationsfluss: } \dot{V}_{circ} \cong 10 \dot{V}_{in}$$

$$\text{Porösvolumen: } V_p = 10 \text{ l}$$

$$\text{mittl. hydraulische Verweilzeit: } \tau = 5 \text{ Tage}$$

$$\text{Massenbilanz } \dot{V}_{in} = \dot{V}_{out} + \dot{V}_{eva}, \quad (2.3.1)$$

$$\text{Kreislaufverhältnis } \frac{\dot{V}_{circ}}{\dot{V}_{zu}} \quad (2.3.2)$$

wobei  $\dot{V}_{eva}$  = evaporierte Menge Wasser

Der Reaktor besteht aus einem zylindrischen Gefäß mit einem Durchmesser und einer Höhe von 30 cm, in dem ein Metallkorb eingebracht ist, der Ausmaße von 26 cm Durchmesser und 28 cm Höhe hat. In diesem Metallkorb befinden sich 21 kg Kies. In der Mitte des Reaktors steht ein Absaugzylinder, der einen Durchmesser von 4 cm und eine Höhe von 28 cm hat. Durch diesen Zylinder saugt die Kreislaufpumpe das Medium ab.

Um eine homogene Strömung innerhalb des Kiesbettes zu erreichen, liegt oberhalb der Wasseroberfläche und des Metallkorbes ein Verteilungsring, der das von dem Absaugzylinder kommende Kreislaufwasser wieder gleichmäßig in den Reaktor verteilt. Der Kreislaufstrom ist von Relevanz, da er eine Durchmischung des Inhalts bedingt, wodurch eine homogene Verteilung erreicht werden soll.

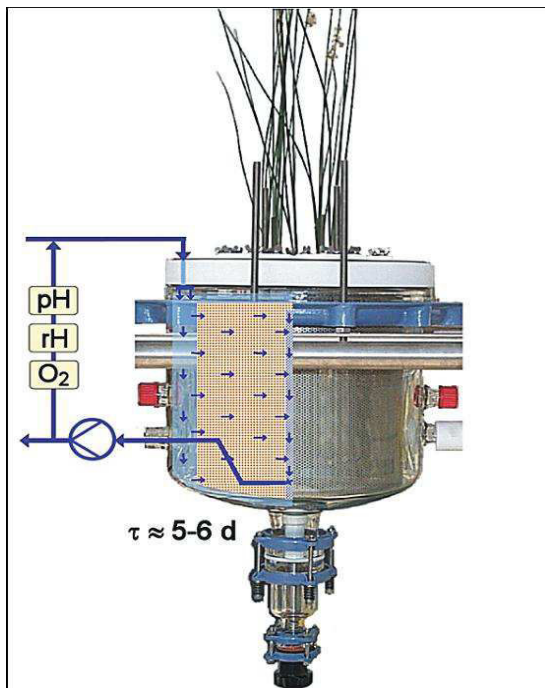


Abbildung 3 Schematische Darstellung des PFR. Es handelt sich hierbei um einen Viertelschnitt des Reaktors. Am Reaktor werden konstant pH, Redox-Potential (rH) und  $O_2$ -Konzentrationen gemessen. Die Reaktoren haben eine hydraulische Verweilzeit von 5 bis 6 Tagen und sind mit den Pflanzen der Art *Juncus effusus* bepflanzt.

Für die Veranschaulichung des Reaktors verweise ich auf die Abbildung 3, um einen Viertelschnitt der Reaktoren zu sehen.

Die Bandbreite der Analysen, für die diese Anlagen geeignet sind, reichen von Schadstoffabbauexperimenten, über die Verfolgung des Stickstoff- und Schwefelabbaus bis hin zu Phytovolatilisation. Darüber hinaus kann man untersuchen, ob man bei der Anlage Veränderungen beobachtet, die durch den Tag/Nachtwechsel induziert werden. Der scale-down ermöglicht eine leichtere Analyse der Experimente, da alle nötigen Messgeräte in der unmittelbaren Nähe sind. Dazu kommt, dass so eine kontrollierte Umgebung herrscht durch die Störeinflüsse minimiert werden.

## 2.4 Methoden

### Versuchsaufbau der Verweilzeit- und Durchmischungsversuche

Eine etablierte Methode, um die Durchmischungs- und Verweilzeiten von Reaktoren zu analysieren, ist es, der Flüssigkeit einen Farbstoff hinzuzufügen und diese Färbung mittels eines Photometers zu dokumentieren. In diesem Fall wurde die Chemikalie Uranine® genutzt, die auch für die Analyse von Grundwasserströmungen genutzt wird. Sie weist eine grelle gelbe Farbe auf und hat ihr Absorptionsmaxima bei  $\lambda=490\text{nm}$ .

Der Ablauf der Analyse ist dabei wie folgt:

Zuerst wurde eine Kalibrierkurve erstellt, um zu sehen, bis zu welcher Konzentration es möglich ist, Uranine mit einem Photometer (*ATI UNlcam*) nachzuweisen. Auf dieser Grundlage wurde eine Menge an Uranine berechnet, die nötig ist, um im Reaktor eine ausreichende Färbung zu bewirken. Gemäß den Daten der Kalibrierkurve wurden 60 mg eingewogen und in 250 mL dest. Wasser gelöst. Das entsprach einer Zielkonzentration im Reaktor von 6 mg/L.

Danach wurde die Apparatur für die Messung der Extinktion vorbereitet. Dafür nutzte man eine Durchlaufküvette, die man in den Kreislaufstrom integrierte. Für den korrekten Durchlauf durch die Küvette wurde der Ausfluss des Reaktors an das untere Ende der Durchlaufküvette montiert, sodass sie von unten nach oben durchflossen wurde. So wurde sichergestellt, dass möglichst wenig Luft im System blieb. Danach wurde mittels einer Spritze der Tracer in den Reaktor injiziert (durch die Bepflanzungslöcher). Um eine Verdünnung zu vermeiden und eine gute Durchmischung zu erlangen, wurde die Zulaufpumpe abgeschaltet und die Kreislaufpumpe um ein Vielfaches erhöht.

Es wurden zwei Versuche mit 200 rpm (= 297 mL/min) und ein Versuch mit 128 rpm (= 190 mL/min) durchgeführt. Für das Beobachten der Extinktionsänderung wurde ein Zeitintervall von 5 Minuten genommen. Der Versuch verlief über mehrere Stunden, um ausreichend Zeit zu haben etwaige Schwankungen in der Extinktion zu dokumentieren.

Der zweite Teil des Versuchs schloss sich unmittelbar an die Messung der Durchmischungszeit an. Der apparative Aufbau wurde für die Verweilzeitmessung nicht verändert. Es wurde nur der Zulauf sowie der Ablauf des Reaktors zugeschaltet, sodass eine allmähliche Verdünnung entstand. Der Zulauf betrug 1,2 mL/min. Darüber hinaus wurde die Kreislaufpumpe wieder auf die ursprüngliche Pumprate zurückgestellt. Das Zeitintervall für die Messung wurde von 5 Minuten auf 30 Minuten hochgestellt und der gesamte Versuch lief acht Tage. Zusätzlich wurde an jedem Morgen und an jedem Abend eine Massenbilanz des Zuflusses und Abflusses durchgeführt, um zu sehen, wie viel Flüssigkeit über die Pflanzen evaporiert wurden.

Die Extinktion wurde mit einem Photometer (*ATI UNlcam*) ermittelt. Hervorzuheben ist hier, dass die Dicke der Küvette nur 0,7 cm beträgt und nicht wie gewohnt 1 cm. Die allgemeine Formel für die Extinktionsmessung lautet:

$$E_{\lambda} = \lg\left(\frac{I_0}{I_1}\right) = \varepsilon_{\lambda} \cdot c \cdot d \quad (2.4.1)$$

wobei,  $E_{\lambda}$  = Extinktion einer bestimmten Wellenlänge

$I_0, I_1$  = Intensität des einfallenden, bzw. transmittiertem Licht in  $\text{W m}^{-2}$

$\varepsilon_{\lambda}$  = dekadischer Extinktionskoeffizient in  $\text{m}^2 \text{mol}^{-1}$

$c$  = Stoffmengenkonzentration der absorbierenden Konzentration  $\text{mol l}^{-1}$

$d$  = Dicke der Küvette in m

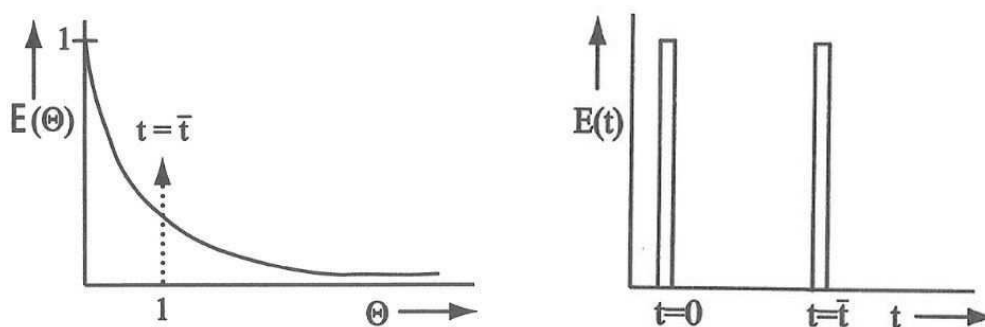
## Analyse der Durchmischungs- und Verweilzeitversuche

Die Analyse der Verweilzeiten und Durchmischungsversuche geschah dabei mit Mitteln der chemischen Verfahrenstechnik. Im folgenden sollen kurz die wichtigsten Formeln und Eigenschaften aufgezeigt werden, wobei jedoch auf die Herleitung verzichtet wird.

Die Zugabe des Tracers wurde als idealisierter Dirac-Impuls angenommen. Denn die Substanz wurde in sehr kurzer Zeit - verglichen mit der mittleren Verweilzeit - zugegeben.

Die PFR sind dynamische Systeme, deren Zustand zwischen zwei idealisierten Reaktorarten liegt: Rohrreaktor und Rührkesselreaktor. Bei einem idealen Rohrreaktor geht man davon aus, dass es zu keiner Vermischung entlang des Strömungsrohres kommt, sondern distinkte Parzellen mit stets gleicher Konzentration vorherrschen. Vice versa ist in einem idealen Rührkesselreaktor eine komplette Vermischung vorhanden und in jedem Volumenteil liegt dieselbe Konzentration vor.

Von Relevanz ist die Antwortfunktion, welche abhängig vom Reaktortyp unterschiedlich verläuft (vgl. Abb. 4).



**Abbildung 4** Darstellung der verschiedenen Antwortfunktion. Links: Rührkesselreaktor und rechts: Rohrreaktor. Die linke Abbildung nutzt anstatt der Zeit, die normierte Zeit in Bezug auf die Verweilzeit (vgl. Formel 2.4.3). Quelle: (Hertwig et al., 2007)

Die Antwortfunktion des idealen Rührkesselreaktors wird durch eine e-Funktion beschrieben.

$$E(\theta) = e^{-\theta} \quad (2.4.2)$$

$$\text{mit } \theta = \frac{t}{\bar{t}} \quad (2.4.3)$$

$$\bar{t} = \frac{V_R}{\dot{V}} \quad (2.4.4)$$

mit  $\bar{t}$  = die mittlere Verweilzeit  
 $V_R$  = Reaktorvolumen  
 $\dot{V}$  = Volumenstrom in den Reaktor



## Messung der Benzoatkonzentrationen

Im Zuge dieser Bachelorarbeit sollten diurnale Schwankungen der Benzoatkonzentrationen innerhalb der PFR analysiert werden. Um ein gutes Bild der Konzentrationsschwankungen von Benzoat zu bekommen, war es von Interesse zu sehen, wie stark sich die Konzentration innerhalb eines Tages änderten. Von besonderem Interesse waren die Änderung im Morgengrauen und Abenddämmerung, da hier die durch das Licht induzierten Veränderungen als am größten vermutet wurden. Da diese Arbeit während der Sommermonate erarbeitet wurde, musste man beachten, dass die natürliche Lichteinstrahlung bereits früh am Morgen begann und bis spät in die Nacht vorhanden war.

Dementsprechend musste man mit der Probennahme bereits früh am morgen beginnen, um einen Wert zu haben, der noch nicht durch die Lichteinstrahlung beeinflusst wurde. Analog zu den frühen Messungen musste man am Abend bis spät in die Nacht Proben nehmen, um zu sehen wie schnell sich die Konzentration von Benzoat wieder veränderte.

Um eine ausreichende Datenlage für diese Schwankungen zu haben, wurde für jede Messreihe stündlich eine Probe aus den Reaktoren 1, 2 und 3 genommen. Diese 3 Reaktoren wurden ausgewählt, da sie gemäß Tabelle 4 alle unterschiedlich Betriebsparameter aufwiesen: Reaktor 1 und 3 waren zwar bepflanzt, bekamen jedoch unterschiedliche Lösungen zugeführt; Reaktor 2 war unbepflanzt und konnte somit gut als Kontrolle fungieren.

Bei den stündlichen Probennahmen wurden 10 mL Volumen entnommen und diese sofort mit 1-2 Tropfen 6 M HCl versetzt. Diese Ansäuerung bedingte zum einen eine Protonierung des Benzoats, wodurch später ein besserer Übergang in das organische Lösemittel ermöglicht wurde (nötig für die GC-MS-Messung), zum anderen, dass die biologisch ablaufenden Prozesse gestoppt wurden und es zu keinen weiteren Veränderungen kam.

Es wurde diese einfache Aufarbeitungsweise benutzt, da interne Vorversuche ergeben haben, dass sie zu guten Ergebnissen führte.

Als Extraktionsmittel wurde Ethylacetat verwendet. Nach Zugabe des organischen Lösemittels wurde die Probe ausgeschüttelt, um so möglichst quantitativ das Benzoat in die organische Phase zu überführen. Für die Messung wurde die organische Phase in kleine Glasvials überführt und bis zur Messung im Kühlschrank aufbewahrt.

Das GC-MS (GC: *Agilent Technologies 7890A GC Systems*; MS: *Agilent Technologies 5975C interx XL MSD*) wurde mit folgenden Parametern betrieben:

Die Gesamtlaufzeit der Messung betrug 35,5 Minuten. Es wurde ein Temperaturprogramm gefahren, bei dem 50°C für 1 Minute gehalten wurde, dann mit einer Steigung von 4°C/min auf 150°C erhitzt wurde. Daran schloss sich unmittelbar die zweite Heizphase mit 20°C/min an, die bis 300°C heizte. Dieses Niveau wurde für 2 Minuten gehalten. An den Lauf schloss sich ein "Post Run" von 5 Minuten

bei 300°C an. Es wurde ein Probenvolumen von 1 µL injiziert. Der Injektor wurde im "splitless" Modus betrieben und hatte eine Temperatur von 280°C. Die Transferlinie zum Massenspektrometer hatte eine Temperatur von 280°C. Die Säule (*Zebtron ZB-1*) war eine *BP5 forte* mit den Abmessungen 30 m x 250 µm x 0,25 µm. Als Trägergas wurde Helium mit einer Reinheit von 5,2 benutzt, das mit einer Fließgeschwindigkeit von 1,2 mL/min floss. Als Schutz für das Massenfilament wurde ein "solvent delay" von 8 Minuten eingestellt. Die Scanbandbreite des Massenspektrometers ging von 40 m/z bis 500 m/z. Die Quelle des Massenspektrometers hatte eine Temperatur von 230°C und der Quadrupol eine Temperatur von 150°C. Der EMV (Electron Multiplier Voltage) betrug 1541,18 V und der Gain 0,45.

Im Zuge dieser Arbeit wurde auch eine Benzoatabbaukinetik aufgenommen. Dafür wurden 0,5 g Natriumbenzoat in 100 ml dest. Wasser gelöst (3,46 mM) und direkt in den Reaktorraum injiziert (Zielkonzentration Reaktor 346 µM). Dort wurde dann die Kreislaufpumprate für 1 h auf 200 rpm (= 297 mL/Min) erhöht, um eine gute Durchmischung sicherzustellen. Danach wurde für jede Stunde an diesem Tag eine Probe genommen sowie 24 h nach der Injektion.

### **ESI-MS Messung (UPLC-LTQ-Orbitrap MS/MS)**

Bei der ESI-MS (*Thermo Fischer Scientific, UPLC-LTQ Orbitrap MS/MS*) handelt es sich um ein Massenspektrometer. Das Akronym steht für **E**lektronenspray-Ionisations-**M**assenspektrometer. Unter Elektronenspray wird die Dispersion von Ionen in einer Flüssigkeit in sehr viele kleine geladene Tröpfchen verstanden. ESI-MS wird zur Analyse von Bioanalyten verwendet, bzw. in unserem Fall von Proteinen/Peptiden. Das Messprinzip funktioniert folgendermaßen:

Zuerst wird eine Vorfraktionierung der Probe bewerkstelligt, indem eine RP-HPLC vorgeschaltet ist, wovon eine Kapillare die Probe weiter führt. Zwischen der Kapillare und dem Massenspektrometer liegt eine Hochspannung an. Die Potentialdifferenz durchdringt die Flüssigkeit in der Kapillare, wodurch die Analyten in der Flüssigkeit ähnlich einer Elektrophorese getrennt werden. Durch diese Aufteilung kommt es zur Ladungsverdichtung an der Oberfläche der Flüssigkeit. Die Ionen und die Flüssigkeit werden weiter in Richtung des Massenspektrometers gezogen. Aufgrund der Oberflächenspannung der Flüssigkeit, die dem elektrischen Feld entgegenwirkt, entsteht der charakteristische Taylor-Konus. Bei ausreichend hohen Feldstärken ist dieser Konus stabil und emittiert von seiner Spitze einen filamentären Strom von wenigen Millimeter Durchmesser. Dieser Strom wird irgendwann instabil und zerfällt in winzige Tröpfchen (Coulomb Explosion). Aus diesen Tröpfchen wandern die Ionen nun in die Gasphase, wovon sie dann Richtung Massenspektrometer gelangen und wo sie gemessen werden. (Lottspeich et al., 1998).

Das Messverfahren beruht auf einer *ion trap*, bei der die Analyten, bzw. Ionen innerhalb eines elektrischen Felds eingefangen werden und dort für eine gewisse Zeit gehalten werden. In der Ionenfalle

gibt es eine Eintrittskappe und eine Endkappe, an denen beide eine Wechselspannung angelegt ist. Diese beiden Wechselspannungen erzeugen im Inneren der Falle ein quadrupolares Feld, welches wiederum eine Potentialmulde kreiert, wo die Analyten eingefangen werden können. Wenn ausreichend Analyten in der Falle sind, wird die Eingangskappe verschlossen und die Proteine werden durch Verstärkung des elektrischen Felds in Richtung des Detektors transferiert.

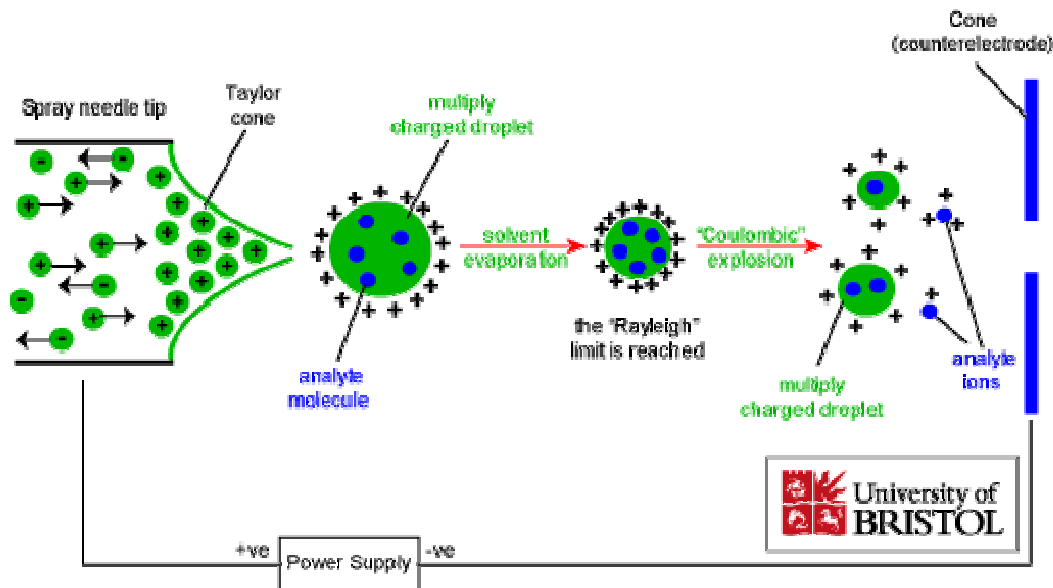


Abbildung 5 Schematische Darstellung des ESI-MS Prinzips. Die Analyten werden über den Taylorkonus zu einem filamenartigen Strom geleitet, bis sie aufgrund zu großer Ladungsdichte explodieren (coulomb explosion) und danach in die Gasphase der Ionisierungsquelle gelangen. Von dort werden sie Richtung Massenspektrometer gezogen, wo sie dann gemessen werden. Quelle:(University of Bristol <http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/esi-mechanism.gif>)

Die Aufarbeitung der Reaktorproben folgte nachstehendem Schema (Jehlich et al., 2010):

Es wurden 50 mL Probe aus dem Reaktorinhalt entnommen. Nach Entnahme der Proben wurden sie 2 x in 50 mM Tris/HCl Puffer pH = 7,5 + 0,1 mg/ml Chloramphenicol + 1 mM PMSF gewaschen. Danach wurde den Proben 50 µl SDS-Aufschlusspuffer (20 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 + 2 % SDS) zugeführt und danach für 5 Minuten bei 60°C und 1400 rpm geschüttelt. Danach wurden die Proben mit 1 mL 20 mM Tris/HCl Puffer pH 7,5 + 1 µl/ml Benzonase + 0,1 mg/ml MgCl<sub>2</sub> + 1 mM PMSF versetzt. Daran schlossen sich 2 x 1 Minute Zellaufschluss mittels Ultraschalldisintegrator an. Nach dem Aufschluss wurden die Proben für 10 Minuten bei 37°C und 1400 rpm geschüttelt und danach abzentrifugiert. Der Überstand wurde für die weitere Verwendung genutzt.

Für die weitere Verarbeitung wurden die Proteine in eiskaltem Aceton gefällt und durch eine Gelelektrophorese fraktioniert. Die entstehenden Banden wurden mittels Skalpell ausgeschnitten und in einzelne Polypropylenreaktionsgefäße geführt. Diese kleinen Bandenstücke wurden dann 2 x mit 200 µl Waschlösung (50 % Methanol, 5 % Essigsäure und 45 % dest. Wasser) für eine Stunde geschüttelt und gewaschen.

Danach wurden den Proben 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril hinzugegeben und für 5 Minuten geschüttelt. Nach Entnahme des Acetonitrils wurde den Proben 30  $\mu\text{L}$  einer 10 mM DTT- Lösung zugegeben und für eine halbe Stunde geschüttelt. Danach wurde das DTT mittels einer Pipette entfernt und man wiederholte den vorherigen Schritt mit 30  $\mu\text{L}$  100mM Iodacetamid. Dann wurde das Iodacetamid entfernt und man gab wieder 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril hinzu und ließ es für 5 Minuten schütteln. Nach Entfernen des Acetonitrils gab man 200  $\mu\text{L}$  10 mM Ammoniumbicarbonat hinzu und ließ es für 5 Minuten schütteln. Danach wurde das Ammoniumbicarbonat entfernt und man gab abermals 200  $\mu\text{L}$  Acetonitril hinzu und ließ es für 5 Minuten schütteln. Das Acetonitril wurde entfernt und man fügt dann

0,1  $\mu\text{g}$  Trypsin hinzu. Die Proben wurden über Nacht in einem Inkubator bei 37°C gelassen, damit sie verdaut wurden.

Am nächsten Morgen wurden die Proben dann mit 30  $\mu\text{L}$  5 mM Ammoniumbicarbonat versetzt und für 10 Minuten geschüttelt. Die Flüssigkeit wurde dann in einem separaten Gefäß aufgefangen. Danach gab man 30  $\mu\text{L}$  eines Extraktionspuffers (50 % ACN, 44,1 5% dest. Wasser und 5,85 % Ameisensäure) hinzu und ließ sie wieder für 10 Minuten schütteln. Die Flüssigkeit wurde wieder in dem separaten Gefäß aufgefangen. Man wiederholte den letzten Schritt ein weiteres Mal. Danach wurde das gesammelte Volumen komplett eingengt und bis zur weiteren Verwertung eingefroren. Für die Messung auf der ESI-MS wurden die Proben dann in 15  $\mu\text{L}$  0,1% Ameisensäure aufgenommen, für 10 Minuten geschüttelt und dann in die Messphiolen überführt.

Die durch die Messung erhaltenen Daten wurden dann durch die Software *Proteome Discoverer v1.0 build 43* (Hersteller: Thermo) mit einer Datenbank der NCBI (National Center for Biotechnology Information) verglichen. So war es möglich, die gefundenen Peptide mit denen aus der Datenbank zu vergleichen und so phylogenetische Aussagen über die Zusammensetzung der Rhizosphäre zu erhalten. Um eine bessere Auflösung der Daten zu bewerkstelligen, wurde der Abgleich für gewisse phylogenetische Gruppen eingegrenzt: Es wurde spezifisch für Bakterien, Archaeen, Pilze und Pflanzen gesucht. Die Suche wurde mit dem "tandem mass spectrometry ion search algorithm" vom *Mascot House Server* (v.2.2.1) durchgeführt. Die Parameter für die Ermittlung der Taxonomie wurden folgendermaßen eingestellt: Taxonomy ID 2(Bakterien), 4751 (Fungi), 33090 (Viridplantae) von der NCBI (Nationalcenter of Biotechnology Information). Beim Verdau durften maximal 2 Schnittstellen nicht geschnitten werden. Die Detektionstoleranz wurde auf  $\pm 10$  ppm und die MS/MS-Toleranz auf  $\pm 0,8$  Da eingestellt. Die Peptide galten als identifiziert, wenn es eine "false positive probability"  $\leq 0,05$  gab (Taubert et al., 2011).

Die Auswertung erfolgte mittels eines Excel-Spreadsheet, in dem zu jedem gefundenen Protein einer Art eine GI-Nummer zugeordnet wurde. Diese Nummern wurden in der NCBI Datenbank eingegeben

und man konnte so die taxonomische Zuordnung des Peptids herausfinden. Wenn mehrere Peptide einer Art im Spreadsheet gefunden wurden, wurde die Anzahl dieser Treffer gezählt und deren Phylogenie auf Klassen, Ordnungen und Familien hin untersucht. Da das Grundrauschen bei den Messungen sehr groß war, wurden bereits Arten, die mindestens zwei mal vorkamen, für die phylogenetische Auswertung analysiert.

### **Messung der Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentration**

Die Analyse von  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$  und  $\text{NO}_3^-$  wurde mittels Schnelltests der Firma Merck durchgeführt. Im Anhang sind die Datenblätter angeführt.

Für die Ammoniumkonzentration wurden 5 mL des Reagenz  $\text{NH}_4^+$ -1 mit 200  $\mu\text{l}$  Probe versetzt und dann ließ man es für 15 Minuten reagieren. Danach wurde die Färbung mittels des Spektrometers Spectroquant Nova 60<sup>®</sup> gemessen.

Für Nitrit wurde ein gestrichener Löffel (bereits im Deckel des Reagenz eingebracht) des Reagenz  $\text{NO}_2^-$ -1 in ein Reagenzglas gegeben und mit 1 mL Probe versetzt und man ließ es dann für 10 Minuten reagieren. Danach wurde es im Spectroquant Nova 60<sup>®</sup> gemessen.

Bei Nitrat wurden 8 mL des Reagenzes  $\text{NO}_3^-$ -1 in ein Reagenzglas gegeben, diese mit 1 mL Probe versetzt und danach 1 mL des Reagenzes  $\text{NO}_3^-$ -2 zugegeben. Dann wurde das Glas geschüttelt und dann ließ man auch diese Probe für 10 Minuten reagieren ehe man sie im Spectroquant Nova 60<sup>®</sup> maß.

Um Fehler bei der Messung durch Pflanzenstücke zu verhindern, wurden die Proben vor der Messung filtriert.

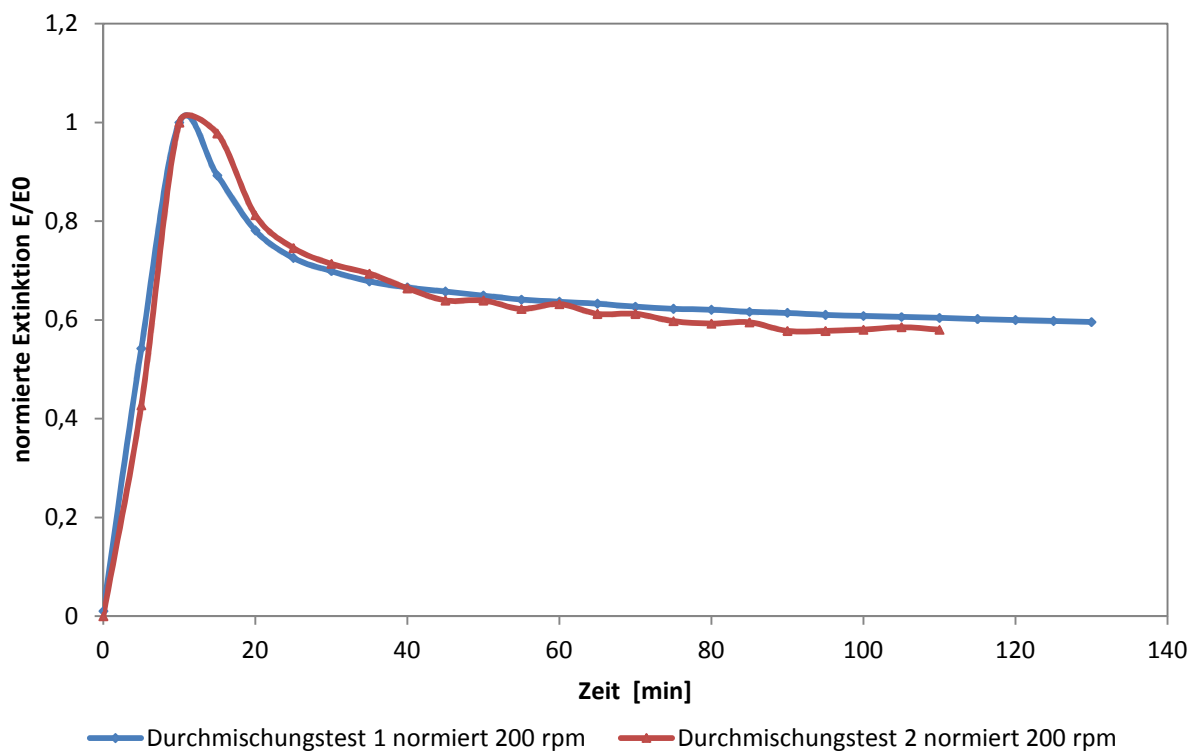
Die Standardabweichung wurde den Datenblättern entnommen und betrug für die Ammoniummessung  $\pm 1,2$  mg/L und für die Nitritmessungen  $\pm 0,02$  mg/l. Eigene Messungen der Standardabweichungen ergaben, dass sie innerhalb dieses Intervalls lagen.

### 3 Ergebnisse

Die Darstellung der Ergebnisse wird in drei Teilen durchgeführt. Zuerst werden die Daten der Verweilzeit- und Durchmischungsversuche gezeigt. Danach wird auf die Benzoatkonzentrationschwankungen eingegangen und zum Schluss werden die Daten der ESI-MS präsentiert.

#### 3.1 Verweilzeiten und Durchmischungsversuche

Die Ergebnisse der Durchmischungs- und Verweilzeitversuche ermöglichen eine bessere Betrachtung der verfahrenstechnischen Verhaltensweise der PFR. Es werden zuerst die Daten des Durchmischungsversuchs und dann der Verweilzeiten gezeigt und beschrieben.

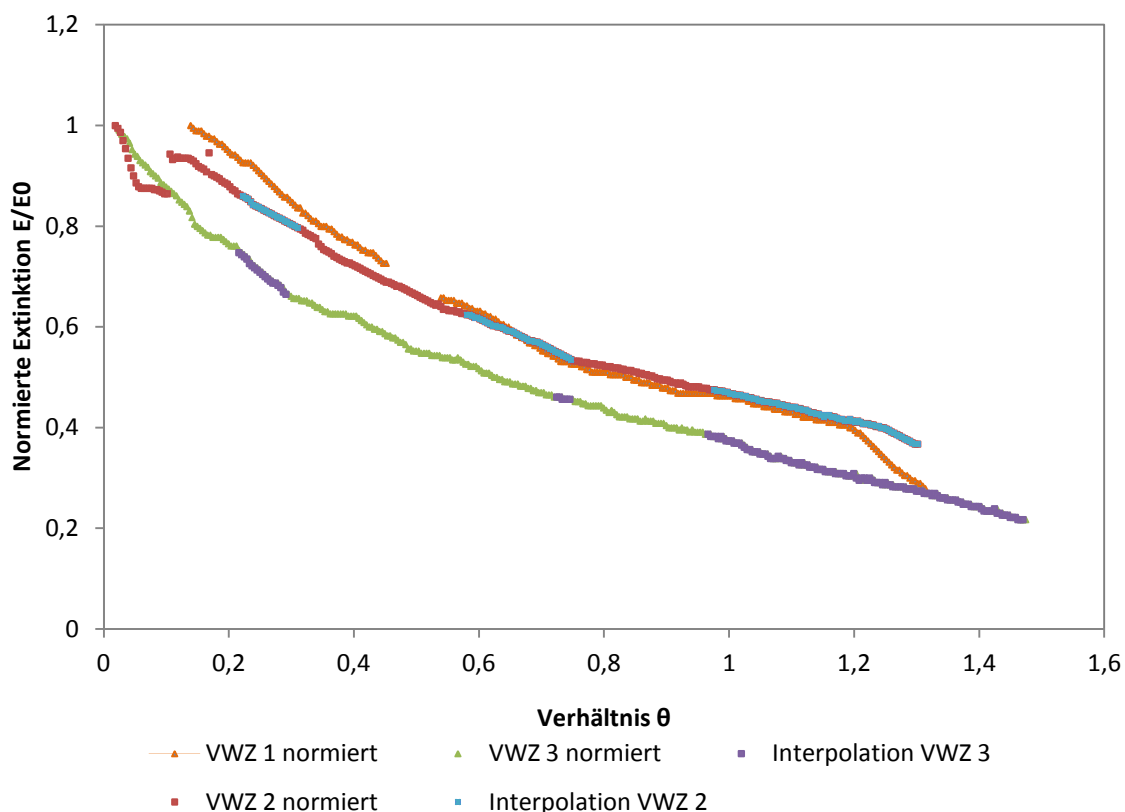


**Abbildung 6** Normierter Durchmischungsversuch eines bepflanzten Festbettreaktor bei einer Drehzahl von 200 rpm (297 mL/min). Die Normierung ist auf den höchsten gemessenen Wert bezogen. Es wurde eine Einfachmessung durchgeführt.

An die Durchmischungsversuche schlossen sich die Messungen der Verweilzeiten unmittelbar an. Um eine bessere Analyse der Daten zu ermöglichen, wurden sowohl die Werte der Durchmischungsversuche als auch der Verweilzeiten normalisiert. Die Normalisierung der Durchmischungsversuche wurde auf den höchsten gemessenen Extinktionswert bezogen, wohingegen die Werte der Verweilzeiten auf den Anfangswert der Verweilzeitmessreihe bezogen wurden. Zusätzlich wurden die Zeiten der Verweilzeitversuche auf die theoretische mittlere Verweilzeit normiert. Es wird durch das Ver-

hältnis  $\Theta$  beschrieben (vgl. Formel 2.4.3). Durch die Normierung konnten die Verläufe direkt miteinander verglichen werden.

Die Abbildung 6 zeigt einen Verlauf, bei dem es bereits nach kurzer Zeit (ca. 10 Minuten) zur Ausbildung eines Extinktionspeaks kam. Die Extinktion verringerte sich dann im weiteren Verlauf des Durchmischungsversuches, ehe sie nach einer Stunde in eine annähernd stationäre Phase überging. Bei beiden Versuchen sieht man dieses Verhalten. Die Daten des Versuchs mit einer Pumprate von 128 rpm (190 mL/min) wurden aufgrund mangelnder Reproduzierbarkeit weggelassen. Das Ende des Durchmischungsversuches ist der Beginn der Verweilzeitmessung.



**Abbildung 7** Darstellung der verschiedenen normierten Verweilzeitversuche. Die Normierung bezieht sich auf den ersten gemessenen Wert der Verweilzeitversuche. Aufgrund von fehlerhaften Verhalten des Spektrometers mussten bei VWZ 2 und 3 mehrere Daten interpoliert werden. Für die VWZ 2 wurden die interpolierten Daten mit hellblau gekennzeichnet und für VWZ 3 mit lila.  $\Theta$  beschreibt das Verhältnis der Zeit zur mittleren Verweilzeit (vgl. Formel 2.4.2). Die Pumprate betrug 32 rpm (50 mL/min).

Die Verweilzeitversuche liefen über acht Tage. Aufgrund einiger technischer Komplikationen mussten einige Werte der gemessenen Extinktionen interpoliert werden. In der Abbildung 7 wurden diese Interpolationen für den Verweilzeitversuch 2 mit hellblauer und für den Verweilzeitversuch 3 mit lila Farbe markiert.

Es wurden drei Verweilzeitversuche durchgeführt und in Abbildung 7 dargestellt. Zu jedem dieser Versuche wurde eine exponentielle Regression erstellt. Durch einen Koeffizientenvergleich mit den

Formeln 2.4.2 und den Formeln 2.4.3 und 2.4.4 war es möglich, aus den Ergebnissen der Verweilzeiten die mittlere Verweilzeiten der unterschiedlichen Versuche zu ermitteln. Die Werte wurden ermittelt, indem zu jedem gemessenen Wert die dazu gehörige mittlere Verweilzeit berechnet wurde. Die Anzahl der verschiedenen mittleren Verweilzeiten wurden dann zu einem Mittelwert zusammengefasst. Tabelle 5 stellt die unterschiedlichen ermittelten Regressionskurven sowie deren dazugehörige mittlere Verweilzeiten und deren Abweichung vom theoretischen Wert dar

**Tabelle 5 Übersicht der ermittelten mittleren Verweilzeiten der unterschiedlichen Verweilzeitversuche. Es wurde mittels der Regressionsformel zu jedem Messpunkt eine mittlere Verweilzeit bestimmt. Diese wurden dann in einem Mittelwert zusammengefasst, der hier als "Mittlere Verweilzeit" beschrieben ist. Die theoretische Verweilzeit wurde aus den Eigenschaften des PFR berechnet.**

Versuch	Regressionsformel	R <sup>2</sup>	Mittlere Verweilzeit [min]	Mittlere Verweilzeit [d]	Theor. mittlere Verweilzeit [d]	Abweichung in %
VWZ 1	$y=1,11e^{(-0,92x)}$	0,978	7308,36	5,08	4,96	2,4
VWZ 2	$y=0,977e^{(-0,74x)}$	0,989	7323,73	5,09	4,96	2,6
VWZ 3	$y=0,921e^{(-0,93x)}$	0,994	7651,65	5,31	4,96	6,6

. Man sieht, dass die gemessenen Werte und die theoretischen Werte nur zwischen 2,4 % - 6,6 % voneinander abwichen. Die mittlere Verweilzeit betrug etwas mehr als 5 Tage. Das ermittelte Bestimmtheitsmaß der verschiedenen Regressionkurven kann mit 0,978; 0,989 und 0,994 als ausreichend genau beschrieben werden.

### 3.2 Benzoatkonzentrationsschwankungen

Um die Einflussgröße des Sonnenlichts zu analysieren, wurden mehrere Probenserien genommen, die entweder den Nacht/Tag - Wechsel oder den Tag/Nacht - Wechsel abdeckten. Die Ergebnisse in Abbildung 8 stellen einen Nacht/Tag - Wechsel dar. Aufgrund sich ähnelnder Ergebnisse wird darauf verzichtet, alle Messreihen darzustellen.

Die angezeigten Fehlerbalken wurden durch eine fünffach Messung einer Probe der jeweiligen Reaktoren bestimmt und deren Abweichung in Prozent ermittelt. Es ergab sich für Reaktor 1 eine Abweichung von 16,08%, für Reaktor 2 eine Abweichung von 23,93% und für Reaktor 3 von 19,39%.

In allen drei untersuchten Reaktoren war die Menge an kontinuierlich zugeführtem Benzoat mit 0,74 mM gleich. Aus Abbildung 8 ist erkenntlich, dass in allen drei Reaktoren mehr als 99% des Benzoats abgebaut wurden. Die Restkonzentration von Benzoat in allen Reaktoren war kleiner als 1 µM.



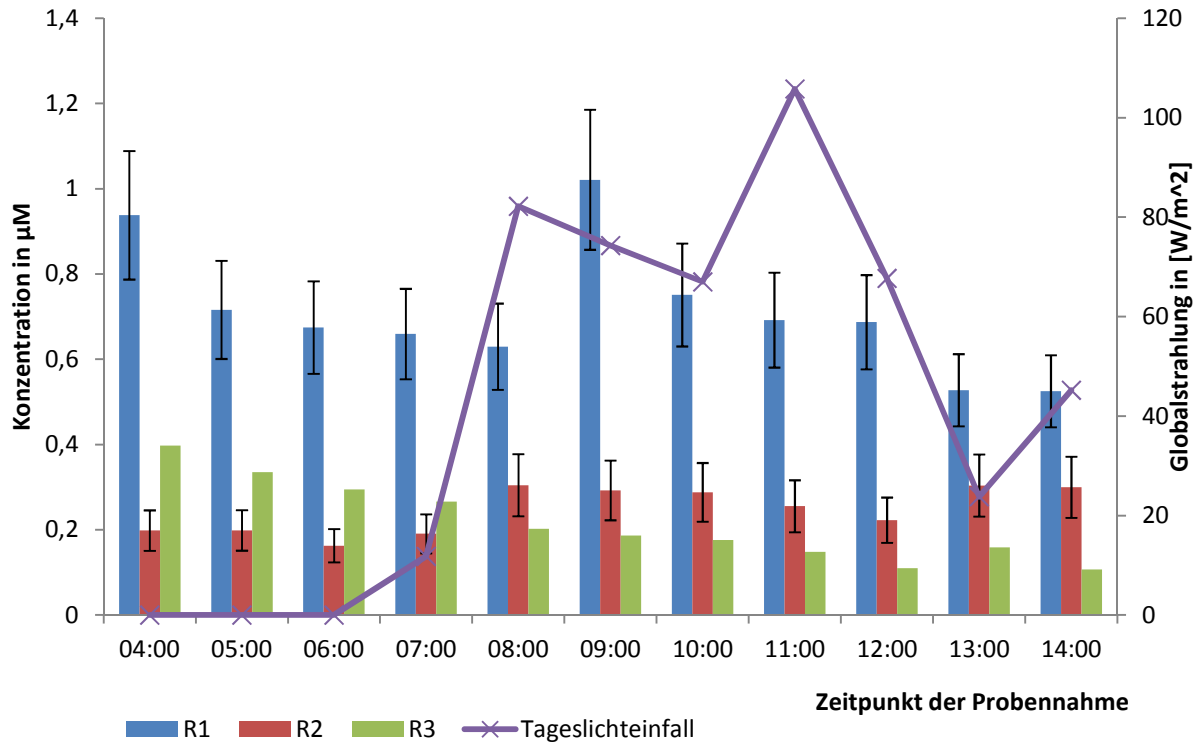


Abbildung 8 Darstellung des Verlaufs der Benzoatkonzentrationen. Die Fehlerbalken wurden mittels einer Dreifachmessung einer Probe von jedem Reaktor. Die Messreihe stellt den Nacht/Tag-Wechsel dar. Auf der Sekundärachse wird der gemessene Globalstrahlung dargestellt.

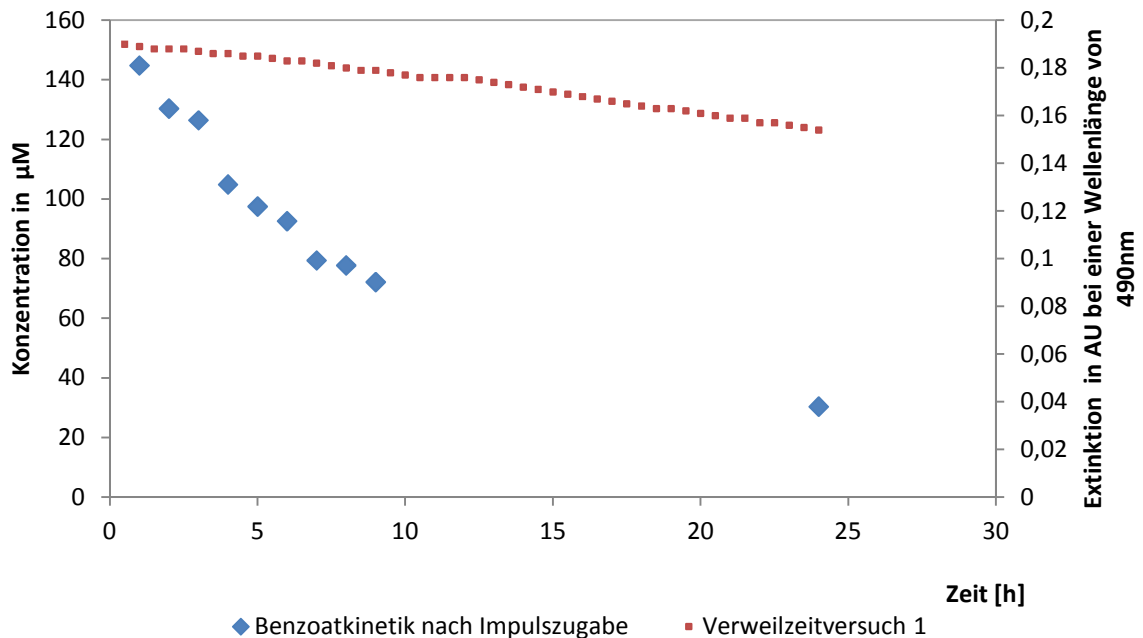


Abbildung 9 Darstellung der Benzoatkinetik nach Injektion von 346 µM Natriumbenzoat (Endkonzentration im Reaktor). Vor der ersten Probenahme wurde die Kreislaufpumpe für 1 h auf 200 rpm (297 mL/min) erhöht. Die rote Linie zeigt die Abnahme der Extinktion während des Verweilzeitversuchs.

Abbildung 8 verdeutlicht, wie stark der Abbau von Benzoat im stationären Betriebszustand war. Um jedoch festzustellen, wie schnell ein Überschuss an Benzoat innerhalb des Systems verarbeitet werden kann, wurde eine Benzoatkinetik durchgeführt. Dafür wurde dem Reaktor zusätzlich zu den  $760 \mu\text{M}$  Benzoat ein Benzoatimpuls mit einer Zielkonzentration von  $346 \mu\text{M}$  zugesetzt. Nach einer einstündigen Mischphase ( $200 \text{ rpm} = 297 \text{ mL/min}$ ) wurde nach jeder Stunde eine Probe genommen, um zu sehen wie schnell die eingebrachte Benzoatmenge verstoffwechselt wird. In der Abbildung 9 wurde diese Abbaukinetik dargestellt. Man sieht, dass bereits nach der Mischphase weniger als die Hälfte des Benzoats vorhanden war. Die Abnahme von Benzoat ging dabei deutlich schneller vonstatten, als durch das Auswaschen erreicht hätte werden können. Die Gegenüberstellung der Verweilzeitdaten verdeutlicht, dass die negative Steigung der Kinetik größer war als die der Verweilzeitkurve. Das belegt, dass die vorhandene Menge Benzoat nicht ausgespült wurde, sondern von den Mikroorganismen umgesetzt wurde. Die Abnahme der Daten konnte in erster Näherung als lineare Funktion angenommen werden. Der erste Messwert lag bei  $145 \mu\text{M}$  und hatte nach 24 h einen Wert von  $25 \mu\text{M}$  erreicht. Es lagen keine Konzentrationswerte des Reaktors 7 im stationären Betriebszustand vor. Als Vergleichswerte wurden die Messungen der Reaktoren 1, 2 und 3 genutzt.

Ein weiterer relevanter Einflussfaktor war die vorhandene Sauerstoffkonzentration. Das Sauerstoffvorkommen wurde indirekt gemessen, indem Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentrationen gemessen wurden. Ammonium wird mittels molekularem Sauerstoff zu Nitrit und dann zu Nitrat oxidiert. Die vorhandenen Mengen dieser Konzentrationen gaben also Aufschluss über die Verteilung von Sauerstoff im Wurzelgeflecht. Um zu sehen, ob es Korrelationen mit dem Tageslicht gab, wurde die Globalstrahlung auf die Sekundärachse projiziert.

Man kann in Abbildung 10 erkennen, dass Reaktor 2 eine höhere Ammoniumkonzentration aufwies als Reaktor 1, dafür weniger Nitriten enthielt. Diese signifikanten Unterschiede wurden in mehreren, hier nicht gezeigten Messreihen, detektiert und bestätigt.

Dazu verdeutlicht Abbildung 10, dass Reaktor 2 mit  $30 \text{ mg/L}$  an Ammoniumionen nur knapp 40 % der zugeführten Menge an Ammonium umgesetzt hat, wohingegen Reaktor 1 nahezu 80 % der Ammoniumionen verwerten konnte. Da man für die Oxidation von Ammonium molekularen Sauerstoff benötigt, kann man hieraus schließen, dass in Reaktor 2 weniger Sauerstoff vorhanden war.

Im Vergleich untereinander erkennt man, dass Reaktor 1 sein Verhalten veränderte, sobald sich das System dem Abend näherte. Die gefundene Ammoniumkonzentration von Reaktor 1 nahm zum Abend hin zu. Bei Reaktor 2 hingegen blieb die Ammoniumkonzentration während des gesamten Verlaufs konstant.

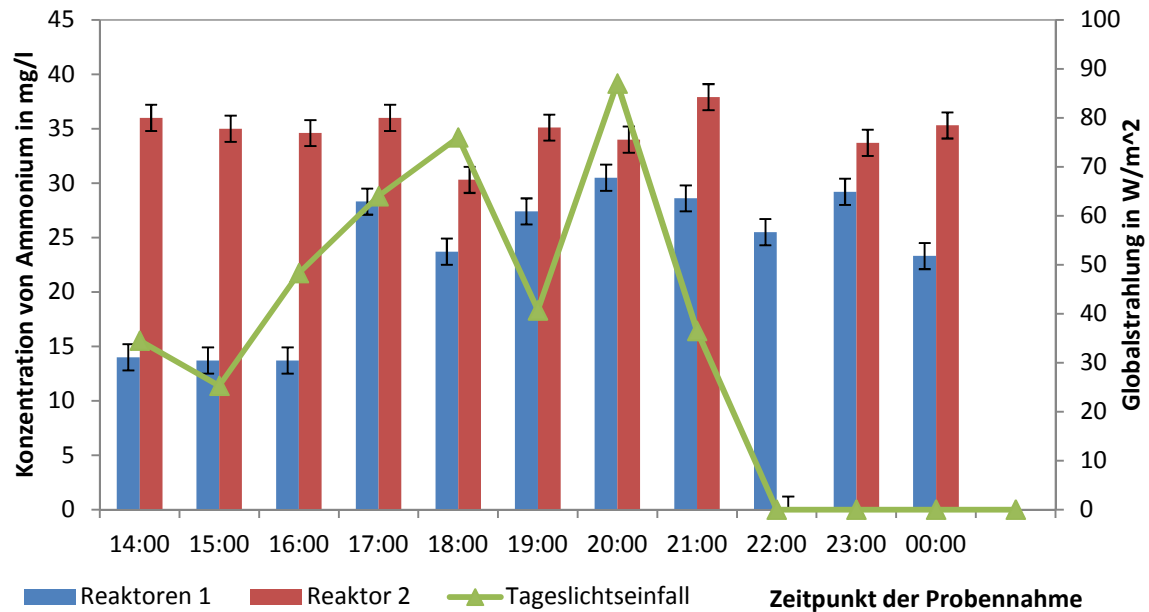


Abbildung 10 Darstellung der Ammoniumkonzentration. Reaktor 3 wurde nicht gemessen. Die Probe um 22 Uhr bei R2 ist durch ein fehlerhaftes Handling nicht gemessen worden. Es wurde eine Einfachmessung durchgeführt (Fehlerbalken vom Datenblatt). Auf der Sekundärachse ist der Globalstrahlung zu sehen.

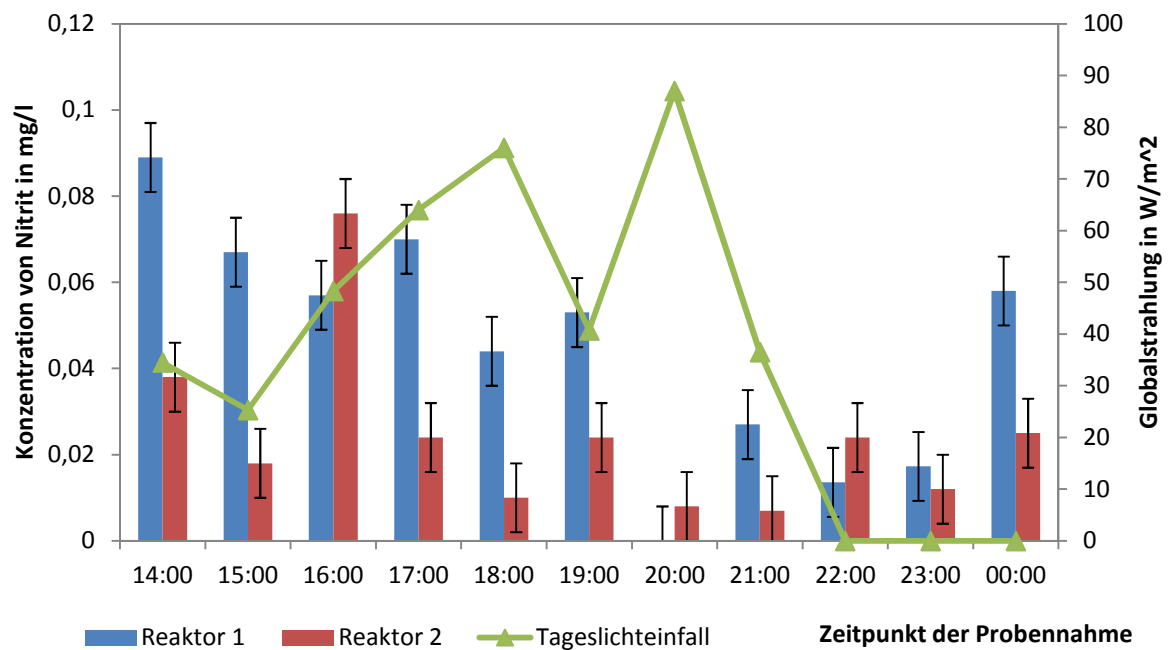


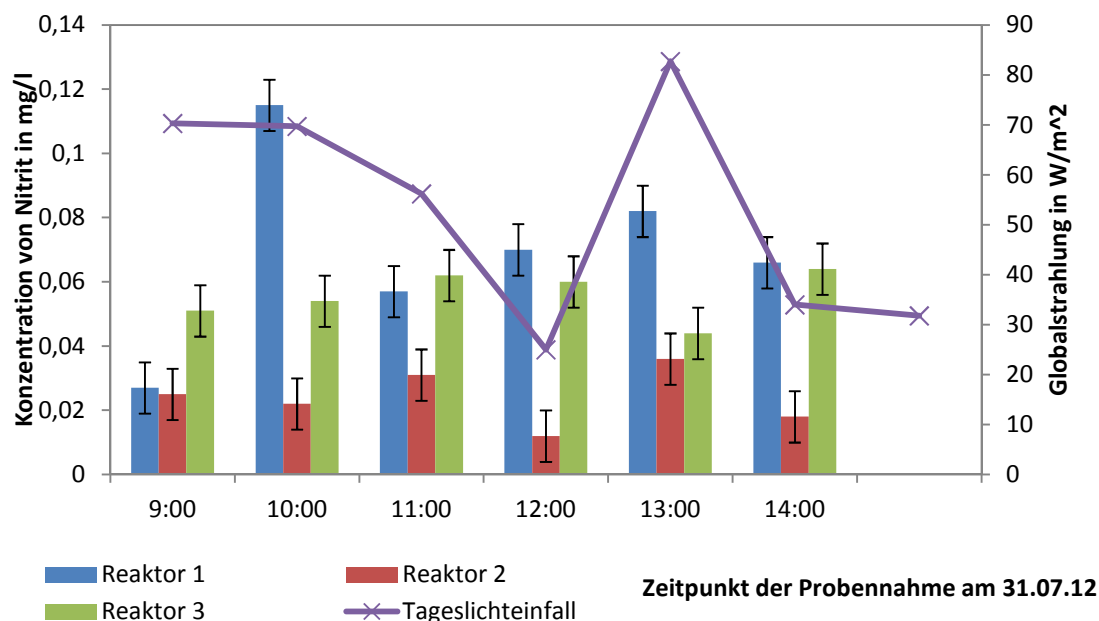
Abbildung 11 Darstellung der unterschiedlichen Nitritkonzentrationen gegenüber dem einfallenden Tageslicht. Die Proben wurden während eines Tag/Nachtzyklus genommen und als Einfachmessung gemessen. Reaktor 3 wurde nicht gemessen. Die Fehlerbalken wurde den Datenblättern entnommen.

Die Korrelation der Globalstrahlung mit der Veränderung der Ammoniumkonzentration zeigt zwei gegenläufige Verhalten. In einem Fall nahmen die Ammoniumkonzentration und der Globalstrahlung

simultan zu. Zum Ende hingegen nahm die Globalstrahlung ab und die Ammoniumkonzentration blieb konstant.

Da Ammonium die Ausgangsform der nachfolgenden oxidativen Schritte ist, wurde für ein komplettes Bild der Oxidation ebenfalls die Konzentrationen von Nitrit und Nitrat gemessen. In Abbildung 11 sind die ermittelten Werte der Nitritionen dargestellt.

Bei der Nitritkonzentration (Abb. 11) kam es zu einer Abnahme der gefundenen Ionen zum Abend hin, wohingegen während des Tages eine deutlich höhere Konzentration aufgefunden werden konnte. Dazu fällt auf, dass die Konzentration in Reaktor 2 meistens geringer war als in Reaktor 1. Beim Vergleich mit der Globalstrahlung sieht man, dass nur die Abnahme der Einstrahlung am Abend eine Reduktion der Nitritionen nach sich zog.



**Abbildung 12** Darstellung der unterschiedlichen Nitritkonzentrationen. Es handelt sich um eine Tagesmessreihe. Die Fehlerbalkentoleranz wurde den Datenblättern entnommen.

Man sieht in Abbildung 12, dass die Konzentration von  $\text{NO}_2^-$  in Reaktor 1 und Reaktor 3 höher waren als die Konzentrationen in Reaktor 2. Die vorgefundenen Konzentrationen von  $\text{NO}_2^-$  in den beiden Reaktoren 1 und 3 wichen nur leicht voneinander ab. Die Korrelation mit der Globalstrahlung ergab keine schlüssigen Ergebnisse.

Im Zuge des Monitoring der Reaktoren 1, 2 und 3 wurden auch die Evaporationsdaten erfasst. Um eine Idee der unterschiedlichen Aktivitäten der Pflanzen zu haben, wurde ein kleiner Ausschnitt dieser Datenmenge genommen und in der Tabelle 6 dargestellt. Die Werte wurden dabei auf eine Pflanze bezogen, das heißt, dass die gesamte evaporierte Menge durch die Anzahl der Bepflanzungen im Reaktor geteilt wurde; in diesem Fall durch fünf. Je höher die Evaporationsrate ist, desto aktiver sind die Pflanzen in ihrem Metabolismus.

**Tabelle 6** Darstellung der unterschiedlichen Evaporationsdaten von Reaktor 1, 2 und 3. Die Evaporationsraten wurden über das Wochenende bilanziert und normiert (Normierung = Bezug auf eine Pflanze pro Reaktor). Die Raten sind ein Indikator für die Fitness und den Sauerstoffeintrag der Pflanzen .

Datum der Messung	Evaporation R1 [ml/h]	Evaporation R2 [ml/h]	Evaporation R3 [ml/h]
09.07.12	3,81	0	6,59
17.07.12	4,0	0	6,38
24.07.12	3,34	0	7,91
30.07.12	3,97	0	7,55
06.08.12	2,7	0	7,1

### 3.3 Mikrobiologische Zusammensetzung

Bisher verdeutlichten die Daten nur, dass es zu Veränderungen innerhalb der Reaktoren kommt. Sie gaben aber nur geringe Hinweise, wie es zu diesen Veränderungen kommt und wodurch sie induziert wurden. Da die Hauptakteure innerhalb der PFR Mikroorganismen sind, ist es von besonderem Interesse zu sehen, wie die Zusammensetzung der mikrobiologischen Gemeinschaft innerhalb der Reaktoren ist. Mit den phylogenetischen Eigenschaften ist eine bessere Erklärung der Verhaltensweisen möglich. Die durch die ESI-MS gemessenen Daten wurden mit den Datenbanken von Bakterien, Archaeen und Pilzen verglichen. Deshalb wurden diese Arten besonders betrachtet. Es zeigte sich jedoch das Problem, dass die Datenlage der Pilze sehr dünn war, weshalb darauf verzichtet wurde, diese Daten zu zeigen.

Die Phylogenie dieser Daten wurde für die Klassen, Ordnungen und Familien analysiert und ausgewertet. Aufgrund von Unsicherheiten in der Zuordnung der Familie werden jedoch nur die Daten der Klassen und Ordnungen gezeigt, deren Konfidenzniveau ausreichend hoch war.

Da das Messinstrument sehr sensibel ist und die Qualität des Aufschlusses vor allem durch die entnommene Menge an Biomasse beeinflusst werden kann, war es nicht möglich, für alle drei Reaktoren Daten mit gleich guter Aussagekraft zu bekommen. Für die Analyse der Archaeen konnten sowohl für Reaktor 1 als auch für Reaktor 2 brauchbare Daten generiert werden.

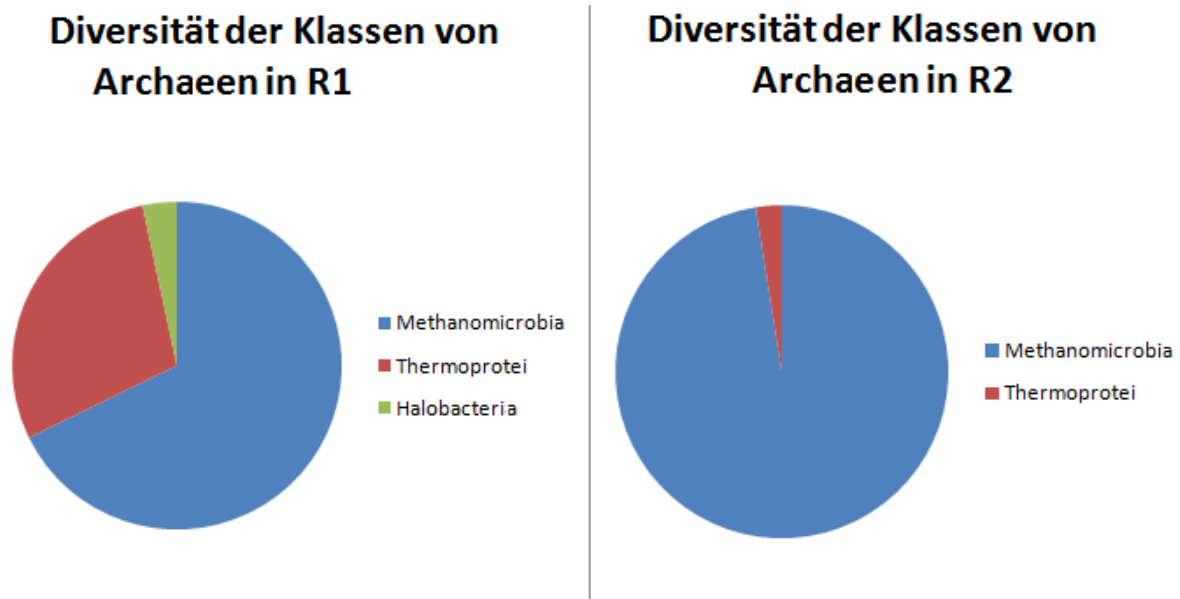


Abbildung 13 Übersicht der Diversität der vorkommenden Klassen von Archaeen in Reaktor 1 und Reaktor 2. Die Daten wurden mittels einer Datenbanksuche erhalten und dann der Phylogenie nach analysiert und zusammengefasst. Anzahl der Messwerte für links n=59 und für rechts m= 79.

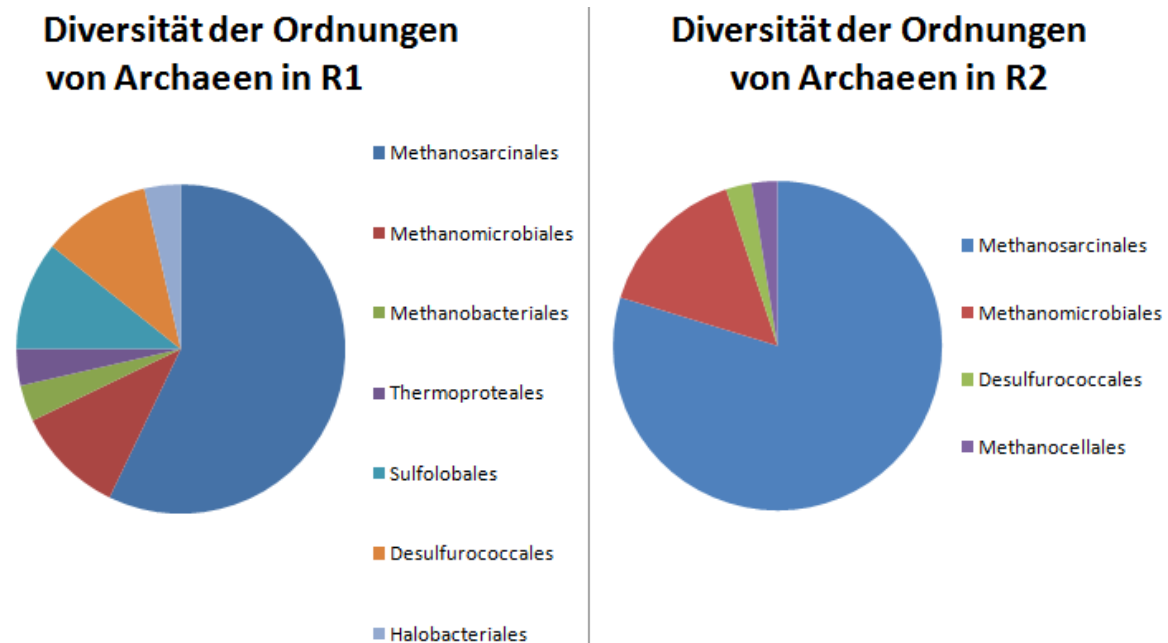


Abbildung 14 Übersicht der Diversitäten der vorkommenden Ordnungen von Archaeen von R1 und R2. Die erhaltenen Daten wurden mit einer Datenbanksuche analysiert und der Phylogenie nach strukturiert. Die Anzahl der Messwerte ist links n=56 und rechts m=79.

In der Abbildung 13 sieht man, dass die vorwiegende Anzahl an gefundenen Peptiden der Klasse der Methanomicrobia zugerechnet wurde. Auffällig ist, dass es ebenfalls Treffer für Thermoprotei und Halobacteria gab. Vermutlich handelt es sich hierbei um Fehlzuordnungen, die in den Datenbanken durchgeführt wurde, da Halobacteria in nur extrem salinen Milieus überleben können und Thermoprotei extrem thermophile Mikroorganismen sind.

Die Daten in Abbildung 14 zeigen, dass der Hauptbestandteil der vorkommenden Ordnungen den Methanosarcinales zugeordnet werden konnte. Darüber hinaus gab es eine ebenfalls große Gruppe von Methanomicrobiales. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass das Verhältnis der gefundenen Hits von Methanosarcinales zu Methanomicrobiales in beiden Abbildungen ähnlich war, nämlich 5 zu 1. Auch hier wurden noch andere Archaeen gefunden, deren Vorkommen in den Reaktoren als unwahrscheinlich gilt. Da der Reaktor weder extrem hohe Temperaturen aufwies, noch extrem salin war, kann man davon ausgehen, dass die Zuordnung der Thermoproteals und Halobacteriales eine Fehlzuordnung war. Mit dieser Erklärung kann man auch das Vorfinden von Sulfolobales und Desulfurococcales verstehen, da diese beiden Ordnungen als hyperthermophil gelten und es somit unwahrscheinlich ist, dass man diese in einem mesophilen Reaktor vorfindet.

Die Analyse der Daten in Bezug auf vorkommende Bakterienarten ergab nur bei Reaktor 2 eine ausreichend hohe Anzahl an gefundenen Peptiden und damit an auswertbaren Daten, weshalb auch nur diese Daten angeführt werden. In Abbildung 15 erkennt man, dass die Betaproteobakterien mit nahezu 75 % die größte Klasse darstellten. Darüber hinaus wurden einige Gammaproteobacteria, Clostridien und Deltaproteobacteria gefunden. Die Vorkommen der unterschiedlichen Klassen ergaben aber noch keine gute Datengrundlage zur Analyse. Erst durch die in Abbildung 16 dargestellten Ordnungen war es möglich, genauere Aussagen der vorkommenden Arten zu treffen.

Hier sieht man, dass der Großteil der vorgefundenen Ordnungen den Rhodocyclales zugeschrieben werden konnte. Darüber fand man noch Vertreter der Ordnung Clostridiales, Burkholderiales, Pseudomonadales und Desulfuromonadales. Diese 4 Ordnungen wiesen alle eine ähnliche Abundanz auf.

Das Verhältnis von aeroben zu anaeroben Ordnungen der Bakterien belief sich auf 1 : 3.

## Diversität der Klassen von Bakterien in R2

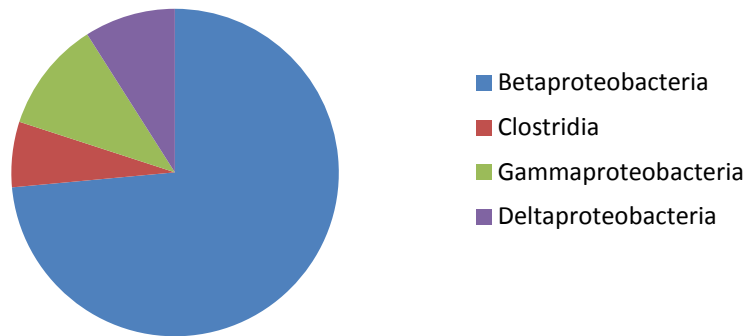


Abbildung 15 Darstellung der vorkommenden Klassen von Bakterien innerhalb des Reaktor 2. Die Daten wurden mittels einer Datenbanksuche erhalten und ihrer Phylogenie nach strukturiert. Die Anzahl der Messwerte betrug  $n=155$ .

## Diversität der Ordnungen von Bakterien in R2

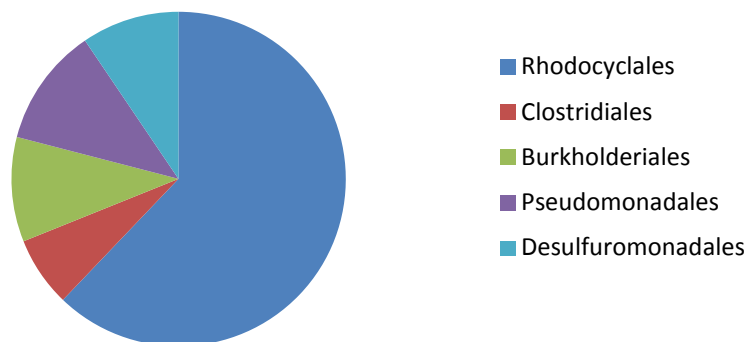


Abbildung 16 Darstellung der vorkommenden Ordnungen von Bakterien in Reaktor 2. Die Daten wurden mittels einer Datenbanksuche erhalten und ihrer Phylogenie nach strukturiert. Die Anzahl der Messwerte betrug  $n=148$ .



## 4 Diskussion

Die Diskussion der in Kapitel 3 dargestellten Ergebnisse gliedert sich in derselben Struktur: Zuerst wird auf die verfahrenstechnischen Eigenschaften eingegangen, dann auf die Schwankungen der Benzoatkonzentrationen und zum Schluss werden die Ergebnisse der mikrobiellen Diversität erörtert.

### 4.1 Durchmischungs- und Verweilzeitversuche

Eine Analyse der Verhaltensweise der PFR ist mit einigen Herausforderungen verbunden. Bei einem Vergleich mit verfahrenstechnischer Literatur fällt auf, dass es Referenzen, die sich bereits ausgiebig mit dem strömungstechnischen Verhalten solcher Reaktoren befasst haben, nicht gibt. Dazu kommt, dass in Nachschlagewerken der chemischen Verfahrenstechnik nur die 2 Grundtypen von Reaktoren behandelt werden: Rührkessel- und Rohrreaktor. Bei den PFR handelt es sich jedoch um Systeme, die weder direkt dem einen noch den anderen Ideal zugeschrieben werden können. Die PFR können eher als dynamische Systeme verstanden werden, die ihre Zustände zwischen den beiden Idealen eines Rohrreaktors oder Rührkesselreaktors haben.

Wenn man nun jedoch die erhaltenen Werte mit den Eigenschaften von Reaktoren vergleicht, die in der Basisliteratur für chemische Verfahrenstechnik (Hertwig et al., 2007) zu finden sind, ist dennoch eine Aussage über das Verhalten der PFR möglich.

Da die Versuche in zwei Teile aufgeteilt sind, ist es sinnig, die Bewertung ebenfalls in dieser Reihenfolge vorzunehmen.

Die Betrachtung der Durchmischungsversuche in Abbildung 6 ermöglicht es, zwei verschiedene Systeme von Reaktoren zu erkennen. Zuerst fällt auf, dass beide Versuche einen ähnlichen Kurvenverlauf haben. Daraus lässt sich schließen, dass das Verhalten des Reaktors bei einer Drehzahl von 200 rpm (297 mL/min) reproduzierbar ist. Darüber hinaus kann man sehr gut das dynamische Verhalten des PFR erkennen. In den ersten zehn Minuten kommt es zur Ausbildung eines Peaks, der dann im weiteren Verlauf sehr schnell abnimmt, ehe die Werte in eine stationäre Phase übergehen. Die Entstehung des Peaks kann folgendermaßen erklärt werden:

Der Reaktor befindet sich bei der Zugabe des Impulses in einem ruhenden Zustand, in dem keine Strömung herrscht, da die Kreislaufpumpe abgeschaltet war. Wird der Tracer hinzu gegeben, ist dieser in seiner räumlichen Ausbreitung noch eingeschränkt. Erst durch das Hinzuschalten der Kreislaufpumpe wird eine Strömung innerhalb des Reaktors aufgebaut. Diese Strömung bedingt, dass der eingebrachte Tracer in Bewegung gebracht wird. Aus den Daten der Abbildung 6 kann man erkennen, dass es innerhalb der ersten zehn Minuten zu keiner starken Vermischung dieses Impulses kommt, sondern nahezu unverändert am Detektor ankommt. Wenn man sich nun die Antwortfunktion der Abbildung 4 für Rohrreaktoren vergegenwärtigt und die erhaltenen Werte mit Fachliteratur vergleicht (Hertwig et al., 2007 S. 241), kann man daraus schließen, dass die Eigenschaften des PFR für

die ersten 10 Minuten denen eines idealen Rohrreaktors ähneln. Dies gilt jedoch nur, wenn der Reaktor am Anfang des Versuchs im ruhenden Zustand war.

Bei weiterem Vergleich mit der Literatur fällt auf, dass die Impulsantwort der Abbildung 6 stark der Impulsantwort eines Rohrreaktors mit Totvolumen ähnelt (Hertwig et al., 2007 S. 256). Diese Eigenschaft ist zu erwarten, da der Innenraum des Reaktors mit Kies gefüllt ist. Die Durchmischung des Reaktors mittels der Kreislaufpumpe erreicht nicht alle Gebiete innerhalb des Reaktors. Die im System liegenden Steine fungieren als Schikane und beeinflussen das strömungstechnische Verhalten des Systems. Beim Durchfluss durch den Reaktor ist es dem Wasser nicht möglich, alle Bereiche homogen zu durchfließen. Dadurch verbleiben einige Volumenelemente innerhalb des Reaktors, die erst nach und nach wieder aus dem Reaktor fließen. Je höher die Plateaubene der Impulsantwortfunktion ist, desto größer ist das Totvolumen des Reaktors.

Bei der weiteren Betrachtung der Daten aus Abbildung 6 kommt es wieder zu einer Veränderung des strömungstechnischen Verhaltens. Man erkennt, dass die Extinktion mit fortlaufender Zeit abnimmt. Da man die Masse des Tracers innerhalb des Reaktors als konstant annehmen kann (aufgenommene Menge durch Pflanzen kann vernachlässigt werden), bedeutet die Abnahme der Extinktion eine Vermischung des Tracers. Diese Vermischung erreicht nach ca. 60 Minuten einen konstanten Wert. Wenn man dieses Verhalten wieder mit der Literatur (Hertwig et al., 2007) vergleicht, erkennt man, dass sich das Verhalten nun einem Rührkesselreaktor annähert.

Doch durch die reine visuelle Auswertung der Daten der Abbildung 6 ist eine genaue Zuordnung dieses Bereichs zu einem Rohr- oder Rührkesselreaktor nur bedingt möglich. Wenn man sich aber das Verhalten des Reaktors für die Verweilzeitversuche vergegenwärtigt, kann man sagen, dass sich der Reaktor in dieser Periode in einer Transitphase befindet. Denn die Daten der Verweilzeitversuche suggerieren das Verhalten von Rührkesselreaktoren.

In der Literatur (Hertwig et al., 2007 S. 240) wird beschrieben, dass sich die Impulsantwortfunktion eines Rührkesselreaktors am besten mit einer negativen e-Funktion beschreiben lässt. Die in Tabelle 5 aufgeführten Regressionskurven beschreiben alle eine negative e-Funktion und weisen dazu noch einen Bestimmtheitskoeffizienten von  $R^2 \geq 0,978$  auf. Das heißt, dass diese Funktion die vorgefundenen Werte sehr gut beschreibt und eine ausreichend hohe Genauigkeit vorliegt, um einen Koeffizientenvergleich zu ermöglichen. Auch die durch die Interpolation eingebrachten Fehler können als ausreichend klein beschrieben werden, da sie den Kurvenverlauf gut ergänzen (vgl. Abb. 7).

Die Regression der Verweilzeiten ermöglicht mittels des Koeffizientenvergleichs, die mittleren Verweilzeiten des Reaktors bei einer Pumprate von 32 rpm (= 50 mL/min) zu berechnen. Gemäß der Gleichung 2.4.2, 2.4.3 und 2.4.4 kann man aus dem Exponenten  $\theta$  und einer bestimmten Zeit, die dazu gehörige mittlere Verweilzeit berechnen. Diese Ergebnisse wurden in Tabelle 5 zusammenge-

fasst. Aus dieser Tabelle ist ersichtlich, dass alle drei Verweilzeitversuche eine ähnliche mittlere Verweilzeit von ca. fünf Tagen aufweisen. Wenn man diesen Wert mit den theoretischen Werten vergleicht, so erkennt man, dass die Abweichung zwischen 3% und 6% zum theoretischen Wert liegt. Diese starke Konsistenz mit der Theorie bestärkt, dass das Verhalten der PFR während der Verweilzeitversuche am besten als ein Rührkesselreaktor verstanden werden kann. Diese Aussage ist jedoch nur für Betriebsweisen gültig, die eine Pumprate von 32 rpm (= 50 mL/min) aufweisen.

Auch beim Vergleich mit der Literatur (Kappelmeyer et al., 2001) sieht man, dass das dortige beschriebene Verhalten zwischen den beiden Idealen eines Rühr-, bzw. Rohrkesel pendelt. Die Eigenschaften werden vor allem durch die gewählte Kreislaufpumprate und dem Kreislaufverhältnis ( $V_{\text{circ}}/V_{\text{zu}}$ ) beeinflusst.

Der Reaktor wies am Anfang ein Rohrreaktorverhalten auf, da der Versuch von einem ruhenden System ausging. Solange das System noch keinen stationären Strömungszustand erreicht hat, sind die Eigenschaften eher dem Rohrreakortyp zu zuschreiben. Sobald sich ein stationärer Zustand innerhalb der Reaktors ausgebildet hat, ähneln die Eigenschaften eher einem Rührreaktor.

Die Dynamik dieses Systems ist also im hohen Maße von dem Parameter der Kreislaufpumprate abhängig und hat bei stationärer Betriebsweise Eigenschaften vom Typ Rührreaktor.

## 4.2 Benzoatkonzentrationsschwankungen

Die Benzoatkonzentrationsschwankungen des Tagesverlaufs können durch unterschiedliche Einflüsse ausgelöst werden. So ist eine Einflussgröße das einfallende Sonnenlicht und damit verbunden der Lichtfluss. Aber auch andere Einflussgrößen, wie zum Beispiel der Eintrag von Sauerstoff durch das Aerenchym und eventuelle unterschiedliche Zusammensetzungen der Mikroorganismen können einen entscheidenden Einfluss auf die Benzoatkonzentration haben.

Um zu verstehen, wie es zu den Schwankungen der Benzoatkonzentration kommt, ist es wichtig zu wissen, auf welchen Wegen Benzoat abgebaut werden kann. Benzoat kann sowohl anaerob als auch aerob abgebaut werden. In komplexen Systemen überwiegt der aerobe Abbau, da dieser energetisch gesehen deutlich ergiebiger ist als der anaerobe Umsatz. Es gibt 3 Hauptstoffwechselwege für den anaeroben Abbau von Monoaromaten, wobei nur der Benzoyl-Coa Pathway mit Benzoat als Primärmetaboliten beginnt. Die anderen beiden Abbauwege sind der Resorcinol-Weg und Phloroglucinol-Weg (Schink, et al., 2000). Der aerobe Abbau von Benzoat geschieht ebenfalls über unterschiedliche Wege, in den grundsätzlich Mono-, bzw. Dioxygenasen involviert sind (Gibson et al., 2000). In den aeroben Stoffwechselwegen gehören Catechol, Protocatechunsäure und Gentisat zu den Schlüsselintermediaten (Schink et al., 2000).

Wie bereits beschrieben, gibt es keine eindeutige Tendenz der Benzoatkonzentrationsveränderungen in Bezug auf die Tag- und Nachtwechsel. Unabhängig von der Tageszeit an der man die Messreihe ausführte, kam es zu einer Abnahme der Konzentration während des Messverlaufs.

Generell kann gesagt werden, dass ein Großteil des zugeführten Benzoats (0,76 mM) umgesetzt wird. In der Mehrzahl der vorgefundenen Daten liegt die Konzentration von Benzoat im Bereich von 0,3  $\mu\text{M}$  bis 1  $\mu\text{M}$ . Das entspricht einer Entfernungsrate von über 99% und liegt somit im Bereich der Entfernungsraten ähnlicher Systeme (Zachritz et al., 1996).

Die oben gezeigten Daten geben zwar keine eindeutigen Hinweise darauf, ob es Benzoatschwankungen während des Tagesverlaufs gibt, jedoch kann man mittels der Abbaukinetik von Benzoat erkennen, wie adaptiv das System auf hohe Konzentration dieses Moleküls reagiert. Da diese Bachelorarbeit im Rahmen eines  $^{13}\text{C}$ -Projekts erarbeitet wurde, fungierte dieser Versuch auch als Grundlage für weitere  $^{13}\text{C}$ -Untersuchungen. Mit der Abbaukinetik sollte bestimmt werden, wie schnell die Mikroorganismen  $^{13}\text{C}$  in ihre Biomasse einbauen. Dies ist im Hinblick auf später geplante proteomische Analysen wichtig, um optimale Zeitpunkte für die Probennahme zu bestimmen.

Abbildung 9 verdeutlicht, dass die Konzentration von Benzoat nahezu linear abnimmt. Bereits nach 24 h Stunden hat sich die Konzentration um das 5-fache (80%) verringert. Dazu kommt, dass bereits nach der Mischphase weniger als die Hälfte des Benzoats gefunden wurde. Der Vergleich mit der Verweilzeitkurve spricht dafür, dass das Benzoat schneller abgebaut wird, als dass es ausgewaschen wird. Die schnelle Abbaugeschwindigkeit von Benzoat kann nur auf biologischem Wege geschehen. Aus den Daten geht nicht hervor, ob Aerobier oder Anaerobier stärker an der Umsetzung beteiligt sind. Vermutlich tragen beide Stoffwechselwege immens zu der schnellen Umsetzung bei.

Verglichen mit den anderen Werten ist eine Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  noch deutlich über dem Durchschnitt der Benzoatkonzentrationen in den Reaktoren. Würde man noch einige Stunden, bzw. einen weiteren Tag warten, so wäre die Konzentration vermutlich im unteren mikromolaren Bereich anzutreffen und wäre somit wieder auf dem Ausgangsniveau.

Aus diesen Daten kann man wertvolle Aussagen für das weitere Vorgehen des Projekts ziehen. Es wurde bereits ein  $^{13}\text{C}$ -Einbauversuch durchgeführt, dessen Ergebnisse aber keinen Einbau aufwiesen. Ein Fehler könnte sein, dass die Proben zu schnell genommen wurden, so dass die Mikroorganismen noch nicht genügend  $^{13}\text{C}$  eingebaut hatten. Schließlich wird diese C-Quelle von einer Vielzahl an Mikroorganismen metabolisiert, wie die gefundenen Ordnungen der Bakterien zeigen (s. u.). Damit diese genügend Zeit haben, die C-Quelle einzubauen, sollte man nicht nur innerhalb der ersten 24 h Proben nehmen. Die Daten zeigen, dass das  $^{13}\text{C}$  nach 24 h noch nicht komplett abgebaut wurde. Würde man auch Proben nach 24 h nehmen, so wäre die Chance einen Einbau zu detektieren vermutlich größer.

Die Daten zeigen aber auch, dass die Mikroorganismen die Kohlenstoffquelle insgesamt schnell metabolisieren können. Diese Daten stimmen mit Angaben aus der Literatur gut überein. Ähnlich betriebene Systeme zeigten, dass bereits nach 24 h über 99 % der eingeführten monoaromatischen Schadstoffe umgesetzt wurden (Zachritz et al., 1996).

Die Korrelation der Tageslichtintensität und der Benzoatschwankung ist nur von ungenügender Aussagekraft. Die Werte suggerieren keine, bzw. geringe Verbindung dieser beiden Parameter. Dass kein Zusammenhang gefunden wurde, bedeutet jedoch nicht, dass diese nicht vorhanden sind. Voruntersuchungen ergaben bereits, dass es zu deutlichen Redoxpotentialunterschieden durch das Tageslicht kommt (Nikolausz et al., 2008). Dass diese Effekte nicht detektiert werden können, liegt vermutlich an der nicht ausreichenden Sensitivität der Aufarbeitung. Eine Verbesserung der Aufarbeitung, z.B. durch Derivatisierung, könnte die Sensitivität verbessern.

Die hohe Umsetzung des Benzoats könnte aber auch damit erklärt werden, dass der Aromat bereits durch die Einbringung von Sauerstoff, in Form der Carboxylgruppe, aktiviert wurde (leichterer Abbau möglich). Würde man diese Schwankungsuntersuchungen mit Benzol anstelle von Benzoat machen, dann würde man vermutlich Fluktuationen der Konzentrationen im Tagesverlauf detektieren, denn der Benzolabbau ist abhängig vom Sauerstoffvorkommen. Es gibt zwar Hinweise, dass Benzol auch unter anaeroben Bedingungen abgebaut werden kann (Kazumi et al., 1997), jedoch ist die Anzahl der aerob abbauenden Mikroorganismen deutlich größer. Dazu kommt, dass die Stoffwechselwege für den anaeroben Abbau noch nicht vollständig aufgeklärt wurden (Vogt et al., 2011).

### 4.3 Ammonium- und Nitritwerte

Im Gegensatz zu den Benzoatkonzentrationen zeigen die Werte der Ammonium- und Nitritkonzentrationen eine Korrelation mit dem Tageslicht. Die Werte in Abbildung 10 und 11 verdeutlichen sehr gut den chemischen Zusammenhang von Ammonium und Nitrit. Die Ammoniumwerte sind für Reaktor 2 höher als Reaktor 1, dafür sind die Nitritwerte von Reaktor 1 höher als die von Reaktor 2. Dazu kommt, dass Ammonium in Reaktor 2 nur eine Entfernungsrate von knapp 40 % erfährt, wohingegen Ammonium in Reaktor 1 zu 80 % umgesetzt wird. Das zeigt sehr gut, dass die vorhandenen Ionen von  $\text{NH}_4^+$  zu  $\text{NO}_2^-$  oxidiert werden: Ein Prozess, der nur unter aeroben Bedingungen ablaufen kann.

In Abbildung 10 sieht man, dass die Konzentration von Ammonium in Reaktor 1 gegen Abend zunimmt, wohingegen sie während des Tages niedriger ist. Abbildung 11 zeigt hingegen ein gegenläufiges Verhalten. Die Werte der Nitriten sind während des Tages höher und sie nehmen gegen Abend ab. Das deutet darauf hin, dass durch das Fehlen der Sonneneinstrahlung der Sauerstofftransport durch die Pflanzen in den Reaktor reduziert wird. Mit dem Erliegen der Sauerstoffvorkommen wird auch die Oxidation von Ammonium reduziert, wodurch es zur Akkumulation kommt. Diese Daten

geben also einen Hinweis darauf, dass sich das Milieu um die Wurzel herum im Tages/Nacht-Zyklus verändert. Durch diesen ständigen Wechsel von aeroben und anaeroben Bedingungen können sich sowohl aerobe als auch anaerobe Nischen ausbilden, die dann von den jeweiligen Mikroorganismen besiedelt werden (Nikolausz et al., 2008; Kuschik et al., 2008). Es ist auffällig, dass man keine Ammoniumionen in Reaktor 3 dafür aber Nitritionen finden kann. Es scheint als würden alle vorhandenen Ammoniumionen oxidiert werden. Wenn man sich die Werte der Transevaporation vor Augen führt, kann man erkennen, dass die Pflanzen des Reaktors 3 eine höhere Aktivität aufweisen und somit mehr Sauerstoff transportieren. Dadurch kann es sein, dass die gesamte Menge an Ammonium oxidiert wird. Jedoch wird dieser Reaktor auch mit weniger Stickstoff beladen, das heißt, dass er generell weniger Sauerstoff benötigt, um die gesamte Menge Ammonium zu oxidieren. Bei der Betrachtung der Konzentrationen der Nitritionen in R1 und R3 fällt auf, dass die gefundenen Werte im selben Bereich liegen. Die nitritverarbeitenden Organismen scheinen in einem Gleichgewicht zu leben, in dem sie es nicht schaffen, das gesamte Nitrit zu nutzen. Das Fehlen der Nitrationen deutet darauf hin, dass sie sehr schnell fixiert und metabolisiert werden. Die Mikroorganismen, die diesen Elektronenakzeptor nutzen, scheinen in einer großen Konkurrenz zueinander zu leben.

#### 4.4 Mikrobielle Diversität

Bisher war es schwierig, genaue Aussagen über die mikrobielle Diversität innerhalb von Pflanzenkläranlagen zu treffen, da es keine Möglichkeit gab, genaue Aussagen über die Vielfalt der vorkommenden Bakterien zu treffen (Kuschik et al., 2008). Man konnte jedoch nitrifizierende und denitrifizierende, methanogene und methanotrophe sowie sulfurverarbeitende Bakterien mit der Rhizosphäre verschiedener aerenchymatomischen Pflanzen assoziieren (Nikolausz et al., 2008).

Die Abbildung 13 verdeutlicht, dass die vorherrschende Klasse der Archaeen den Methanomicrobia zugeordnet werden kann. Das Vorkommen von Thermoproteales und Halobacteria in diesen Reaktoren kann als unwahrscheinlich bezeichnet werden, da nicht die nötigen Umgebungsbedingungen herrschen. Viel mehr wird es sich um eine Fehlzuordnung handeln, die durch zufällige Übereinstimmung in den Datenbanken bedingt wurde. Diese Fehlallokation beruht auf den noch teilweise schlecht ausgestatteten Datenbanken. Da 99% der Bakterien nicht kultivierbar sind, ist es schwierig, Datenbanken mit deren Daten auszustatten. Mit fortschreitender Zeit wird diese Lücke aber geschlossen werden, sodass es empfehlenswert ist, gemessene Daten periodenartig neu zu suchen, um bessere Auswertungen zu bekommen (Seifert et al., 2012). Die Datenbanken sind jedoch schon mit den Informationen dieser extremophilen Mikroorganismen ausgestattet, da sie von besonderem Interesse für gewisse Gebiete sind und somit stärker untersucht wurden.

Die Ordnung der Archaeen wird vorüberwiegend von Methanosarcinales und Methanomicrobiales dominiert. Auch in den Ordnungen gibt es wieder Zuordnungen, die vermutlich auf lückenhafte Da-

tenbanken zurückzuführen sind, wie z.B. Sulfolobales / Desulfolobales, Thermoprotei und Halobacteria.

Methanosarcinales werden den acetoklastischen Archaeen zugeschrieben. Das heißt, dass sie Methan mit Acetat als Kohlenstoffquelle produzieren. Da die Reaktoren kontinuierlich mit 2,5 mM Acetat versorgt werden, ist das Vorfinden dieser Klasse nicht verwunderlich. Die Methanosarcinales sind strikte Anaerobier (Kendall et al., 2006). Die zweite große gefundene Klasse an Archaeen sind die Methanomicrobiales. Im Gegensatz zu den Methanosarcinales sind die Methanomicrobiales nicht in der Lage, Acetat zu metabolisieren. Sie nutzen molekularen Wasserstoff, um Methan zu generieren. Auch diese Mikroorganismen sind strikte Anaerobier (Garcia et al., 2006). Das Verhältnis der beiden Ordnungen in den beiden Reaktoren ist im selben Verhältnis von ca. 5 : 1 (Methanosarcinales : Methanomicrobia). Das Vorkommen dieser beiden Arten bestätigt, dass strikt anaerobe Zonen innerhalb der Reaktoren existieren. Interessant ist, dass das Verhältnis der beiden Klassen zueinander in beiden Reaktoren gleich ist, obwohl Reaktor 1 bepflanzt ist und Reaktor 2 nicht. Dies ist jedoch nur eine Tendenz, die durch weitere Messungen bestätigt werden müsste. Es zeigt aber, dass die Sauerstoffzufuhr nur kleine Gebiete innerhalb des Reaktors erreicht. Ein Großteil des Reaktors bleibt anaerob. Dieser Umstand wurde in vielen Veröffentlichungen bereits beschrieben (Kuschik et al., 2008).

Der überwiegende Anteil der gefundenen Klassen der Bakterien sind Betaproteobacterien. Zu den Betaproteobacterien gehören eine Vielzahl an Ordnungen, wie z.B. Burkholderiales, Rhodocyclales, Methylophilales und Hydrogenophilales, wobei in Reaktor 2 nur Burkholderiales und Rhodocyclales gefunden wurden. Zu der Ordnung der Rhodocyclales gehört eine Vielzahl von Mikroorganismen, wobei ein bekannter Vertreter *Thauera aromatica* ist. Dieser Mikroorganismus ist in der Lage, anaerob Monoaromaten zu metabolisieren und nutzt dafür den Benzyl-CoA-Stoffwechselweg (Heider et al., 1996). Aufgrund seiner bekannten Eigenschaften wird er häufig als Modellorganismus für den anaeroben Aromatenabbau genutzt. Ein anderer bekannter Vertreter ist *Azoarcus*. Dieser Mikroorganismus ist fakultativ anaerob und ist in der Lage, Benzoat mittels des Benzoat-CoA-Stoffwechsels zu nutzen. Bei einem Mangel an Sauerstoff nutzt er Nitrat als alternativen Elektronenakzeptor (Mohamed et al., 2001). Somit kann dieser Mikroorganismus sowohl in den aeroben als auch in den anaeroben Zonen des PFR überleben. Dazu kommt, dass dieser Mikroorganismus vermutlich eine Rolle bei dem Nichtauffinden der Nitrationen spielt.

Die Ordnung der Burkholderiales ist dafür bekannt, eine Vielfalt an aromatischen Verbindungen aerob zu metabolisieren (Pérez-Pantoja et al., 2012). Ebenfalls zu den aeroben Abbauern von Aromaten gehören die Pseudomonadales. Ein bekannter Vertreter dieser Ordnung ist *Pseudomonas putida*. Dieser Mikroorganismus wird in vielen Veröffentlichungen als Modellorganismus für den aeroben Abbau von Aromaten verwendet und ist deshalb gut untersucht (Heipieper et al., 1992). Clostridiales

sind typischerweise Vergärer von Aminosäuren. In letzter Zeit gibt es jedoch Hinweise, dass sie ebenfalls in der Lage sind, anaerob Aromaten abzubauen (Herrmann et al., 2008).

Das Verhältnis von aeroben zu anaeroben Bakterien ist ca. 1 : 3. Obwohl diese Daten aus dem unbepflanzten Reaktor 2 stammen, kann man aerob arbeitende Bakterien identifizieren. Die im Vorratstank gelöste Menge Sauerstoff scheint auszureichen, um kleine aerobe Zonen innerhalb des Reaktors zu bilden. Da keine Daten bezüglich des Reaktors 1, bzw. 3 vorliegen, kann man nicht sagen, ob in diesen Reaktoren mehr aerobe Bakterien zu finden sind. Weitere Versuche und Untersuchungen sollten diese Frage beantworten. Jedoch scheint die Sauerstoffzufuhr der Pflanzen, nicht die limitierende Eigenschaft für die Ausbildung von aeroben Zonen zu sein. Generell sieht man, dass alle gefundenen Bakterien in der Lage sind, Aromaten zu metabolisieren.

Das Vorkommen von überwiegend anaeroben Archaeen und Bakterien bestätigt, dass der Reaktor vorwiegend anaerob ist. Wie bereits beschrieben erwartet man, dass die aeroben Mikroorganismen in der Nähe der Rhizosphäre zu finden sind, wohingegen die Anaerobier in einiger Distanz zur Wurzel leben. Wenn man sich jedoch vergegenwärtigt, dass bereits in 2 mm Distanz von der Wurzel nur noch ein Bruchteil der Mikroorganismen zu finden sind (Bazin et al., 1990), verdeutlicht das, dass die aeroben Zonen nicht größer als einige hundert Mikrometer sein können, aber dennoch eine hohe Aktivität der Mikroorganismen vorweisen.

Die oben gezeigten Daten verdeutlichen sehr schön, dass die Mikrofauna hauptsächlich von Benzoatverwertern und Acetoklasten dominiert wird. Sie ermöglichen jedoch nicht zu erkennen, welche dieser Typen häufiger vorkommt. Die Anzahl der gefundenen Peptide ist sowohl bei den Archaeen als auch bei den Bakterien zu gering, um valide Aussagen darüber zu treffen.

Man sieht aber, dass die Bakterien hauptsächlich Benzoatverwerter sind, wohingegen die Archaeen Acetat verwerten. Wie von Kusch et al. (2008) prognostiziert, bilden sich Nischen aufgrund unterschiedlicher Umgebungsbedingungen aus. Zusätzlich zu der postulierten Theorie, dass sich diese aufgrund unterschiedlicher Sauerstoffvorkommen ausbilden, zeigen die Daten, dass es innerhalb der anaeroben Population ebenfalls zur Differenzierung aufgrund unterschiedlicher Kohlenstoffquellen kam. Denn sowohl die vorkommenden Archaeen als auch die Bakterien sind vorwiegend Anaerobier. Durch diesen hohen Selektionsdruck haben sich zwei Nischen entwickelt, in denen der große Anteil der Archaeen das vorkommende Acetat abbaut, wohingegen die Bakterien das Benzoat verwerten. Innerhalb der Bakterien kann man dann noch zwischen Aerobiern und Anaerobiern unterscheiden, die Benzoat abbauen können. Das Auffinden der Rhodocyclalen deutet darauf hin, dass sich die Bakterien auf die unterschiedlichen Elektronenakzeptoren spezialisiert haben, wie z.B. *Azoarcus* mit Nitrat.

Vermutlich gibt es sogar eine Veränderung der Proportionen im Tag/Nacht-Zyklus. Die Ammonium- und Nitritwerte weisen darauf hin, dass die Sauerstoffkonzentration in der Nacht abnimmt. Das



heißt, dass die Anaerobier nun weniger Konkurrenz haben. Diesen Vorteil werden sie dazu nutzen, um sich zu vermehren. Würde man eine Messreihe ausführen, die die vorkommenden Anteile von Aerobiern und Anaerobiern in der Nacht dokumentieren würde, so würde man vermutlich Unterschiede erkennen.

Man sollte beachten, dass Pilze und Protozoen in dieser Bachelorarbeit nicht berücksichtigt wurden. Pilze spielen eine eklatante Rolle im Ökosystem Boden und können eine Vielzahl an Verbindungen metabolisieren, während Protozoen als Prädatoren einen Einfluss auf die Bakterienpopulationen haben. Dazu kommt, dass sie in nahezu allen Arten von Böden zu finden sind (Giri et al., 2005). Durch Untersuchung dieses Reichs könnte die Nischenausbildung validiert werden und es käme zu einem besseren Bild der mikrobiellen Diversität.

## 5 Fazit

Die Gesamtheit der Ergebnisse zeichnet ein vielseitiges Bild und das grundlegende Ziel der Bachelorarbeit konnte erreicht werden. Die oben beschriebenen Sachverhalte legen eine gute Grundlage für weitere Versuche innerhalb dieses Projekts.

Die strömungstechnischen Eigenschaften der PFR konnten mehr als ausreichend charakterisiert und beschrieben werden, so dass weitere Versuche zum Verständnis derjenigen nicht unbedingt nötig sind. Bei der Analyse der Benzoatkonzentrationen konnte diese Bachelorarbeit nur Grundlagen schaffen. Es konnten zwar diurnale Unterschiede detektiert werden, wie man an der Fluktuation der Ammonium- und Nitritwerte sieht, jedoch geben diese kein hinreichend genaues Bild, ob eine Veränderung der Sauerstoffzufuhr eine messbare Veränderung der Benzoatkonzentrationen mit sich zieht. Die gefundenen Mikroorganismen zeigen, dass der Reaktor vorwiegend anaerob ist und nur kleine aerobe Zonen hat. Die Daten deuten darauf hin, dass Archaeen und Bakterien unterschiedliche Nischen haben. Wobei Archaeen Acetat abbauen und Bakterien Benzoat verstoffwechseln. Dazu gibt es Indizien, dass es ebenfalls zur Differenzierung aufgrund unterschiedlicher Elektronenakzeptoren kommt. Es konnte auch gezeigt werden, dass es ebenfalls zur Ausbildung aerober Zonen kommt, selbst bei fehlender Bepflanzung der Reaktoren.

Im weiteren Vorgehen sollte man sich künftig stärker auf die mikrobielle Diversität innerhalb der PFR konzentrieren und dabei vor allem auf die Unterschiede zwischen aeroben und anaeroben Mikroorganismen. Denn im Verständnis der mikrobiologischen Population liegt der Schlüssel für das Verstehen von Pflanzenkläranlagen.

## 6 Zusammenfassung

Mit dieser Bachelorarbeit sollte gezeigt werden, ob es zu Veränderungen der diurnalen Benzoatkonzentrationen und der Umgebungsbedingungen innerhalb der Rhizosphäre von Pflanzenfestbettreaktoren kommt. Dazu sollte sie die Grundlagen einer Doktorarbeit legen, für die sie das strömungstechnische Verhalten der PFR beschrieb und einen Einblick in die mikrobielle Diversität dieser PFR ermöglichte.

Die Analyse der strömungstechnischen Daten der PFR zeigten, dass die Reaktoren bei hohen Kreislaufpumpraten für einige Zeit die Eigenschaften eines Rohrreaktors annehmen und bei geringen Kreislaufpumpraten das Verhalten eines Rührreaktors haben.

Die gefundenen Werte der Ammonium- und Nitritkonzentrationen verdeutlichten, dass es diurnale Schwankungen in der Sauerstoffzufuhr gibt und dass diese Schwankungen Einfluss auf die mikrobielle Population haben kann. Die Analyse der Benzoatkonzentrationen ergab, dass 99 % des eingebrachten Benzoats unter allen Bedingungen umgesetzt wurden.

Jedoch konnte gezeigt werden, dass Archaeen und Bakterien unterschiedliche Nischen innerhalb der PFR ausnutzen und diese Nischenausbildung aufgrund der unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, bzw. Elektronenakzeptoren ausgebildet wurden. Benzoat wird vorwiegend von Bakterien abgebaut, wohingegen Acetat von Archaeen verstoffwechselt wird.

Die Bachelorarbeit konnte somit wesentliche Erkenntnisse über das Verhalten der PFR sowohl auf Makro- als auch auf Mikroebene liefern und hat Grundlagen gelegt, auf denen hin weitere Untersuchungen der mikrobiellen Population vonstatten gehen können. Sie konnte erste Indizien für die mikrobielle Diversität in der Rhizosphäre geben. Für den weiteren Verlauf sollte man sich vorwiegend auf dieses Gebiet konzentrieren, da hier noch der größte Erklärungsbedarf existiert.

## 7 Literaturverzeichnis

- Bachand, P. und Horne, A. 1998.** Denitrification in constructed free-water surface wetlands: I. Very high nitrate removal rates in a macrocosm study. *Ecological Engineering*. 1998, 14.
- Bazin, M. J., Markham, P. und Scott, E. M. 1990.** Population Dynamics and Rhizosphere Interactions. [Buchverf.] J. M. Lynch. *The Rhizosphere*. Chichester : Wiley, 1990.
- Braeckevelt, M., Kästner, M. und Kusch, P. 2011.** Removal of monochlorobenzene and perchloroethene in wetland rhizosphere models. *Engineering Life Sciences*. 2011, Bd. 11, 3.
- Deng, H., et al. 2011.** Analysis of the Metabolic Utilization of Carbon Sources and Potential Functional Diversity of the Bacterial Community in Lab-Scale Horizontal Subsurface-Flow Constructed Wetlands. *Journal of Environmental Quality*. 2011, Bd. 40.
- Garcia, J.-L., Ollivier, B. und Whitman, W. B. 2006.** The Order of Methanomicrobiales. [Buchverf.] Martin Dworkin, et al. *The Prokaryotes*. New York : Springer Science+Business Media, LLC, 2006.
- Gibson, D. T. und Parales, R. E. 2000.** Aromatic hydrocarbon dioxygenases in environmental biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2000, 11.
- Giri, B., et al. 2005.** Microbial Diversity in Soils. [Buchverf.] François Buscot und Ajit Varma. *Microorganisms in Soils: Roles in Genesis and Functions*. Heidelberg : Springer-Verlag, 2005.
- Heider, J. und Fuchs, G. 1996.** Anaerobic metabolism of aromatic compounds. *European Journal of Biochemistry*. 1996, 243.
- Heipieper, H.-J., Diefenbach, R. und Keweloh, H. 1992.** Conversion of cis Unsaturated Fatty Acids to trans, a Possible Mechanism for the Protection of Phenol-Degrading *Pseudomonas Putida* P8 from Substrate Toxicity. *Applied and Environmental Microbiology*. 1992, 6.
- Herrmann, S., et al. 2008.** Enrichment of anaerobic benzene-degrading microorganisms by in situ microcosms. *Microbiology Ecology*. 2008, Bd. 63, 1.
- Hertwig, K. und Lothar, M. 2007.** 8. Strömungstechnisch nichtideale Reaktoren. [Buchverf.] Klaus Hertwig und Martens Lothar. *Chemische Verfahrenstechnik*. München : Oldenbourg Wissenschaftsverlag GmbH, 2007.
- Jehmlich, N., et al. 2010.** Protein-based stable isotope probing. *Nature protocols*. 2010, Bd. 5, 10.
- Kadlec, R. 1995.** *A Handbook of Constructed Wetlands*. Washington DC : United States Government, 1995. 0-16-052999-9.
- Kappelmeyer, U., et al. 2001.** Planted Fixed Bed Reactor (PFR) - Eine universelle Testeinheit für bewachsene Bodenfilter. *Chemie Ingenieur Technik*. 2001, 11.
- Kazumi, J., et al. 1997.** Anaerobic Degradation of Benzene in Diverse Anoxic Environments. *Environmental Science and Technology*. 1997, Bd. 31, 3.

- Kendall, M. M. und Boone, D. R. 2006.** The Order of Methanosarcinales. [Buchverf.] Martin Dworkin, et al. *The Prokaryotes*. New York : Springer Science+Business Media, LLC, 2006.
- Kuschik, P., et al. 2008.** Pflanzenkläranlagen - Zukunftspotential und Forschungsbedarf. *Chemie Ingenieur Technik*. 2008, 12.
- Lalke-Porczyk, E. und Donderski, W. 2005.** The Role of Bacteria Growing on the Root System of the Common Reed (*Phragmites australis* [Cav.] Trin. ex Steudel) in the Metabolism of Organic Compounds. *Polish Journal of Environmental Studies*. 2005, Bd. 14, 1.
- Lottspeich, F. und Zorbach, H. 1998.** Massenspektrometrie. *Bioanalytik*. Heidelberg : Spektrum Akademischer Verlag, 1998.
- Mohamed, M. E.-S., et al. 2001.** Reinvestigation of a New Type of Aerobic Benzoate Metabolism in the Proteobacterium *Azoarcus evansii*. *Journal of Bacteriology*. 2001, 183.
- Nikolausz, M., et al. 2008.** Diurnal redox fluctuation and microbial activity in the rhizosphere wetland plants. *European Journal of Soil Biology*. 2008, 44.
- Pérez-Pantoja, D., et al. 2012.** Genomic analysis of the potential for aromatic compounds biodegradation in Burkholderiales. *Environmental Microbiology*. 2012, 14.
- Reilly, J. F., Horne, A. J. und Miller, C. D. 1998.** Nitrate removal from a drinking water supply with large free-surface constructed wetlands prior to groundwater recharge. *Ecological Engineering*. 1998, 14.
- Schink, B. und Müller, J. 2000.** Anaerobic Degradation of Phenolic Compounds. *Naturwissenschaften*. 2000, 87.
- Schneider, T. und Riedel, K. 2010.** Environmental Proteomics: Analysis of structure and function microbial communities. *Proteomics*. 2010, Bd. 10, 4.
- Schopfer, Peter und Brennicke, Axel. 2006.** Stoffwechsel von Wasser und anorganischen Ionen. *Pflanzenphysiologie*. München : Elsevier GmbH, 2006.
- Seifert, J., et al. 2012.** Protein-Based Stable Isotope Probing (Protein-SIP) in Functional Metaproteomics. *Mass Spectrometry Reviews*. 2012, 1.
- Sitte, P., et al. 1991.** Die Nährstoffe und ihr Umsatz in der Pflanze. [Buchverf.] Peter Sitte, et al. *Strasburger Lehrbuch der Botanik*. Stuttgart : Gustav Fischer Verlag, 1991.
- Staak, A. 2008.** Umweltforschungszentrum Leipzig. [www.ufz.de](http://www.ufz.de). [Online] 14. 05 2008. [Zitat vom: 30. 06 2006.] <http://www.ufz.de/index.php?de=2540>.
- Stottmeister, U., et al. 2000.** Effects of plants and microorganisms in constructed wetlands. *Biotechnology Advances*. 2000, 22.
- Taubert, M., et al. 2011.** Exploring the limits of robust detection of incorporation of <sup>13</sup>C by mass spectrometry in protein-based stable isotope probing (Protein-SIP). *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2011, 401.

**Taubert, M., et al. 2011.** Time resolved protein-based stable isotope probing (Protein-SIP) analysis allows quantification of induced proteins in substrate shift experiments. *Proteomics*. 2011, 11.

**Vogt, C., Kleinsteuber, S. und Richnow, H. H. 2011.** Anaerobic benzene degradation by bacteria. *Microbial Biotechnology*. 2011, Bd. 4, 6.

**Wissing, F. 1995.** *Wasserreinigung mit Pflanzen*. Stuttgart : Verlag Eugen Ulmer, 1995.  
9783800132119.

**Zachritz, W. H., Lundie, L. L. und Wang, H. 1996.** Benzoic acid degradation by small, pilot-scale artificial wetlands filter (AWF) systems. *Ecological Engineering*. 1996, 7.

## 8 Anhang

### Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Querschnitt eines Rohres von <i>Juncus effusus</i> . Man kann deutlich die Hohlräume erkennen, die das Aerenchym ausmachen. Quelle: private Korrespondenz	7
Abbildung 2 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Betriebsweisen einer Pflanzenkläranlage. A) Teich mit Wasserkultursystem und horizontalem Wasserfluss. B) Hydrobotanisches System mit horizontaler Oberflächenströmung, bei der die Strömung überhalb des Bodens ist. C) Hydrobotanisches System mit horizontaler Flussrichtung, bei der das Wasser unterhalb des Bodens fließt. D) Bodensystem mit vertikaler Flussrichtung Quelle: (Stottmeister et al., 2000)	8
Abbildung 3 Schematische Darstellung des PFR. Es handelt sich hierbei um einen Viertelschnitt des Reaktors. Am Reaktor werden konstant pH, Redox-Potential (rH) und O <sub>2</sub> -Konzentrationen gemessen. Die Reaktoren haben eine hydraulische Verweilzeit von 5 bis 6 Tagen und sind mit den Pflanzen der Art <i>Juncus effusus</i> bepflanzt.	14
Abbildung 4 Darstellung der verschiedenen Antwortfunktion. Links: Rührkesselreaktor und rechts: Rohreaktor. Die linke Abbildung nutzt anstatt der Zeit, die normierte Zeit in Bezug auf die Verweilzeit (vgl. Formel 2.4.3). Quelle: (Hertwig et al., 2007)	16
Abbildung 5 Schematische Darstellung des ESI-MS Prinzips. Die Analyten werden über den Taylorkonus zu einem filamenartigen Strom geleitet, bis sie aufgrund zu großer Ladungsdichte explodieren (coulomb explosion) und danach in die Gasphase der Ionisierungsquelle gelangen. Von dort werden sie Richtung Massenspektrometer gezogen, wo sie dann gemessen werden. Quelle:(University of Bristol <a href="http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/esi-mechanism.gif">http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/esi-mechanism.gif</a> )	19
Abbildung 6 Normierter Durchmischungsversuch eines bepflanzten Festbettreaktor bei einer Drehzahl von 200 rpm (297 mL/min). Die Normierung ist auf den höchsten gemessenen Wert bezogen. Es wurde eine Einfachmessung durchgeführt.	22
Abbildung 7 Darstellung der verschiedenen normierten Verweilzeitversuche. Die Normierung bezieht sich auf den ersten gemessenen Wert der Verweilzeitversuche. Aufgrund von fehlerhaftem Verhalten des Spektrometers mussten bei VWZ 2 und 3 mehrere Daten interpoliert werden. Für die VWZ 2 wurden die interpolierten Daten mit hellblau gekennzeichnet und für VWZ 3 mit lila. $\Theta$ beschreibt das Verhältnis der Zeit zur mittleren Verweilzeit (vgl. Formel 2.4.2). Die Pumprate betrug 32 rpm (50 mL/min).	23
Abbildung 8 Darstellung des Verlaufs der Benzoatkonzentrationen. Die Fehlerbalken wurden mittels einer Dreifachmessung einer Probe von jedem Reaktor. Die Messreihe stellt den Nacht/Tag-Wechsel dar. Auf der Sekundärachse wird der gemessene Globalstrahlung dargestellt.	25
Abbildung 9 Darstellung der Benzoatkinetik nach Injektion von 346 $\mu$ M Natriumbenzoat (Endkonzentration im Reaktor). Vor der ersten Probennahme wurde die Kreislaufpumpe für 1 h auf 200 rpm (297 mL/min) erhöht. Die rote Linie zeigt die Abnahme der Extinktion während des Verweilzeitversuchs.	25
Abbildung 10 Darstellung der Ammoniumkonzentration. Reaktor 3 wurde nicht gemessen. Die Probe um 22 Uhr bei R2 ist durch ein fehlerhaftes Handling nicht gemessen worden. Es wurde eine Einfachmessung durchgeführt (Fehlerbalken vom Datenblatt). Auf der Sekundärachse ist der Globalstrahlung zu sehen.	27
Abbildung 11 Darstellung der unterschiedlichen Nitritkonzentrationen gegenüber dem einfallenden Tageslicht. Die Proben wurden während eines Tag/Nachtzyklus genommen und als Einfachmessung gemessen. Reaktor 3 wurde nicht gemessen. Die Fehlerbalken wurde den Datenblättern entnommen.	27
Abbildung 12 Darstellung der unterschiedlichen Nitritkonzentrationen. Es handelt sich um eine Tagesmessreihe. Die Fehlerbalkentoleranz wurde den Datenblättern entnommen.	28
Abbildung 13 Übersicht der Diversität der vorkommenden Klassen von Archaeen in Reaktor 1 und Reaktor 2. Die Daten wurden mittels einer Datenbanksuche erhalten und dann der Phylogenie nach analysiert und zusammengefasst. Anzahl der Messwerte für links n=59 und für rechts m= 79.	30
Abbildung 14 Übersicht der Diversitäten der vorkommenden Ordnungen von Archaeen von R1 und R2. Die erhaltenen Daten wurden mit einer Datenbanksuche analysiert und der Phylogenie nach strukturiert. Die Anzahl der Messwerte ist links n=56 und rechts m=79.	30

Abbildung 15 Darstellung der vorkommenden Klassen von Bakterien innerhalb des Reaktor 2. Die Daten wurden mittels einer Datenbanksuche erhalten und ihrer Phylogenie nach strukturiert. Die Anzahl der Messwerte betrug $n=155$ .	32
Abbildung 16 Darstellung der vorkommenden Ordnungen von Bakterien in Reaktor 2. Die Daten wurden mittels einer Datenbanksuche erhalten und ihrer Phylogenie nach strukturiert. Die Anzahl der Messwerte betrug $n=148$ .	32
Abbildung 17 Kalibrierkurve von Benzoat mit linearer Regression, Regressionsformel und Bestimmtheitsmaß. Gemessen in einem Bereich von 0 mM bis 1 mM. Die Messung wurde auf einer GC-MS ausgeführt.	49
Abbildung 18 Kalibrierkuve von Uranine mit linearer Regression, Regressionsformel und Bestimmtheitsmaß. Gemessen am Spektrometer ATI Unicam in einem Bereich von 0 bis 11 mg/l.	49
Abbildung 19 Arbeitsanweisung für den Ammoniumtest	50
Abbildung 20 Arbeitsanweisung für den Nitrittest	51
Abbildung 21 Arbeitsanweisung für den Nitratstest	52
Abbildung 22 schematische Darstellung des Fließbildes der PFR.	53

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Darstellung der genutzten Geräte während des Schreibens der Bachelorarbeit	10
Tabelle 2 Übersicht der genutzten Chemikalien für die Zufütterung der Reaktoren	11
Tabelle 3 Übersicht der genutzten Chemikalien für den Aufschluss der Reaktorproben	11
Tabelle 4 Darstellung der unterschiedlichen Chemikalienkonzentrationen	12
Tabelle 5 Übersicht der ermittelten mittleren Verweilzeiten	24
Tabelle 6 Darstellung der unterschiedlichen Evaporationsdaten von Reaktor 1,2 und 3.	29

## Abkürzungsverzeichnis

<i>rpm</i>	Rounds per minute (Drehzahl)
<i>PFR</i>	Planted Fixed Bed Reactor (Pflanzenfestbettreaktor)
<i>EMV</i>	Electron Multiplier Voltage
<i>R1/2/3</i>	Reaktor 1, 2 oder 3
<i>VWZ</i>	Verweilzeitversuch
<i>ACN</i>	Acetonitril
<i>dest. Wasser</i>	destilliertes Wasser



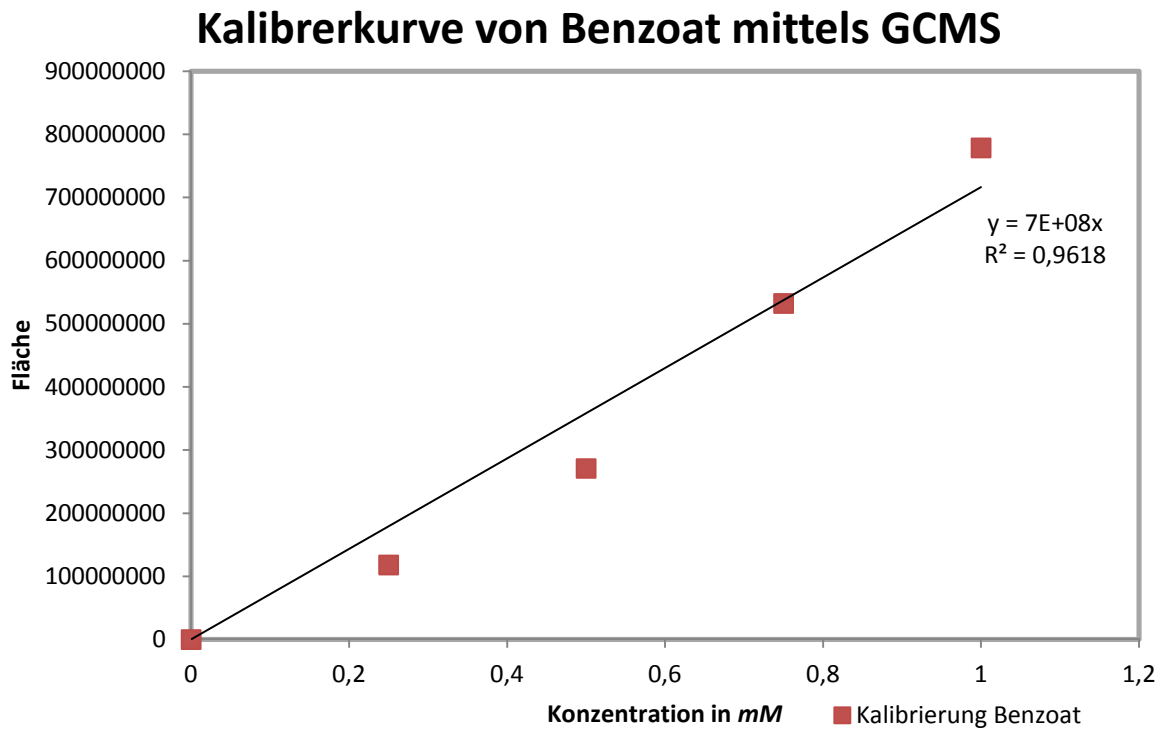


Abbildung 17 Kalibrierkurve von Benzoat mit linearer Regression, Regressionsformel und Bestimmtheitsmaß. Gemessen in einem Bereich von 0 mM bis 1 mM. Die Messung wurde auf einer GC-MS ausgeführt.

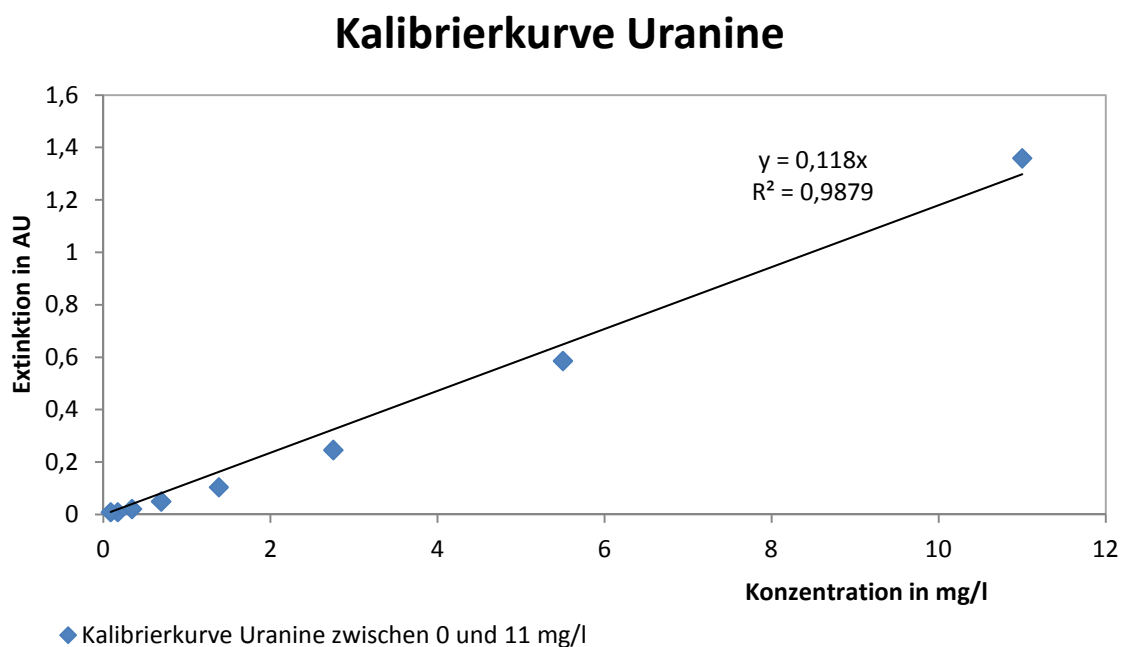


Abbildung 18 Kalibrierkurve von Uranine mit linearer Regression, Regressionsformel und Bestimmtheitsmaß. Gemessen am Spektrometer ATI Unicam in einem Bereich von 0 bis 11 mg/l.



1.00683.0001

## Ammonium Test



## 1. Method

Ammonium nitrogen (NH<sub>4</sub>-N) occurs partly in the form of ammonium ions and partly as ammonia. A pH-dependent equilibrium exists between the two forms. In strongly alkaline solution ammonium nitrogen is present almost entirely as ammonia, which reacts with hypochlorite ions to form monochloramine. This in turn reacts with a substituted phenol to form a blue indophenol derivative that is determined photometrically.

The method is analogous to EPA 350.1, APHA 4500-NH<sub>3</sub> D, ISO 7150/1, and DIN 38406 E5.

## 2. Measuring range and number of determinations

Cell mm	Measuring range		Number of determinations
	mg/l NH <sub>4</sub> -N	mg/l NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	
10	2.0 - 75.0	2.6 - 96.6	100
	5 - 150	6 - 193	

For programming data for selected photometers / spectrophotometers see the website.

## 3. Applications

This test measures both ammonium ions and dissolved ammonia.

## Sample material:

Groundwater and surface water, seawater  
Drinking water  
Wastewater  
Nutrient solutions for fertilization  
Soils and food after appropriate sample pretreatment

## 4. Influence of foreign substances

This was checked in solutions containing 40 and 0 mg/l NH<sub>4</sub>-N. The determination is not yet interfered with up to the concentrations of foreign substances given in the table.

Concentrations of foreign substances in mg/l or %			
Al <sup>3+</sup>	1000	Mn <sup>2+</sup>	100
Ca <sup>2+</sup>	1000	Ni <sup>2+</sup>	250
Cd <sup>2+</sup>	1000	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	1000
CN <sup>-</sup>	100	Pb <sup>2+</sup>	1000
Cr <sup>3+</sup>	100	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1000
Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>	1000	S <sup>2-</sup>	50
Cu <sup>2+</sup>	1000	SiO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	1000
F <sup>-</sup>	1000	Zn <sup>2+</sup>	500
Fe <sup>2+</sup>	25		
Hg <sup>2+</sup>	500		
Mg <sup>2+</sup>	500		
		EDTA	1000
		Primary amines <sup>1)</sup>	0
		Secondary amines <sup>2)</sup>	250
		Aminophenols	10
		Aniline	50
		Triethanolamine	1000
		Surfactants <sup>3)</sup>	1000
		Na-acetate	10 %
		NaCl	20 %
		NaNO <sub>3</sub>	20 %
		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	20 %

Reducing agents interfere with the determination.

<sup>1)</sup> tested with methylamine

<sup>2)</sup> tested with dimethylamine

<sup>3)</sup> tested with nonionic, cationic, and anionic surfactants

## 5. Reagents and auxiliaries

Please note the warnings on the packaging materials!
The test reagents stable up to the date stated on the pack when stored closed at +15 to +25 °C.

## Package contents:

1 bottle of reagent NH<sub>4</sub>-1  
1 bottle of reagent NH<sub>4</sub>-2 (contains granulate + desiccant capsule)  
2 AutoSelectors

## Other reagents and accessories:

Merckoquant® Ammonium Test, Cat. No. 110024,  
measuring range 10 - 400 mg/l NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (8 - 310 mg/l NH<sub>4</sub>-N)  
Universal indicator strips pH 0 - 14, Cat. No. 109535  
Sodium hydroxide solution 1 mol/l TitriPUR®, Cat. No. 109137  
Sulfuric acid 0.5 mol/l TitriPUR®, Cat. No. 109072  
Spectroquant® CombiCheck 70, Cat. No. 114689  
Ammonium standard solution CRM, 6.00 mg/l NH<sub>4</sub>-N, Cat. No. 125025  
Ammonium standard solution CRM, 12.0 mg/l NH<sub>4</sub>-N, Cat. No. 125026  
Ammonium standard solution CRM, 50.0 mg/l NH<sub>4</sub>-N, Cat. No. 125027

Pipettes for pipetting volumes of 0.10, 0.20, and 5.0 ml  
Rectangular cells 10 mm (2 pcs), Cat. No. 114946

## 6. Preparation

- Analyze immediately after sampling.
- Check the ammonium content with the Merckoquant® Ammonium Test. Samples containing more than 150 mg/l NH<sub>4</sub>-N must be diluted with distilled water.
- The pH must be within the range 4 - 13. Adjust, if necessary, with sodium hydroxide solution or sulfuric acid.
- Filter turbid samples.

June 2011

## 7. Procedure

Measuring range 2.0 - 75.0 mg/l NH<sub>4</sub>-N (2.6 - 96.6 mg/l NH<sub>4</sub><sup>+</sup>):

Reagent NH <sub>4</sub> -1 (20 - 30 °C)	5,0 ml	Pipette into a test tube.
Pretreated sample (20 - 30 °C)	0,20 ml	Add with pipette and mix.
Reagent NH <sub>4</sub> -2	1 level blue microspoon (in the cap of the NH <sub>4</sub> -2 bottle)	Add and shake vigorously until the reagent is completely dissolved.

Leave to stand for 15 min (reaction time), then fill the sample into a 10-mm cell, and measure in the photometer.

Measuring range 5 - 150 mg/l NH<sub>4</sub>-N (6 - 193 mg/l NH<sub>4</sub><sup>+</sup>):

Reagent NH <sub>4</sub> -1 (20 - 30 °C)	5,0 ml	Pipette into a test tube.
Pretreated sample (20 - 30 °C)	0,10 ml	Add with pipette and mix.
Reagent NH <sub>4</sub> -2	1 level blue microspoon (in the cap of the NH <sub>4</sub> -2 bottle)	Add and shake vigorously until the reagent is completely dissolved.

Leave to stand for 15 min (reaction time), then fill the sample into a 10-mm cell, and measure in the photometer.

## Notes on the measurement:

- Due to the strong temperature dependence of the colour reaction, the temperature of the reagents should be between 20 and 30 °C.
- Certain photometers may require a blank (preparation as per measurement sample, but with distilled water instead of sample).
- For photometric measurement the cells must be clean. Wipe, if necessary, with a clean dry cloth.
- Measurement of turbid solutions yields false-high readings.
- Ammonium-free samples turn yellow on addition of reagent NH<sub>4</sub>-2.
- The pH of the measurement solution must be within the range 11.5 - 11.8.
- The colour of the measurement solution remains stable for at least 60 min after the end of the reaction time stated above.
- In the event of ammonium concentrations exceeding 2500 mg/l, other reaction products are formed and false-low readings are yielded. In such cases it is advisable to conduct a plausibility check of the measurement results by diluting the sample (1:10, 1:100).

## 8. Analytical quality assurance

recommended before each measurement series

To check the photometric measurement system (test reagent, measurement device, handling) and the mode of working, the ammonium standard solutions CRM, 6.00 mg/l NH<sub>4</sub>-N, Cat. No. 125025, 12.0 mg/l NH<sub>4</sub>-N, Cat. No. 125026, and 50.0 mg/l NH<sub>4</sub>-N, Cat. No. 125027 or Spectroquant® CombiCheck 70 can be used. Besides a standard solution with 50.0 mg/l NH<sub>4</sub>-N, CombiCheck 70 also contains an addition solution for determining sample-dependent interferences (matrix effects).

Additional notes see under [www.merck-chemicals.com/qa](http://www.merck-chemicals.com/qa).

## Characteristic quality data:

In the production control, the following data were determined in accordance with ISO 8466-1 and DIN 38402 A51:

	Measuring range mg/l NH <sub>4</sub> -N	
	2.0 - 75.0	5 - 150
Standard deviation of the method (mg/l NH <sub>4</sub> -N)	± 0.49	± 1.0
Coefficient of variation of the method (%)	± 1.3	± 1.3
Confidence interval (mg/l NH <sub>4</sub> -N)	± 1.2	± 2
Number of lots	20	20

## Characteristic data of the procedure:

	Measuring range mg/l NH <sub>4</sub> -N	
	2.0 - 75.0	5 - 150
Sensitivity: Absorbance 0.010 A corresponds to (mg/l NH <sub>4</sub> -N)	0.3	1
Accuracy of a measurement value (mg/l NH <sub>4</sub> -N)	max. ± 1.8	max. ± 4

For quality and batch certificates for Spectroquant® test kits see the website.

## 9. Notes

- Reclose the reagent bottles immediately after use.
- Rinse glassware ammonium-free with distilled water. Do not use detergent!
- Information on disposal can be obtained under the Quick Link "Waste Disposal Advice" at [www.merck-chemicals.com/test-kits](http://www.merck-chemicals.com/test-kits).

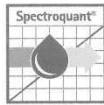
Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Germany, Tel. +49(0)6151 72-2440, Fax +49(0)6151 72-7780  
test-kits@merck-chemicals.com [www.merck-chemicals.com/photometry](http://www.merck-chemicals.com/photometry)

Abbildung 19 Arbeitsanweisung für den Ammoniumtest

7.75892.0002-xxxxxxx msp.

April 2011

1.14776.0001 / 1.14776.0002



**Nitrit-Test**



**1. Methode**

Nitrit-Ionen bilden in saurer Lösung mit Sulfanilsäure ein Diazoniumsalz, das mit N-(1-Naphthyl)-ethylendiamindihydrochlorid zu einem rotviolett Azofarbstoff reagiert. Dieser wird photometrisch bestimmt.  
**Das Verfahren ist analog EPA 354.1, APHA 4500-NO<sub>2</sub>-B und DIN EN 26 777 D10.**

**2. Messbereich und Anzahl der Bestimmungen**

Küvette mm	Messbereich		Anzahl der Bestimmungen
	mg/l NO <sub>2</sub> -N	mg/l NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	
50	0,002 - 0,200	0,007 - 0,657	335 (Art. 1.14776.0002)
20	0,010 - 0,500	0,03 - 1,64	oder
10	0,02 - 1,00	0,07 - 3,28	1000 (Art. 1.14776.0001)

Programmierdaten für ausgewählte Photometer / Spektralphotometer s. Website.

**3. Anwendungsbereich**

**Probenmaterial:**  
 Grund-, Trink- und Oberflächenwasser  
 Meerwasser  
 Abwasser  
 Lebensmittel nach entsprechender Probenvorbereitung  
 Böden nach entsprechender Probenvorbereitung

**4. Einfluss von Fremdstoffen**

Dieser wurde an Lösungen mit 0,5 bzw. 0 mg/l NO<sub>2</sub>-N überprüft. Bis zu den in der Tabelle angegebenen Fremdstoffkonzentrationen wird die Bestimmung noch nicht gestört.

Fremdstoffkonzentration in mg/l bzw. %					
Ca <sup>2+</sup>	1000	Hg <sup>2+</sup>	100	SiO <sub>2</sub> <sup>2-</sup>	1000
Cd <sup>2+</sup>	1000	Mg <sup>2+</sup>	1000	Zn <sup>2+</sup>	1000
CN <sup>-</sup>	1000	Mn <sup>2+</sup>	1000	EDTA	1000
Cr <sup>3+</sup>	100	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1000	Reduktionsmittel (Ascorbinsäure, Sulfit)	10
Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>	1	Pb <sup>2+</sup>	1000	NaCl	20 %
Cu <sup>2+</sup>	100	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1000	NaNO <sub>2</sub>	20 %
Fe <sup>2+</sup>	1	S <sup>2-</sup>	10	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	15 %

**5. Reagenzien und Hilfsmittel**

**Gefahrenkennzeichnung auf den einzelnen Bestandteilen der Packung beachten!**  
 Das Testreagenz ist - bei +15 bis +25 °C verschlossen aufbewahrt - bis zu dem auf der Packung angegebenen Datum verwendbar.

**Packungsinhalt:**  
 Reagenz NO<sub>2</sub>-1: 2 Flaschen (Art. 1.14776.0002) oder 6 Flaschen (Art. 1.14776.0001)  
 1 AutoSelector

**Weitere Reagenzien und Zubehör:**  
 Merckoquant® Nitrit-Test, Art. 110057,  
 Messbereich 0,5 - 10 mg/l NO<sub>2</sub> (0,15 - 3,0 mg/l NO<sub>2</sub>-N)  
 Universalindikatorstäbchen pH 0 - 14, Art. 109535  
 Acilit® Indikatorstäbchen pH 0 - 6,0, Art. 109531  
 Schwefelsäure 0,5 mol/l TitriPUR®, Art. 109072  
 Natronlauge 1 mol/l TitriPUR®, Art. 109137  
 Nitrit-Standardlösung CRM, 0,200 mg/l NO<sub>2</sub>-N, Art. 125041

Pipette für Pipettiervolumen 5,0 ml  
 Rechteckküvetten 10, 20 und 50 mm (je 2 Stück), Art. 114946, 114947 und 114944  
 Halbmikroküvetten 50 mm (2 Stück), Art. 173502

**6. Vorbereitung**

- Proben sofort nach der Probenahme analysieren.
- Nitrit-Gehalt überprüfen mit Merckoquant® Nitrit-Test. Proben mit mehr als 1,00 mg/l NO<sub>2</sub>-N sind mit dest. Wasser zu verdünnen.
- **pH-Wert soll im Bereich 2 - 10 liegen.** Falls erforderlich, mit Schwefelsäure einstellen.
- Trübe Proben filtrieren.

**7. Durchführung**

Vorbereitete Probe (15 - 25 °C) Reagenz NO <sub>2</sub> -1	5,0 ml 1 gestrichener blauer Mikrolöffel (im Deckel der NO <sub>2</sub> -1-Flasche)	In ein Reagenzglas pipettieren. Zugeben und <b>kräftig</b> schütteln, bis das <b>Reagenz vollständig gelöst</b> ist. <b>pH-Wert soll im Bereich 2,0 - 2,5 liegen.</b> Mit Acilit® Indikatorstäbchen prüfen. Falls erforderlich, pH mit Natronlauge bzw. Schwefelsäure einstellen.
<b>10 min stehen lassen (Reaktionszeit)</b> , dann Messprobe in Küvette füllen und im Photometer messen.		

Für die Messung in der 50-mm-Küvette müssen das Probevolumen und die Menge des Reagenzes NO<sub>2</sub>-1 verdoppelt werden. Stattdessen kann die Halbmikroküvette Art. 173502 verwendet werden.

**Hinweise zur Messung:**

- **Ggf. verlangt das verwendete Photometer eine Blindprobe** (wie Messprobe ansetzen, jedoch mit dest. Wasser anstelle der Probe).
- Zur photometrischen Messung müssen die Küvetten sauber sein. Ggf. mit einem trockenen, sauberen Tuch abwischen.
- Trübungen nach vollendeter Reaktion ergeben zu hohe Messwerte.
- pH-Wert der Messlösung soll im Bereich 2,0 - 2,5 liegen.
- Die Farbe der Messlösung bleibt nach Ablauf der o.a. Reaktionszeit mindestens 60 min stabil.

**8. Analytische Qualitätssicherung**

wird vor jeder Messserie empfohlen  
 Zur Überprüfung des photometrischen Messsystems (Testreagenz, Messvorrichtung, Handhabung) und der Arbeitsweise kann die Nitrit-Standardlösung CRM, 0,200 mg/l NO<sub>2</sub>-N, Art. 125041 verwendet werden.  
 Probenabhängige Störungen (Matrixeffekte) können durch Standardaddition ermittelt werden.  
 Zusätzliche Hinweise unter [www.merck-chemicals.com/qs](http://www.merck-chemicals.com/qs).

**Qualitätskenndaten:**

Bei der Produktionskontrolle wurden nach ISO 8466-1 und DIN 38402 A51 die folgenden Daten ermittelt (10-mm-Küvette):

Verfahrensstandardabweichung (mg/l NO <sub>2</sub> -N)	± 0,008
Verfahrensvariationskoeffizient (%)	± 1,5
Vertrauensbereich (mg/l NO <sub>2</sub> -N)	± 0,02
Anzahl Chargen	37

**Verfahrenskenndaten:**

	Messbereich mg/l NO <sub>2</sub> -N	
	0,002 - 0,200	0,02 - 1,00
Empfindlichkeit: Extinktion 0,010 E entspricht (mg/l NO <sub>2</sub> -N)	0,001	0,004
Genauigkeit eines Messwerts (mg/l NO <sub>2</sub> -N)	max. ± 0,005	max. ± 0,03

Qualitätszertifikate und Chargenzertifikate für Spectroquant® Testsätze s. Website.

**9. Hinweise**

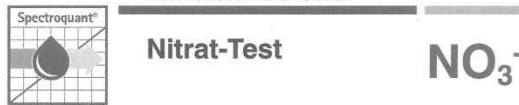
- Flasche nach Reagenzentnahme umgehend wieder verschließen.
- **Hinweise zur Entsorgung können unter dem Quick Link „Richtlinien zur Abfallentsorgung“ auf [www.merck-chemicals.com/test-kits](http://www.merck-chemicals.com/test-kits) angefordert werden.**

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Tel. +49(0)6151 72-2440, Fax +49(0)6151 72-7780  
 environmental.analysis@merck.de <http://photometrie.merck.de>

Abbildung 20 Arbeitsanweisung für den Nitrittest

7.75778.0002-6001272765 msp.

1.09713.0001 / 1.09713.0002



### 1. Methode

Nitrat-Ionen bilden in schwefel- und phosphorsaurer Lösung mit 2,6-Dimethylphenol (DMP) 4-Nitro-2,6-dimethylphenol, das photometrisch bestimmt wird. Das Verfahren ist analog DIN 38405 D9.

### 2. Messbereich und Anzahl der Bestimmungen

Küvette mm	Messbereich		Anzahl der Bestimmungen
	mg/l NO <sub>3</sub> -N	mg/l NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	
50	0,10 - 5,00	0,4 - 22,1	100 (Art. 1.09713.0001) oder
20	0,5 - 12,5	2,2 - 55,3	250 (Art. 1.09713.0002)
10	1,0 - 25,0	4,4 - 110,7	

Programmierdaten für ausgewählte Photometer / Spektralphotometer s. Website.

### 3. Anwendungsbereich

Der Test ist nicht geeignet für Wässer mit Chlorid-Gehalten über 1000 mg/l und CSB-Werten über 500 mg/l.

#### Probenmaterial:

Grund- und Oberflächenwasser  
 Quell- und Brunnenwasser  
 Mineralwasser  
 Abwasser und Brauchwasser  
 Böden und Dünger nach entsprechender Probenvorbereitung  
 Der Test ist für Meerwasser **nicht geeignet**.

### 4. Einfluss von Fremdstoffen

Dieser wurde an Lösungen mit 10 bzw. 0 mg/l NO<sub>3</sub>-N überprüft. Bis zu den in der Tabelle angegebenen Fremdstoffkonzentrationen wird die Bestimmung noch nicht gestört.

Fremdstoffkonzentration in mg/l bzw. %			
Al <sup>3+</sup>	1000	Hg <sup>2+</sup>	100
Ca <sup>2+</sup>	500	Mg <sup>2+</sup>	1000
Cd <sup>2+</sup>	250	Mn <sup>2+</sup>	1000
Cl <sup>-</sup>	1000	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	1000
CN <sup>-</sup>	100	Ni <sup>2+</sup>	500
Cr <sup>3+</sup>	500	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	5 <sup>1)</sup>
Cr <sub>2</sub> O <sub>7</sub> <sup>2-</sup>	50	Pb <sup>2+</sup>	100
Cu <sup>2+</sup>	500	PO <sub>4</sub> <sup>3-</sup>	1000
F <sup>-</sup>	1000	SiO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	500
Fe <sup>3+</sup>	100	Zn <sup>2+</sup>	1000
		Tenside <sup>2)</sup>	1000
		CSB (K-Hydrogenphthalat)	500
		Organische Stoffe (Glucose)	500
		Na-Acetat	25 %
		NaCl	0,2 %
		Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	25 %

<sup>1)</sup> Bei höheren Konzentrationen Nitrit-Ionen gemäß Abschnitt 6 beseitigen.

<sup>2)</sup> getestet mit nichtionischen, kationischen und anionischen Tensiden

### 5. Reagenzien und Hilfsmittel

#### Gefahrenkennzeichnung auf den einzelnen Bestandteilen der Packung beachten!

Die Testreagenzien sind - bei +15 bis +25 °C verschlossen aufbewahrt - bis zu dem auf der Packung angegebenen Datum verwendbar.

#### Packungsinhalt:

1 Flasche Reagenz NO<sub>3</sub>-1  
 1 Flasche Reagenz NO<sub>3</sub>-2  
 1 AutoSelector

#### Weitere Reagenzien und Zubehör:

Merckoquant® Chlorid-Test, Art. 110079,  
 Messbereich 500 - >3000 mg/l Cl<sup>-</sup>  
 Merckoquant® Nitrit-Test, Art. 110007,  
 Messbereich 2 - 80 mg/l NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (0,6 - 24 mg/l NO<sub>2</sub>-N)  
 Amidoschwefelsäure zur Analyse EMSURE®, Art. 100103  
 Acilit® Indikatorstäbchen pH 0 - 6,0, Art. 109531  
 Schwefelsäure 25 % zur Analyse EMSURE®, Art. 100716  
 Merckoquant® Nitrat-Test, Art. 110020,  
 Messbereich 10 - 500 mg/l NO<sub>3</sub><sup>-</sup> (2,3 - 113 mg/l NO<sub>3</sub>-N)  
 Spectroquant® CombiCheck 20, Art. 114675  
 Nitrat-Standardlösung CRM, 0,500 mg/l NO<sub>3</sub>-N, Art. 125036  
 Nitrat-Standardlösung CRM, 2,50 mg/l NO<sub>3</sub>-N, Art. 125037  
 Nitrat-Standardlösung CRM, 15,0 mg/l NO<sub>3</sub>-N, Art. 125038  
 Leerküvetten 16 mm mit Schraubkappe (25 Stück), Art. 114724  
 Pipetten für Pipettierolumina 0,50 und 4,0 ml  
 Rechteckküvetten 10, 20 und 50 mm (je 2 Stück), Art. 114946, 114947 und 114944  
 Halbmikroküvetten 50 mm (2 Stück), Art. 173502

### 6. Vorbereitung

- Proben sofort nach der Probenahme analysieren.
- Chlorid-Gehalt überprüfen mit Merckoquant® Chlorid-Test. Proben mit mehr als 1000 mg/l Cl<sup>-</sup> sind mit dest. Wasser zu verdünnen.
- Nitrit-Gehalt überprüfen mit Merckoquant® Nitrit-Test. Falls erforderlich, störende Nitrit-Ionen beseitigen (angegebene Mengen gelten für Nitrit-Gehalte bis 50 mg/l); 10 ml Probe mit ca. 50 mg Amidoschwefelsäure versetzen und lösen. **pH-Wert dieser Lösung soll im Bereich 1 - 3 liegen.** Falls erforderlich, mit Schwefelsäure einstellen.
- Nitrat-Gehalt überprüfen mit Merckoquant® Nitrat-Test. Proben mit mehr als 25,0 mg/l NO<sub>3</sub>-N (110,7 mg/l NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) sind mit dest. Wasser zu verdünnen.
- Trübe Proben filtrieren.

### 7. Durchführung

Reagenz NO <sub>3</sub> -1	4,0 ml	In ein trockenes Reagenzglas <sup>1)</sup> pipettieren.
Vorbereitete Probe (5 - 25 °C)	0,50 ml	Mit Pipette zugeben, <b>nicht mischen!</b>
Reagenz NO <sub>3</sub> -2	0,50 ml	Mit Pipette zugeben ( <b>Schutzbrille! Mischung wird heiß!</b> ) und mischen, dabei Reagenzglas <b>nur im oberen Bereich</b> anfassen!
<b>Heiße Reaktionslösung 10 min stehen lassen (Reaktionszeit). Nicht mit kaltem Wasser kühlen!</b>		
Messprobe in Rechteckküvette füllen und im Photometer messen.		

<sup>1)</sup> Es werden Leerküvetten Art. 114724 empfohlen, die mit Schraubkappen verschließbar sind. Damit ist ein gefahrloses Mischen möglich.

Für die Messung in der **50-mm-Küvette** müssen das Probevolumen und die Mengen der Reagenzien NO<sub>3</sub>-1 und NO<sub>3</sub>-2 verdoppelt werden. Stattdessen kann die Halbmikroküvette Art. 173502 verwendet werden.

#### Hinweise zur Messung:

- **Ggf. verlangt das verwendete Photometer eine Blindprobe** (wie Messprobe ansetzen, jedoch mit dest. Wasser anstelle der Probe).
- Zur photometrischen Messung müssen die Küvetten sauber sein. Ggf. mit einem trockenen, sauberen Tuch abwischen.
- Trübungen nach vollendeter Reaktion ergeben zu hohe Messwerte.
- Die Farbe der Messlösung bleibt nach Ablauf der o.a. Reaktionszeit 30 min stabil. (Nach 60 min hat der Messwert um 5% zugenommen.)

### 8. Analytische Qualitätssicherung

wird vor jeder Messserie empfohlen

Zur Überprüfung des photometrischen Messsystems (Testreagenz, Messvorrichtung, Handhabung) und der Arbeitsweise können die Nitrat-Standardlösungen CRM, 0,500 mg/l NO<sub>3</sub>-N, Art. 125036, 2,50 mg/l NO<sub>3</sub>-N, Art. 125037 und 15,0 mg/l NO<sub>3</sub>-N, Art. 125038 bzw. Spectroquant® CombiCheck 20 verwendet werden. CombiCheck 20 enthält außer einer **Standardlösung** mit 9,0 mg/l NO<sub>3</sub>-N zusätzlich noch eine **Additionslösung** zur Ermittlung von probenabhängigen Störungen (Matrixeffekte).

Zusätzliche Hinweise unter [www.merck-chemicals.com/qs](http://www.merck-chemicals.com/qs).

#### Qualitätskenndaten:

Bei der Produktionskontrolle wurden nach ISO 8466-1 und DIN 38402 A51 die folgenden Daten ermittelt (10-mm-Küvette):

Verfahrensstandardabweichung (mg/l NO <sub>3</sub> -N)	± 0,11
Verfahrensvariationskoeffizient (%)	± 0,85
Vertrauensbereich (mg/l NO <sub>3</sub> -N)	± 0,3
Anzahl Chargen	20

#### Verfahrenskenndaten:

	Messbereich mg/l NO <sub>3</sub> -N	
	0,10 - 5,00	1,0 - 25,0
Empfindlichkeit: Extinktion 0,010 E entspricht (mg/l NO <sub>3</sub> -N)	0,04	0,2
Genauigkeit eines Messwerts (mg/l NO <sub>3</sub> -N)	max. ± 0,10	max. ± 0,5

Qualitätszertifikate und Chargenzertifikate für Spectroquant® Testsätze s. Website.

### 9. Hinweise

- Flaschen nach Reagenzentnahme umgehend wieder verschließen.
- **Hinweise zur Entsorgung können unter dem Quick Link „Richtlinien zur Abfallentsorgung“ auf [www.merck-chemicals.com/test-kits](http://www.merck-chemicals.com/test-kits) angefordert werden.**

Merck KGaA, 64271 Darmstadt, Tel. +49(0)6151 72-2440, Fax +49(0)6151 72-7780  
 environmental.analysis@merck.de [www.merck-chemicals.com/photometry](http://www.merck-chemicals.com/photometry)

Abbildung 21 Arbeitsanweisung für den Nitratstest

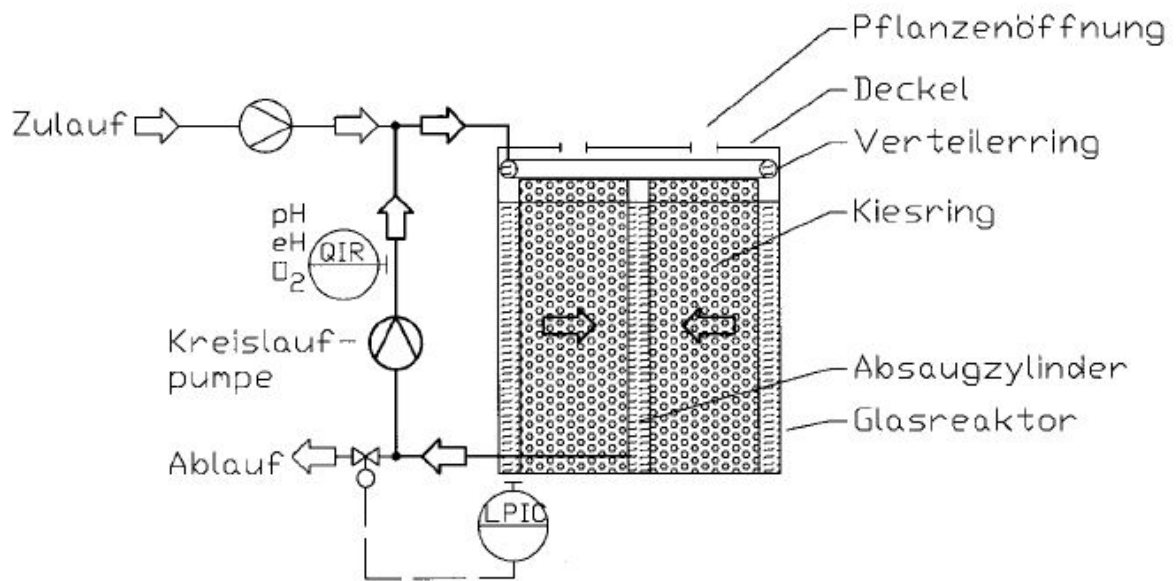


Abbildung 22 schematische Darstellung des Fließbildes der PFR.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt und durch meine Unterschrift, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt worden ist. Inhalte und Passagen, die aus fremden Quellen stammen und direkt oder indirekt übernommen worden sind, wurden als solche kenntlich gemacht. Ferner versichere ich, dass ich keine andere, außer der im Literaturverzeichnis angegebenen Literatur verwendet habe. Diese Versicherung bezieht sich sowohl auf Textinhalt sowie alle enthaltenden Abbildungen, Skizzen und Tabellen. Die Arbeit wurde bisher keiner Prüfungsordnung vorgelegt und auch noch nicht veröffentlicht.

Leipzig, den

---

Fabio Kraft

*Abbildung 1 Querschnitt eines Rohres von Juncus effusus. Man kann deutlich die Hohlräume erkennen, die das Aerenchym ausmachen. Quelle: private Korrespondenz*

7

47

*Abbildung 2 Schematische Darstellung der unterschiedlichen Betriebsweisen einer Pflanzenkläranlage. A) Teich mit Wasserkultursystem und horizontalem Wasserfluss. B) Hydrobotanisches System mit horizontaler Oberflächenströmung, bei der die Strömung überhalb des Bodens ist. C) Hydrobotanisches System mit horizontaler Flussrichtung, bei der das Wasser unterhalb des Bodens fließt. D) Bodensystem mit vertikaler Flussrichtung. Quelle: (Stottmeister et al., 2000)*

8

4

7

*Abbildung 3 Schematische Darstellung des PFR. Es handelt sich hierbei um einen Viertelschnitt des Reaktors. Am Reaktor werden konstant pH, Redox-Potential (rH) und O<sub>2</sub>-Konzentrationen gemessen. Die Reaktoren haben eine hydraulische Verweilzeit von 5 bis 6 Tagen und sind mit den Pflanzen der Art Juncus effusus bepflanzt. ....14*

*Abbildung 4 Darstellung der verschiedenen Antwortfunktion. Links: Rührkesselreaktor und rechts: Rohreaktor.*

*Die linke Abbildung nutzt anstatt der Zeit, die normierte Zeit in Bezug auf die Verweilzeit (vgl. Formel 2.4.3).*

*Quelle: (Hertwig et al., 2007) .....16*

*Abbildung 5 Schematische Darstellung des ESI-MS Prinzips. Die Analyten werden über den Taylorkonus zu einem filamenartigen Strom geleitet, bis sie aufgrund zu großer Ladungsdichte explodieren (coulomb explosion) und danach in die Gasphase der Ionisierungsquelle gelangen. Von dort werden sie Richtung Massenspektrometer gezogen, wo sie dann gemessen werden. Quelle:(University of Bristol*

*http://www.chm.bris.ac.uk/ms/images/esi-mechanism.gif) .....19*

*Abbildung 6 Normierter Durchmischungsversuch eines bepflanzten Festbettreaktor bei einer Drehzahl von 200 rpm (297 mL/min). Die Normierung ist auf den höchsten gemessenen Wert bezogen. Es wurde eine*

*Einfachmessung durchgeführt. ....22*

Abbildung 7 Darstellung der verschiedenen normierten Verweilzeitversuche. Die Normierung bezieht sich auf den ersten gemessenen Wert der Verweilzeitversuche. Aufgrund von fehlerhaftem Verhalten des Spektrometers mussten bei VWZ 2 und 3 mehrere Daten interpoliert werden. Für die VWZ 2 wurden die interpolierten Daten mit hellblau gekennzeichnet und für VWZ 3 mit lila.  $\Theta$  beschreibt das Verhältnis der Zeit zur mittleren Verweilzeit (vgl. Formel 2.4.2). Die Pumprate betrug 32 rpm (50 mL/min).

23

47

Abbildung 8 Darstellung des Verlaufs der Benzoatkonzentrationen. Die Fehlerbalken wurden mittels einer Dreifachmessung einer Probe von jedem Reaktor. Die Messreihe stellt den Nacht/Tag-Wechsel dar. Auf der Sekundärachse wird der gemessene Globalstrahlung dargestellt.

25

47

Abbildung 9 Darstellung der Benzoatkinetik nach Injektion von 346  $\mu\text{M}$  Natriumbenzoat (Endkonzentration im Reaktor). Vor der ersten Probennahme wurde die Kreislaufpumpe für 1 h auf 200 rpm (297 mL/min) erhöht. Die rote Linie zeigt die Abnahme der Extinktion während des Verweilzeitversuchs.

25 47

Abbildung 10 Darstellung der Ammoniumkonzentration. Reaktor 3 wurde nicht gemessen. Die Probe um 22 Uhr bei R2 ist durch ein fehlerhaftes Handling nicht gemessen worden. Es wurde eine Einfachmessung durchgeführt (Fehlerbalken vom Datenblatt). Auf der Sekundärachse ist der Globalstrahlung zu sehen.

27 47

Abbildung 11 Darstellung der unterschiedlichen Nitritkonzentrationen gegenüber dem einfallenden Tageslicht. Die Proben wurden während eines Tag/Nachtzyklus genommen und als Einfachmessung gemessen. Reaktor 3 wurde nicht gemessen. Die Fehlerbalken wurde den Datenblättern entnommen.

27 47

Abbildung 12 Darstellung der unterschiedlichen Nitritkonzentrationen. Es handelt sich um eine Tagesmessreihe. Die Fehlerbalkentoleranz wurde den Datenblättern entnommen.

28 47

Abbildung 13 Übersicht der Diversität der vorkommenden Klassen von Archaeen in Reaktor 1 und Reaktor 2. Die Daten wurden mittels einer Datenbanksuche erhalten und dann der Phylogenie nach analysiert und zusammengefasst. Anzahl der Messwerte für links  $n=59$  und für rechts  $m=79$ .

30 47

Abbildung 14 Übersicht der Diversitäten der vorkommenden Ordnungen von Archaeen von R1 und R2. Die erhaltenen Daten wurden mit einer Datenbanksuche analysiert und der Phylogenie nach strukturiert. Die Anzahl der Messwerte ist links  $n=56$  und rechts  $m=79$ .

30

47

Abbildung 15 Darstellung der vorkommenden Klassen von Bakterien innerhalb des Reaktor 2. Die Daten wurden mittels einer Datenbanksuche erhalten und ihrer Phylogenie nach strukturiert. Die Anzahl der Messwerte betrug  $n=155$ .

32 48

Abbildung 16 Darstellung der vorkommenden Ordnungen von Bakterien in Reaktor 2. Die Daten wurden mittels einer Datenbanksuche erhalten und ihrer Phylogenie nach strukturiert. Die Anzahl der Messwerte betrug  $n=148$ .

32 48

Abbildung 17 Kalibrierkurve von Benzoat mit linearer Regression, Regressionsformel und Bestimmtheitsmaß. Gemessen in einem Bereich von 0 mM bis 1 mM. Die Messung wurde auf einer GC-MS ausgeführt.

49

48

Abbildung 18 Kalibrierkuve von Uranine mit linearer Regression, Regressionsformel und Bestimmtheitsmaß. Gemessen am Spektrometer ATI Unicam in einem Bereich von 0 bis 11 mg/l.

4

9

4

8

Abbildung 19 Arbeitsanweisung für den Ammoniumtest 50..... 48

<i>Abbildung 20 Arbeitsanweisung für den Nitrittest</i>	51	48
<i>Abbildung 21 Arbeitsanweisung für den Nitrat test</i>	52	48
<i>Abbildung 22 schematische Darstellung des Fließbildes der PFR.</i>	53	48
<i>Tabelle 1 Darstellung der genutzten Geräte während des Schreibens der Bachelorarbeit</i>	10	48
<i>Tabelle 2 Übersicht der genutzten Chemikalien für die Zufütterung der Reaktoren</i>	11	48
<i>Tabelle 3 Übersicht der genutzten Chemikalien für den Aufschluss der Reaktorproben</i>	11	48
<i>Tabelle 4 Darstellung der unterschiedlichen Chemikalienkonzentrationen</i>	12	48
<i>Tabelle 5 Übersicht der ermittelten mittleren Verweilzeiten</i>	24	48
<i>Tabelle 6 Darstellung der unterschiedlichen Evaporationsdaten von Reaktor 1,2 und 3.</i>	29	48