

**Verbreitung und Diversität denitrifizierender Bakterien
im Oberflächenwasser und hyporheischen Interstitial der Lahn
unter dem Einfluß von Kläranlagenabwässern**

Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

dem
Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von
Eike ter Haseborg
aus Leer/Ostfr.

Marburg/Lahn 2004

Vom Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am

.....angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. D. Werner

Zweitgutachter: PD. Dr. D. Borchardt

Tag der mündlichen Prüfung am 13. Dezember 2004

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgenden Publikationen veröffentlicht:

INGENDAHL, D, E. TER HASEBORG, M. MEIER, VAN DER MOST, O., STEELE, H. & D. WERNER (2002): Linking hyporheic community respiration and inorganic nitrogen transformations in the River Lahn (Germany). - Arch. Hydrobiol. 155: 99-120.

INGENDAHL, D., O. VAN DER MOST, M. MEIER, E. TER HASEBORG & D. WERNER (2001): Nitritumsätze im hyporheischen Interstitial zweier Pool-Riffle-Abschnitte der Lahn. – Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL), Tagungsbericht 2000 (Magdeburg), Tutzing.

TER HASEBORG, E., M. MEIER, D. INGENDAHL & D. WERNER (Zur Publikation angenommen): Denitrifying bacterial populations in the hyporheic zone of the River Lahn (Germany): spatial and temporal distribution and the significance of external inputs. - Arch. Hydrobiol.

INGENDAHL, D., TER HASEBORG, E., VAN DER MOST, H., WERNER, D. (Zur Publikation angenommen): Hyporheic community respiration and nitrogen transformation as influenced by different interstitial velocities. –Arch. Hydrobiol.

Die vorliegende Arbeit wird als Ganzes im Internet veröffentlicht.

Im Laufe des Promotionszeitraumes wurde der jeweils aktuelle Stand der Forschungen den Fachkollegen zugänglich gemacht:

TER HASEBORG, E., M. MEIER, D. INGENDAHL & D. WERNER (2000): Denitrification in the hyporheic interstitial of the River Lahn, Germany influenced by wastewater. – River Bottom V, 19.-22.06.2000, Lunz a. See. - Als Poster veröffentlicht.

TER HASEBORG, E., M. MEIER, P. VINUESA, D. INGENDAHL & D. WERNER (2001): Population shift of denitrifying bacteria in interstitial and surface waters upstream and downstream a purification plant documented by amplified 16S ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA). – 9th International Symposium on Microbial Ecology (ISME), 26.-31.08.2001, Amsterdam. - Als Poster veröffentlicht.

TER HASEBORG, E. M. MEIER, D. INGENDAHL, P. VINUESA & D. WERNER (2001): Population shift bei denitrifizierenden Bakterien im hyporheischen Interstitial der Lahn aufgrund von Abwassereinleitungen. – Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL), 17.-21.09.2001, Kiel. - Als Vortrag veröffentlicht.

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
2	UNTERSUCHUNGSGEBIET	7
2.1	<i>Naturräumliche Lage und Geologie</i>	7
2.2	<i>Einzugsgebiet der Lahn</i>	7
2.3	<i>Klima und Abflußverhältnisse</i>	8
2.4	<i>Ökologische Belastungssituation</i>	9
2.5	<i>Detaillierte Beschreibung der Probeentnahmestellen</i>	9
3	MATERIAL UND METHODEN	12
3.1	<i>Geräte</i>	12
3.2	<i>Chemikalien und Materialien</i>	13
3.2.1	Feinchemikalien und Verbrauchsmaterialien	13
3.2.2	Restriktionsenzyme	14
3.2.3	Nährmedien	15
3.2.4	Kits	15
3.2.5	Puffer und Lösungen	15
3.3	<i>Freilandmessungen</i>	16
3.3.1	Multilevel-Sonden	16
3.3.2	Entnahme von Wasserproben aus dem hyporheischen Interstitial der Lahn	17
3.3.3	Analysen der Interstitialwasserproben	18
3.4	<i>Ermittlung der relativen Anzahl denitrifizierender Bakterien in den Wasserproben</i>	18
3.5	<i>Anreicherung von denitrifizierenden Bakterien</i>	18
3.6	<i>Isolierung von denitrifizierenden Bakterien aus den Anreicherungskulturen</i>	19
3.7	<i>Gesamt DNA-Isolierung</i>	19
3.8	<i>Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit der DNA</i>	20
3.9	<i>Genotypische Charakterisierung und Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien</i>	21
3.9.1	Polymerase Kettenreaktion - Polymerase Chain Reaction (PCR)	21
3.9.2	PCR der 16S rDNA aus der isolierten Gesamt DNA der denitrifizierenden Bakterien	21

Inhaltsverzeichnis

3.9.3	Detektierung des Nitritreduktasetyps mittels Touchdown-PCR	22
3.9.4	Phylogenetische Analyse der denitrifizierenden Bakterien mittels Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)	24
3.9.5	Computergestützte Auswertung der Restriktionsfragmentlängen	25
3.9.6	MicroLog-System (Biolog Inc., Hayward, USA)	25
3.9.7	Nachweis der Produktion von Fluorescein durch die isolierten denitrifizierenden Bakterien	26
3.9.8	Statistische Auswertung	26
3.9.9	Agarstrichverfahren: Test auf Wachstumshemmung bei Referenzbakterien verursacht durch fluoreszierende Pseudomonaden	26
3.9.10	Nachweis von <i>hsdA</i> , ein für den Steroidabbau essentielles Gen von <i>Comamonas testosteroni</i>	27
3.10	<i>Sterilisation von Verbrauchsmaterialien und Nährmedien</i>	27
3.11	<i>Bakterienstämme</i>	28
3.12	<i>Primer</i>	28
3.13	<i>Nährmedien</i>	29
3.14	<i>Konzentrationen von Antibiotika und anderen Zusätzen</i>	31
3.15	<i>Anzuchtbedingungen und Stammhaltung von Bakterienkulturen</i>	31
3.16	<i>Transformation und Minipräparation von Plasmiden</i>	31
3.17	<i>Sequenzierung</i>	32
3.17.1	Sequenzierreaktion mit Hilfe der PCR	32
3.17.2	Polyacrylamid Gelelektrophorese mit Hilfe des LICOR DNA-Sequencers	32
3.17.3	Auswertung der Sequenzdaten	33
3.18	<i>Vergleich der Methoden und die Einschätzung ihrer spezifischen Anwendbarkeit</i>	33
4	ERGEBNISSE	36
4.1	<i>Physikalisch-chemische Parameter</i>	36
4.1.1	Ammonium-, Nitrat- und Nitritkonzentrationen des Klärwassers	36
4.1.2	Ammoniumkonzentrationen des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers	37
4.1.3	Nitratkonzentrationen des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers	40
4.1.4	Nitritkonzentrationen des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers	42
4.1.5	Sauerstoffkonzentrationen des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers	44
4.1.6	pH-Wert des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers	46
4.1.7	Elektrische Leitfähigkeit des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers	48
4.2	<i>Einfluß des Klärwassers auf die chemisch-physikalischen Parameter des Oberflächen- und Interstitialwassers der Lahn</i>	51
4.3	<i>Einordnung der Lahn in die chemische Güteklassifizierung</i>	53
4.4	<i>Denitrationspotenzen der Oberflächen- Interstitial- und Klärwasserproben</i>	54
4.5	<i>Isolierung und Verbreitung der denitrifizierenden Bakterien</i>	57

Inhaltsverzeichnis

4.6	<i>Molekulargenetische Charakterisierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien</i>	61
4.6.1	Phylogenetische Analyse der denitrifizierenden Bakterien mittels ARDRA	61
4.6.2	Detektierung des Nitritreduktasetyps mittels PCR	69
4.7	<i>Physiologische Charakterisierung und Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien</i>	71
4.7.1	Physiologische Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien mittels des MicroLog-Systems	71
4.7.2	Produktion von Fluorescein durch die isolierten denitrifizierenden Bakterien	74
4.7.3	Wachstumshemmung bei Referenzbakterien verursacht durch fluoreszierende Pseudomonaden	76
4.8	<i>Weiterführende molekulargenetische Charakterisierung und Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien</i>	79
4.8.1	Sequenzierung der 16S rDNA	79
4.8.2	Nachweis von <i>hsdA</i> , ein für den Steroidabbau essentielles Gen von <i>Comamonas testosteroni</i>	81
4.9	<i>Gesamtergebnis der physiologischen und molekulargenetischen Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien</i>	82
4.10	<i>Verbreitung der identifizierten denitrifizierenden Bakterien im Längsprofil der Untersuchungsstrecke</i>	86
4.11	<i>Einfluß der veränderten Stickstoffkonzentrationen im Klärwasser auf die Verbreitung der identifizierten denitrifizierenden Bakterien</i>	87
5	DISKUSSION	88
5.1	<i>Physikalisch-chemische Parameter im hyporheischen Interstitial und im Oberflächenwasser der Lahn sowie im Klärwasser</i>	88
5.1.1	Stickstoffkonzentration im Kläranlagenablauf	88
5.1.2	Ammonium	89
5.1.3	Nitrat	91
5.1.4	Nitrit	93
5.1.5	Sauerstoff	96
5.1.6	pH-Wert	99
5.1.7	Elektrische Leitfähigkeit	99
5.2	<i>Denitrationspotenz nach RHEINHEIMER (1965)</i>	100
5.3	<i>Detektierung des Nitritreduktasetyps</i>	103
5.4	<i>Produktion von antibiotisch wirksamen Stoffen</i>	104
5.5	<i>Isolierung und räumliche Verteilung der denitrifizierenden Bakterien</i>	105

Inhaltsverzeichnis

5.5.1	Räumliche Verteilung der denitrifizierenden Bakterien	106
5.5.2	Einfluß von Ex- und Infiltrationsbereichen auf die Verbreitung von denitrifizierenden Bakterien	107
5.6	<i>Zeitliche Variabilität der denitrifizierenden Bakterien</i>	<i>108</i>
5.7	<i>Räumliche Verbreitung der denitrifizierenden Bakterien</i>	<i>112</i>
5.7.1	Ausschließlich flußaufwärts des Kläranlagenablaufes isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe A)	112
5.7.2	Ausschließlich aus dem Klärwasser isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe B)	114
5.7.3	Ausschließlich aus dem Klärwasser und dem Interstitial flußabwärts des Kläranlagenablaufes isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe B)	115
5.7.4	Ausschließlich aus dem Interstitial flußabwärts des Kläranlagenablaufes isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe B)	117
5.7.5	Aus dem Interstitial flußaufwärts und -abwärts des Kläranlagenablaufes isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe C)	118
5.7.6	Isolierte denitrifizierende Bakterien ohne eindeutige Verbreitungspräferenz	121
5.7.7	Kultivierbare denitrifizierende Bakterien in den verschiedenen Kompartimenten der Lahn	125
5.8	<i>Belastung der Lahn durch den Klärwassereintrag im Hinblick auf die Verbreitung und Zusammensetzung der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien</i>	<i>126</i>
5.8.1	Belastung der Lahn durch den Klärwassereintrag im Hinblick auf die Verbreitung und Zusammensetzung der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien	126
5.8.2	Einfluß der Veränderungen der Stickstoffkonzentration im Klärwasser auf die Verbreitung und Zusammensetzung der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien	127
5.9	<i>Schlußbetrachtung und Ausblick</i>	<i>128</i>
6	ZUSAMMENFASSUNG	131
7	LITERATUR	134
	ANHANG	150/I

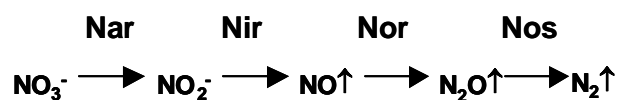
1 EINLEITUNG

Das Phänomen der Denitrifikation wurde erstmals im Jahre 1867 von Smith und Chapman beschrieben. Diese stellten ein Verschwinden von Nitratstickstoff aus Wasser, das reich an organischem Material war, fest (SMITH & CHAPMAN 1867 in RHEINHEIMER 1988). Der Begriff der Denitrifikation wurde 1886 von Gayon & Dupetit eingeführt, die damit die Eliminierung von Nitrat in Abwesenheit von Sauerstoff beschrieben, die nicht zu einer Stickstoffaufnahme in wachsenden Zellen führt (GAMBLE et al. 1977). Heute wird unter dem Begriff der biologischen Denitrifikation ein dissimilatorischer Prozeß verstanden, der von einer Vielzahl von Bakterien der unterschiedlichsten Gattungen und von einigen Pilzen und Hefen durchgeführt werden kann (VAN SPANNING et al. 2003).

Die Fähigkeit zur Denitrifikation ist in vielen phylogenetisch unterschiedlichen Bakteriengruppen verbreitet (GAMBLE et al. 1977, ZUMFT 1997), die in verschiedenen Habitaten vorkommen, so z.B. in Sedimenten von Binnengewässern (GARCIA-RUIZ et al. 1998, TOMASZEK & CZERWIENCIEC 2000), in marinen Sedimenten (SEITZINGER 1996), im Grundwasser (SCHIPPER & VOJVODIC-VUKOVIC 2000), in Kläranlagen (ETCHEBEHERE et al. 2001a) und in Böden (CHENEBY et al. 2000).

Während Umweltwissenschaftler unter der Denitrifikation einen Prozeß verstehen, in dem Nitrat und Nitrit zu Stickstoffgasen umgewandelt werden, beschränken Mikrobiologen den Begriff der Denitrifikation auf bakterielle respiratorische Prozesse, bei denen Stickstoffoxide als terminaler Elektronenakzeptor fungieren, was zu einer schrittweisen Reduktion der oxidierten Stickstoffverbindungen führt. Für denitrifizierende Bakterien sind Stickstoffgase als Produkte der Stickstoffoxidreduktion in Verbindung mit einem Wachstum der Zellen ein charakteristisches Merkmal (MAHNE & TIEDJE 1995).

Bei der Denitrifikation wird Nitrat in Gegenwart von organischen Wasserstoffdonatoren zu molekularem Stickstoff reduziert ($4\text{H}^+ + 5\text{C} + 4\text{NO}_3^- \rightarrow 5\text{CO}_2 + 2\text{N}_2\uparrow + 2\text{H}_2\text{O}$). Sie setzt sich aus vier enzymatisch katalysierten Reaktionen zusammen. Die vier daran beteiligten Enzyme, deren Gene bei vielen Bakterien in Clustern zusammenliegen, werden sowohl in ihrer Expression als auch in ihrer Aktivität durch Sauerstoff inhibiert.



Die Reduktion von Nitrat (NO_3^-) zu Nitrit (NO_2^-) wird durch die dissimilatorische Nitratreduktase (Nar) katalysiert. Die weitere Reduktion von Nitrit erfolgt durch die Nitritreduktase (Nir) zu Stickstoffmonoxid (NO), das durch die Stickstoffoxidreduktase (Nor) über Distickstoffoxid (N_2O ,

Lachgas) durch die Distickstoffoxidreduktase (Nos) zu molekularem Stickstoff (N_2) reduziert wird. Diese Reaktionskette kann erst mit der Nitrit-, Stickstoffmonoxid- oder Distickstoffoxidreduktion einsetzen und kann auch unterbrochen werden, wobei letzteres zu einer Nitritakkumulation oder zu einer Freisetzung von Stickoxiden (NO , N_2O) führen kann (Abb. 1).

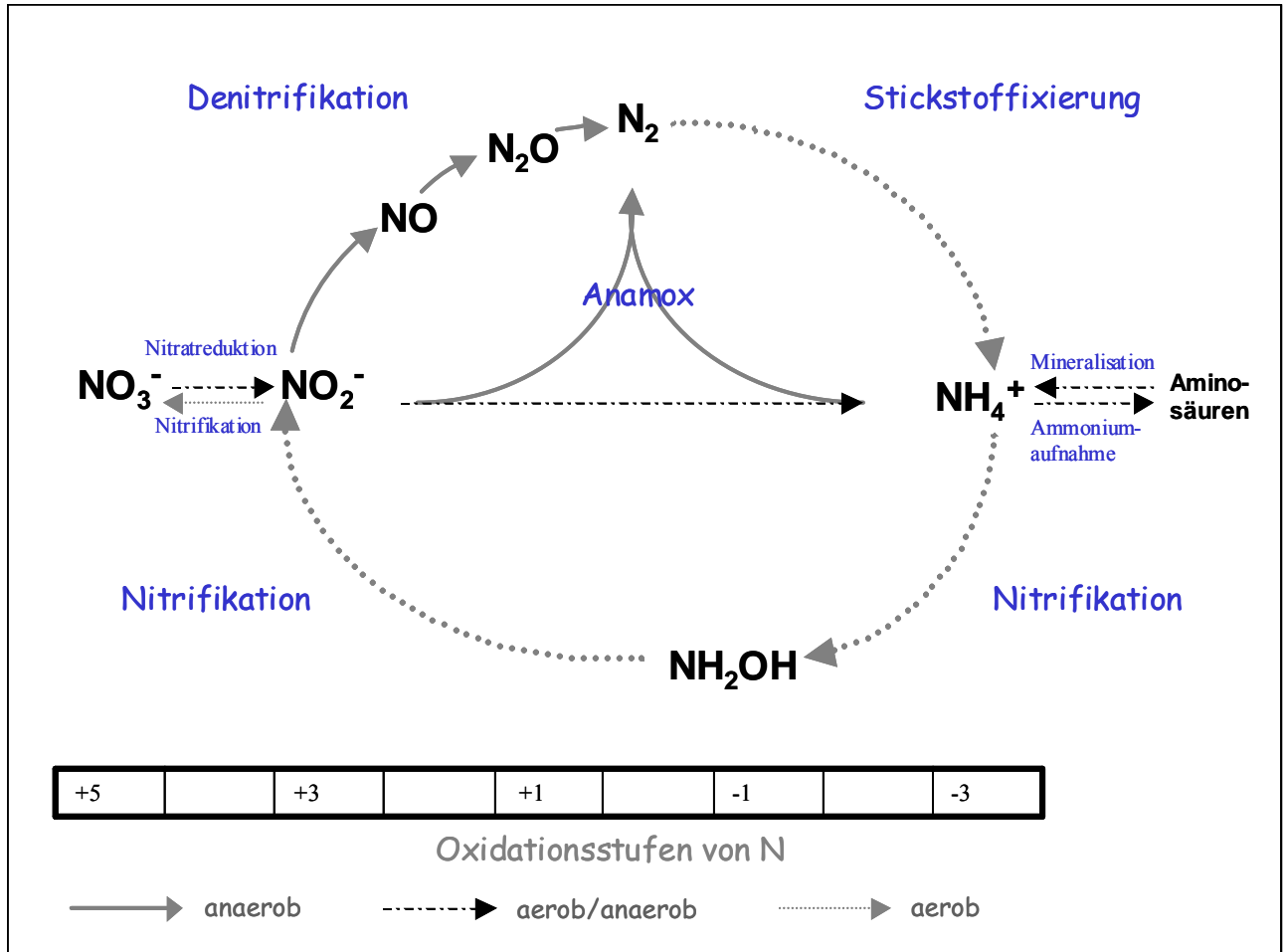


Abb. 1: Der biologische Stickstoffkreislauf (verändert nach VAN SPANNING et al. 2003).

Die Denitrifikation findet zwar überwiegend unter anaeroben Bedingungen statt, aber die Fähigkeit von denitrifizierenden Bakterien zur aeroben Denitrifikation ist schon seit längerem bekannt (ROBERTSON & KUENEN 1984, ROBERTSON et al. 1995). Insbesondere die Sauerstoffkonzentration, die Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen und der Nitratgehalt haben neben dem pH-Wert und der Temperatur Einfluß auf den Denitrifikationsprozeß (TIEDJE 1988). Die meisten Denitrifikanten sind fakultativ anaerobe, heterotrophe Organismen, die durch die Oxidation von diversen Kohlenstoffquellen die Redoxäquivalente auf Stickstoffoxide übertragen können, während autotrophe Denitrifikanten anorganische Schwefelkomponenten, Wasserstoff, Ammonium, Eisen oder Nitrit benötigen (ZUMFT 1992).

Die Fähigkeit zur Denitrifikation ermöglicht es diesen Organismen, in Habitaten zu existieren, deren Sauerstoffgehalt alternierend bzw. stark erniedrigt ist. Der Energiegewinn der

Denitrifikation ist zwar gegenüber der Sauerstoffatmung um 10 - 30 % geringer, jedoch ist er noch um ein Vielfaches höher als bei einem Gärprozeß (RHEINHEIMER 1988).

Neben der anaeroben Oxidation von Ammonium unter Reduktion von Nitrat oder Nitrit (Anamox) ist die Denitrifikation der einzige biologische Prozeß, durch den gebundener zu molekularem Stickstoff reduziert und auf diese Weise dem betreffenden Habitat entzogen wird (Abb. 1). Die Denitrifikation spielt damit eine wichtige Rolle in der biologischen Eliminierung des gebundenen Stickstoffs aus aquatischen und terrestrischen Systemen in die Atmosphäre. Die Denitrifikation ist auch verantwortlich für den Stickstoffverlust in Böden und bei einer unvollständigen Denitrifikation für die Produktion von klimarelevanten Gasen (N_2O , NO), die zur Zerstörung der Ozonschicht beitragen (KNOWLES 1982, CONRAD 1996, WAIBEL et al. 1999). In Kläranlagen dient die Denitrifikation nach der aeroben Nitrifikation als finaler Schritt zur Stickstoffeliminierung aus Abwässern (RHEINHEIMER 1988, NEEF et al. 1996).

Neben der Denitrifikation kommt der Nitrifikation im Stickstoffkreislauf eine Schlüsselfunktion zu. Im Zuge des heterotrophen Stoffabbaus wird organisch gebundener Stickstoff zu Ammonium mineralisiert und durch Nitrifikationsprozesse von Ammonium- und Nitritoxidierern zu Nitrat umgesetzt (JONES et al. 1995). Das in der Nitrifikation unter Sauerstoffverbrauch gebildete Nitrat und Nitrit stehen als Substrat für denitrifizierende Bakterien zur Verfügung, was zu einer direkten Kopplung der beiden Prozesse Nitrifikation und Denitrifikation führen kann (NIELSEN et al. 1996).

Die mikrobiellen Stoffumsätze innerhalb des Stickstoffhaushaltes von Fließgewässern finden überwiegend im Lückensystem der Gewässersohle, dem hyporheischen Interstitial, statt. Dieses wurde erstmals von ORGHIDAN (1959) und SCHWOERBEL (1961) als Grenzzone und neuer Lebensraum zwischen Oberflächenwasser und Grundwasser beschrieben. Es besteht aus einem Hohlraumssystem in den fluvialen Lockergesteinen neben und unterhalb der Stromsohle und gilt als funktioneller Teil des Fließgewässers (SCHWOERBEL 1999).

Die Größe des hyporheischen Interstitials hängt von der Durchlässigkeit der Stromsohle, der Korngrößenverteilung des Sediments und der Wasserführung ab (SCHÖNBORN 1992). Es stellt nicht nur für viele Organismen ein Strömungs-, Temperatur- und Stabilitätsrefugium dar, sondern ist auch Reaktionsort von intensiven chemischen und mikrobiologischen Umwandlungsprozessen. Dem hyporheischen Interstitial kommt eine große Bedeutung für den heterotrophen Stoffumsatz und die Selbstreinigungskraft eines Gewässers zu (SCHWOERBEL 1961, GRIMM & FISHER 1984, MEYER et al. 1988, HENDRICKS 1993, PUSCH & SCHWOERBEL 1994, GARCIA-RUIZ et al. 1998, PUSCH et al. 1998). Es hat eine Schlüsselstellung für Stoff- und Energieaustauschvorgänge zwischen Fließgewässern und ihrer Umgebung (BRUNKE & GONSER 1997).

Die Besiedlung der Bettsedimente mit Biofilme ausbildenden Mikroorganismen ist von großer Bedeutung für den Austausch zwischen Aue, Fließgewässer und Grundwasser (PUSCH et al. 1998). Dabei ist insbesondere die große Aufwuchsfläche des interstitiellen Lückensystems für Biofilme und die lange Kontaktzeit des Wassers mit dem Sediment für den Stoffhaushalt von Fließgewässern entscheidend (PUSCH et al. 1998, BORCHARDT & FISCHER 2000). Allochthones und autochthones organisches Material wird in Biofilmen umgesetzt und teilweise für den Aufbau mikrobieller Biomasse genutzt (HENDRICKS 1996).

Die hauptsächlich unter anaeroben Verhältnissen ablaufende Denitrifikation findet in Fließgewässern überwiegend im hyporheischen Interstitial statt und nur zu geringen Teilen im Oberflächenwasser. Setzt die Denitrifikation in schlammigen Sedimenten nur wenige Millimeter unterhalb der oxischen Grenzschicht ein, so konnten HILL et al. (1998) auch in kiesigen Sedimenten trotz Sauerstoffkonzentrationen von über 2 mg l^{-1} eine starke Nitrat-Abnahme messen. HOLMES et al. (1994) machten sogenannte „anoxic microsites“ für die Denitrifikation in oxischen oberflächennahen Sedimenten verantwortlich.

Durch eine heterogene Korngrößenverteilung der Bettsedimente und auftretende Tag-Nacht-Schwankungen im Sauerstoffgehalt des Oberflächenwassers sowie Kolmations- und Dekolmationsphänomene können anaerobe kleinräumige Sedimentbereiche während Perioden von hoher Primärproduktion entstehen (PUSCH et al. 1998, BORCHARDT & FISCHER 2000, IBISCH & BORCHARDT 2003, FISCHER et al. [zur Publikation angenommen]). Ein mosaikförmiges Auftreten von aeroben und anaeroben Bereichen im hyporheischen Interstitial bietet ideale Reaktionsräume für eine gekoppelte Nitrifikation/Denitrifikation. Darüber hinaus können Schwankungen der Sauerstoffkonzentration im hyporheischen Interstitial eine Steigerung von Nitrifikations- und Denitrifikationsprozessen verursachen (HILL et al. 1998, BORCHARDT & FISCHER 2000, FISCHER et al. [zur Publikation angenommen]). Auch eine aerobe Denitrifikation durch heterotrophe und autotrophe Denitrifikanten kann nicht ausgeschlossen werden (ROBERTSON & KUENEN 1984, LLOYD et al. 1987, CARTER et al. 1995, ROBERTSON et al. 1995).

Bakterienpopulationen adaptieren sehr schnell an veränderte Habitatbedingungen und können Indikatoren für den ökologischen Status eines Fließgewässers sein (SERVAIS et al. 1999). Der Einfluß stickstoffreicher Klärwassereinleitungen auf nitrifizierende Bakterien in Fließgewässern wurde schon an der Seine unterhalb von Paris untersucht, wobei festgestellt wurde, daß Abwässer für die Einschwemmung von nitrifizierenden Bakterien (BRION & BILLEN 2000) und Veränderungen in der Diversität vor Ort vorhandener Bakterienpopulationen verantwortlich sind

(MONTUELLE et al. 1996, BONNET et al. 1997). In landwirtschaftlich bewirtschafteten Böden konnten durch die Zugabe von Ammonium zwar keine Veränderungen in der nitrifizierenden, aber sehr wohl in der denitrifizierenden Bakterienpopulation festgestellt werden, was die Autoren auf eine Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation zurückführen (AVRAHAMI et al. 2002). Die Einleitung von Abwässern mit stark erhöhter Konzentration an Stickstoffverbindungen, insbesondere von Ammonium und Nitrat, können demnach zu Veränderungen in der Zusammensetzung von nitrifizierenden und denitrifizierenden Bakterienpopulationen in Fließgewässern führen, wobei die veränderte Zusammensetzung funktionelle Konsequenzen für den Stickstoffhaushalt und damit für die Selbstreinigungskraft eines Fließgewässers haben kann.

Neben wasserbaulichen Maßnahmen (Flußbegradigungen, Uferausbauten, Grundwasserabsenkungen) und intensiver Landbewirtschaftung sind es vor allem die nährstoffreichen industriellen und kommunalen Abwassereinleitungen, die für Veränderungen und Beeinträchtigungen der Fließgewässer verantwortlich gemacht werden können.

In Abhängigkeit von jahreszeitlichen Schwankungen werden in unbelasteten Fließgewässern hohe natürliche Nitratgehalte gefunden, während Ammonium und Nitrit nur in geringen Konzentrationen auftreten (VAN BENNEKOM et al. 1978; REGIERUNDSPRÄSIDIUM GIEßEN 1994). In belasteten Fließgewässern sind erhöhte Nitratkonzentrationen in erster Linie auf mit Nitrat belastetes Grundwasser durch intensive Landwirtschaft (Nitrat aus Düngemittel) und auf Mineralisierungsprozesse von organisch gebundenem Stickstoff zurückzuführen, während erhöhte Ammoniumkonzentrationen überwiegend durch Einleitungen von Abwässern verursacht werden (RHEINHEIMER 1988, FLAIG et al. 2002). Ein hoher Ammoniumeintrag belastet durch die Nitrifikation den Sauerstoffhaushalt eines Fließgewässers und mit steigendem pH-Wert bzw. steigender Temperatur verschiebt sich das Ammonium/Ammoniak-Gleichgewicht in Richtung des toxischen Ammoniaks (LAMPERT & SOMMER 1993). Nitrat ist neben dem Phosphat ein wichtiger Pflanzennährstoff, weshalb eine erhöhte Nitratkonzentration zu Algenblüten in Fließgewässern führen und fernwirkend zur Eutrophierung von Nord- und Ostsee beitragen kann. Für die Selbstreinigungskraft von Fließgewässern sind Nitrifikation und Denitrifikation essentielle Prozesse. Sie wird von den physiologischen und den katabolischen Eigenschaften insbesondere der interstitiellen Bakterienpopulation begrenzt. Kenntnisse über die physiologischen Eigenschaften und die Artzusammensetzung von denitrifizierenden Bakterienpopulationen und deren Veränderungen in Fließgewässern infolge einer erhöhten Stickstoffbelastung sind demnach eine wichtige Voraussetzung für ein besseres Verständnis der mikrobiellen Prozesse im Stickstoffhaushalt von Fließgewässern.

Zu Verbreitung und Diversität von denitrifizierenden Bakterienpopulationen in Kläranlagen und Fließgewässern wurden bereits viele Untersuchungen durchgeführt (beispielsweise

RHEINHEIMER 1965, SCHMIDER 1985, NEEF et al. 1996, HOCH 1999, MERMILLOD-BLONDIN et al. 2000, YOSHIE et al. 2001, NOGALES et al. 2002). Die unmittelbaren Auswirkungen von Klärwassereinleitungen auf die Zusammensetzung der denitrifizierenden Bakterienpopulation im hyporheischen Interstitial waren bisher dagegen noch nicht Gegenstand wissenschaftlicher Forschung. Aufgrund unterschiedlicher physiologischer und metabolischer Eigenschaften der denitrifizierenden Bakterien dürfte sich das Artenspektrum als Folge der durch die Klärwassereinleitung veränderten Habitatbedingungen in Abhängigkeit von der jeweiligen Reinigungsleistung und den angewendeten Reinigungsverfahren der Kläranlagen ändern.

Nitrit als Intermediärprodukt von Nitrifikation und Denitrifikation ist in unbelasteten Gewässern nur in geringen Konzentrationen vorhanden. In der Lahn nördlich von Marburg wurden Nitritakkumulationen und Ungleichgewichte in den Stickstoffumsätzen festgestellt (REGIERUNGSPRÄSIDIUM GIEßEN 1994). Dies bildet den Ausgangspunkt der vorliegenden Untersuchung, die im Rahmen des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft geförderten Verbundprojektes „Ökosystemare Zusammenhänge im Hyporhithral anthropogen belasteter Fließgewässer“ im Teilprojekt „Mikrobiologie der Stoffumsetzung“ den Einfluß von eingeleitetem Klärwasser auf die Verbreitung und Diversität von denitrifizierenden Bakterien im Oberflächen- und Interstitialwasser der Lahn analysiert.

Um die Zusammensetzung und auftretende Veränderungen der denitrifizierenden Bakterienpopulationen in Abhängigkeit zu den vorliegenden Milieubedingungen zu untersuchen, wurden dazu neben der Erfassung ausgewählter chemisch-physikalischer Parameter (pH-Wert, elektrische Leitfähigkeit, Sauerstoff-, Ammonium-, Nitrat- und Nitritkonzentration) und der Bestimmung der relativen Anzahl von nitratreduzierenden und denitrifizierenden Bakterien (Denitrationspotenz), denitrifizierende Bakterien isoliert und mittels physiologischer (KingB-Agar Test, MicroLog-System) und molekulargenetischer Methoden (*hsdA*-Amplifizierung, ARDRA, 16S rDNA Sequenzierung) charakterisiert und identifiziert.

2 UNTERSUCHUNGSGEBIET

2.1 *Naturräumliche Lage und Geologie*

Die Quelle der Lahn befindet sich 610 m NN in der östlichen Mittelgebirgsregion von Nordrhein-Westfalen im südlichen Rothaargebirge (Ederkopf). Auf dem 244 km langen Weg zu ihrer Mündung in den Rhein bei Lahnstein (65 m NN) durchfließt sie die Bundesländer Nordrhein-Westfalen, Hessen (Lauflänge: 165,07 km) und Rheinland-Pfalz (REGIERUNGSPRÄSIDIUM GIEßEN 1994).

Die Untersuchungen wurden im hyporhitrallen (Äschenregion) oberen Lahnabschnitt ca. 53 km von der Quelle entfernt nördlich von Marburg/Lahn durchgeführt. Dieser obere Lahnabschnitt liegt mit seinen Hauptnebenflüssen von der hessischen Landesgrenze bis zum Zusammenfluß mit der Ohm im Bereich des Paläozoikums des Rheinischen Schiefergebirges, das der Süd-Ost-Abdachung des Mittelgebirges mit unruhigem Relief folgt. Die hier vorherrschenden Gesteine sind Tonschiefer, Grauwacken und Quarzite. Das Marburg-Gießener Lahntal mit dem Marburger Bergland im Norden und dem Gießener Becken im Süden wird von Zechstein und Buntsandstein dominiert, die flußabwärts von Gießen durch verschiedene Gesteine des devonischen und karbonischen Schiefers abgelöst werden, wobei die Buntsandsteintafel östlich von Marburg von der Basaltdecke des Vogelsberges überlagert wird (REGIERUNGSPRÄSIDIUM GIEßEN 1994). Laut HMULV (2004) gelten der Oberlauf der Lahn als kleiner silikatischer Mittelgebirgsfluß und Unter- und Mittellauf als größere silikatische Mittelgebirgsflüsse.

Die häufigsten Böden im Untersuchungsgebiet sind flachgründige, saure Braunerden aus silikatischem Ausgangsgestein. Auf dem Basaltgestein haben sich lehmige bis tonige Braunerden mit hoher Basensättigung ausgebildet, die zur Staunässe neigen.

2.2 *Einzugsgebiet der Lahn*

Das oberirdische Einzugsgebiet der Lahn als größtes Flußgebiet des rechtsrheinischen Schiefergebirges dehnt sich auf ca. 5930,80 km² aus (LANDESUMWELTAMT NORDRHEIN-WESTFALEN 1993), wobei sich das oberirdisch Einzugsgebiet innerhalb der Grenzen Hessens über rund 4756,55 km² erstreckt. Die wichtigsten Zuflüsse der Lahn sind die Ohm und die Dill (HMULV 2004, Abb. 2).

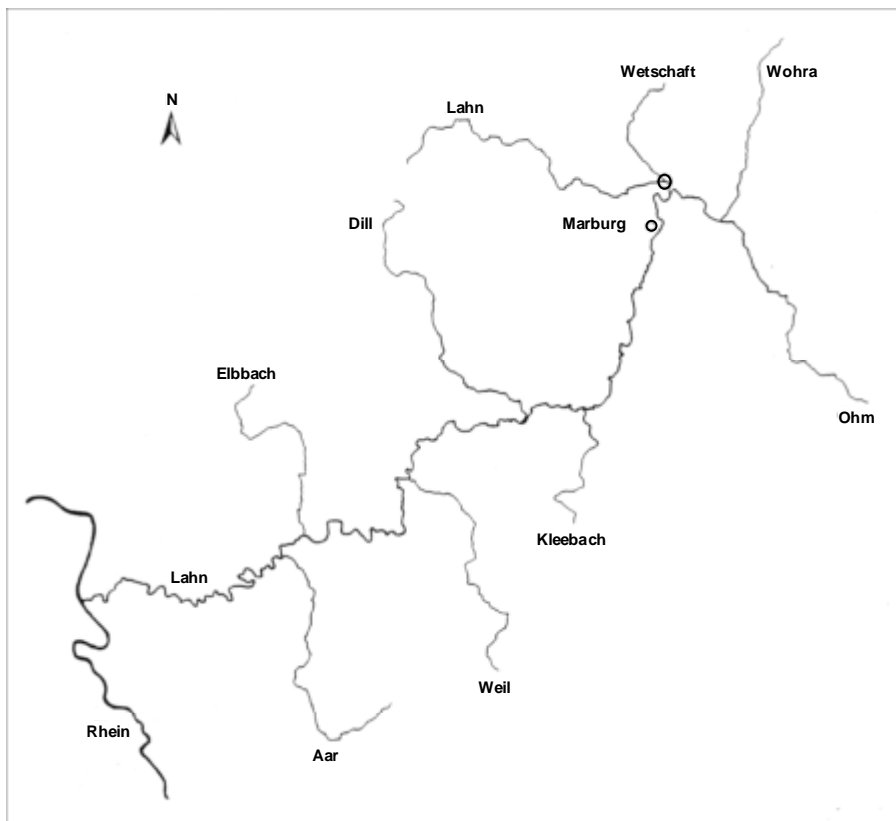


Abb. 2: Graphische Darstellung des Verlaufes der Lahn mit einigen ihrer Nebenflüsse. Die Lage der Untersuchungsstrecke ist mit einem Kreis markiert (verändert nach STEFFEN [1995])

Das mittlere Gefälle der Oberen Lahn zwischen Biedenkopf und Sarnau beträgt 2,36 ‰ und das der Unteren Lahn zwischen Marburg/Lahn und Leun 0,72 ‰, wobei die Untere Lahn auf einer Länge von 137 km schiffbar ist. Das Einzugsgebiet im Bereich der Untersuchungsstrecke an der Lahn (453 km²) wird von Waldflächen und landwirtschaftliche Nutzflächen dominiert.

2.3 Klima und Abflußverhältnisse

Im Einzugsgebiet der Lahn beträgt der mittlere Niederschlag 810 mm pro Jahr und klimatisch herrschen zu 80 % des Jahres maritime Großwetterlagen vor.

Der mittlere Jahresabfluß (MQ) beträgt (Pegel Limburg-Kalkofen) 47,1 m³·s⁻¹ mit einer flächenbezogenen Abflußspende von 8,9 l·(s·km²)⁻¹. Der mittlere Niedrigwasserabfluß (MNQ) liegt bei 10,1 m³·s⁻¹, wobei ein Abfluß von 13,6 m³·s⁻¹ an durchschnittlich 60 Tagen im Jahr unterschritten wird. Das Abflußregime der Lahn ist durch winterliche Hochwässer sowie sommerliche Niedrigwasserperioden gekennzeichnet (REGIERUNGSPRÄSIDIUM GIEßEN 1994). Die Probenahmen erfolgten bei Niedrigwasserabfluß, da die Probenahmeschläuche der Interstitialsonden bei hohen Wasserständen nicht zugänglich sind. Aufgrund der hohen Pegelstände der Lahn im Frühjahr 2001 konnten in diesem Zeitraum keine Wasserproben entnommen werden.

2.4 Ökologische Belastungssituation

Durch eine kommunale, industrielle und landwirtschaftliche Nutzung im Bereich des Lahngebietes ist die Lahn ökologisch belastet. Neben der Nutzung zur Wasserversorgung tragen insbesondere stoffliche Einträge und Veränderungen des Fließverhaltens durch wasserbauliche Maßnahmen zur Belastung der Lahn bei. Ihre Wasserqualität erreicht bis Marburg die Güteklasse II (mäßig belastet), weist aber von dort an durch die großen kommunalen Klärwerke von Marburg, Lollar, Gießen, Wetzlar und Limburg über längere Flußstrecken hinweg eine kritische Belastung (Güteklasse III) auf (BMFT 1993).

Mit 44,1 % haben im Lahngebiet die meist extensiv landwirtschaftlich genutzten Flächen einen ähnlichen Flächennutzungsanteil wie die Waldgebiete 42,6 % (Abb. 3). Des weiteren entfallen 7,2 % der Fläche auf Siedlungen und 6,1 % auf Wasserflächen und sonstige. Die landwirtschaftlich genutzten Flächen beschränken sich überwiegend auf die Beckenlandschaften, Talniederungen und Hängen mit fruchtbaren Schwemmböden bzw. tiefgründiger Lößbedeckung. Die Waldgebiete sind eher in höher gelegenen Randgebieten und in den Bergregionen zu finden.

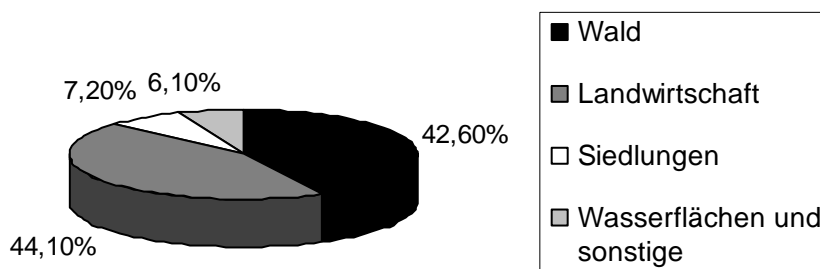


Abb. 3: Graphische Darstellung der Flächennutzung im Lahngebiet 2004 (HMULV 2004)

Die Inanspruchnahme der Lahn als Vorfluter für kommunale und industrielle Abwässer beeinflusst die Gewässergüte in hohem Maße. Bei Niedrigwasser kann aufgrund der hohen Besiedlungsdichte der Anteil des Klärwassers über 30 % vom Gesamtabfluß betragen. Belastungen mit industriellen Abwässern, von denen lediglich Einträge von Schwermetallen durch metallverarbeitende Industrie in die obere Lahn bekannt sind, können dagegen im Vergleich zu anderen, größeren Fließgewässern als gering eingeschätzt werden (REGIERUNGSPRÄSIDIUM GIEßEN 1994).

2.5 Detaillierte Beschreibung der Probeentnahmestellen

Um einen für viele Mittelgebirgsgewässer in Deutschland typischen, hyporhithralen Gewässerabschnitt zu untersuchen, wurde für diese Untersuchung eine Strecke ausgewählt, die naturnah strukturiert ist und einer für Mittelgebirgsgewässer nicht atypischen anthropogenen

Beeinflussung unterliegt. An der ausgewählten 450 m langen Untersuchungsstrecke ist die Lahn 10 - 15 m breit. Zwei aufeinanderfolgende Kiesquerbänke (im Folgenden als Riffle bezeichnet; Riffle A und B) werden von einem langgestreckten Kolkabschnitt (im Folgenden als Pool bezeichnet) getrennt (Abb. 4). Rifflebereiche sind durch eine niedrige Wassertiefe und damit einer hohen Fließgeschwindigkeit gekennzeichnet, wogegen Poolbereiche eine höhere Wassertiefe und eine entsprechend niedrigere Fließgeschwindigkeit aufweisen. Die Gewässermorphologie des Riffle B ist komplexer als die des Riffles A, da in diesen Bereich das Gewässerbett durch Pfeiler einer Eisenbahnbrücke verengt wird (SAENGER & ZANKE [zur Publikation angenommen]).

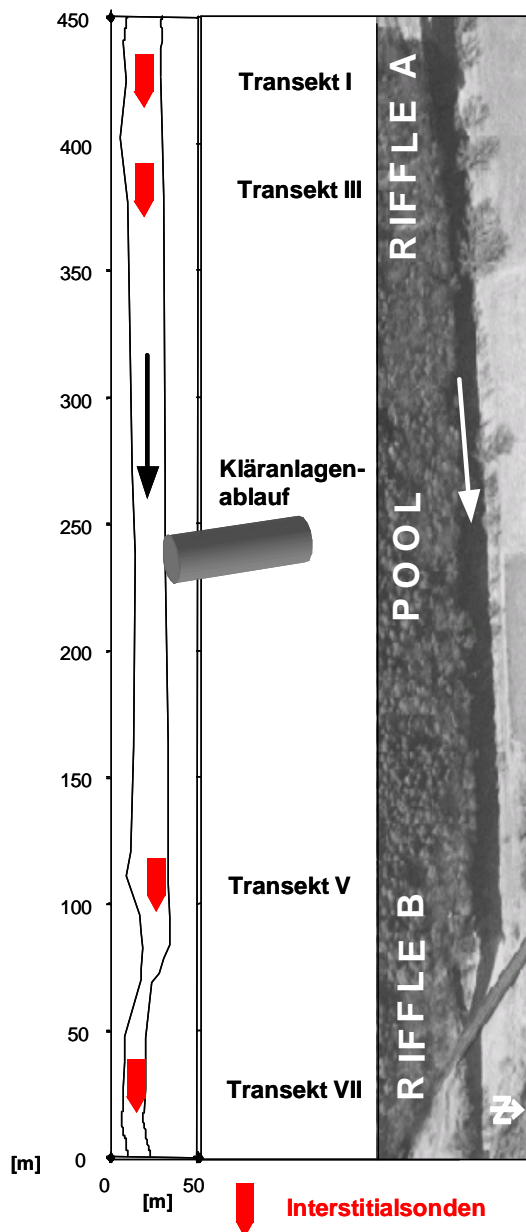


Abb. 4: Graphische Darstellung der Untersuchungsstrecke an der Lahn bei Sarnau, nördlich von Marburg. Auf der linken Seite der Graphik ist der Verlauf der Lahn mit Angaben über die Fließstrecke und Breite dargestellt, wobei die dicken roten Pfeile die zur Probenahme ausgewählten Interstitialsonden markieren. In der Mitte der Graphik ist die Lage der untersuchten Transekte und des Kläranlagenablaufes eingetragen. Die rechte Seite der Graphik zeigt eine Luftaufnahme des Hessischen Landesvermessungsamtes, in der die Lage der Riffle A und B und des Poolbereiches dargestellt sind. Die dünnen Pfeile markieren die Fließrichtung der Lahn (verändert nach FISCHER & BORCHARDT 2001).

Flußabwärts des ersten Riffles mündet in einen langgestreckten Poolbereich der Ablauf einer Kläranlage des Kläranlagenverbandes Lahn-Wetschaft mit einer Kapazität von 15.000 Einwohnerwerten (EW). Durch Umbaumaßnahmen im Jahr 2000 wurde die Kapazität der Kläranlage auf 21.000 EW gesteigert. Die mechanisch-biologische Kläranlage leitet ca. $0,05 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ gereinigte Abwässer in die Lahn. Da der mittlere Jahresabfluß (MQ) in diesem Abschnitt $7,30 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ beträgt und der mittlere Niedrigwasserabfluß (MNQ) bei $0,57 \text{ m}^3 \text{ s}^{-1}$ liegt, erhöht sich die Abflußmenge der Lahn bei MNQ-Verhältnissen um ca. 10 % (BORCHARDT & FISCHER 2000). Im Zuge der Umbaumaßnahmen in der Kläranlage Sarnau wurden im März 2000 eine Nitrifikationsstufe und im Dezember 2000 eine nachgeschaltete Denitrifikationsstufe in Betrieb genommen.

Insgesamt hat die Lahn bis zu dem beschriebenen Untersuchungsabschnitt die Abwasserlast von 7 kommunalen Kläranlagen mit einer Ausbaugröße von 100.000 EW aufgenommen (FISCHER et al. [zur Publikation angenommen]). Im untersuchten Streckenabschnitt beträgt der abwasserbürtige Anteil am Niedrigwasserabfluß zwischen 26 % (oberhalb der Kläranlage Lahn-Wetschaft) und 31 % (unterhalb der Kläranlage). Die Wasserqualität der Lahn an dieser Stelle ist durch eine mäßige organische Belastung und hypertrophe Bedingungen aufgrund von hohen Nährstofffrachten gekennzeichnet (BORCHARDT & FISCHER 2000). Die Sohlstruktur im untersuchten Lahnabschnitt ist gekennzeichnet von grobem Kies und Schotter, wobei in den oberen Schichten des Sediments Schlammablagerungen zu verzeichnen sind.

Im Untersuchungsabschnitt wurden insgesamt vier Transekte zur Probenahme festgelegt (Abb. 4). Die flußaufwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Probenahmestellen, Transekt I und III, sind vom Klärwasser unbeeinflusst und dienen als Referenz für die flußabwärts der Mündung des Kläranlagenablaufes gelegenen Probenahmestellen, Transekt V und VII. In allen Transekten wurden Wasserproben aus jeweils einer Interstitialsonde entnommen, die in der Strommitte der Lahn positioniert wurden, um so einen Einstrom von Hangwasser gering zu halten. Das Transekt III liegt am Ende eines Riffles, einem upwelling Bereich, der durch einen verstärkten Ausstrom von Interstitialwasser ins Oberflächenwasser gekennzeichnet ist. Die Transekte I, V und VII liegen dagegen jeweils am Beginn eines Riffles, einem downwelling Bereich, in dem verstärkt Oberflächenwasser ins Interstitial strömt.

Am linkseitigen Ufer der Lahn verursacht ein Schönungsteich der Kläranlage eine Veränderung der Grundwasserverhältnisse im Bereich des ersten Riffles A, während die Grundwasserdynamik im zweiten Riffle B durch die nahegelegene Mündung der Wetschaft beeinflusst wird.

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Geräte

Autoklav, Fedegari Autoklavi SPA	Tecnorma Deutschland GmbH, Fernwald
Autoklav, Integra	Biomedis Laborservice GmbH, Gießen
Brutschrank, BED 400	WTB Binder Labortechnik GmbH, Tuttlingen
Elektrophoresekammern	Biometra GmbH, Göttingen
Feinwaage Modell 2474	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationsanlage, Digit-Store-Duo	Intas GmbH, Göttingen
Gene Amp PCR System 2400	Perkin Elmer Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt
Gene Quant II RNA/DNA Calculator	Pharmacia Biotechnology Inc., Freiburg
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)	Sykam GmbH, Gilching
Interstitialsonden	Technische Universität Darmstadt
Kompressor, PM 8670-740.3	KNF Neuberger GmbH, Freiburg
Kühlzentrifuge Modell 5402	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Kühlzentrifuge Modell J2-HS	Beckmann Instruments, San Ramen (USA)
Leitfähigkeitmeßgerät LF96	Wiss. Techn. Werkstätten, Weilheim
LICOR DNA Sequencer Modell 4000	MWG-Biotech, Gesellschaft für angewandte Biotechnologie mbH, München
Magnetrührer IKA Combimag RLF	Heidolph Elektro GmbH, Kehlheim
Magnetrührer Magnetic stirrer	Scienceware, Pequannock (USA)
Mini Hybridisation Oven	Appligene Oncor, Illkirch (F)
pH-Meter ph 95	Wiss. Techn. Werkstätten, Weilheim
Sauerstoffmeßgerät	Wiss. Techn. Werkstätten, Weilheim
Schüttelwasserbad Modell 1083	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwald
Spannungsgeber, Power Supply 250/2.5	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Spektralphotometer, Uvikon 860	Kontron Instruments, Eching
T Gradient Thermocycler	Biometra GmbH, Göttingen
Thermoblock, Techne dri-Block DB-3	Thermo-Dux, Gesellschaft für Laborgeräte, Wertheim/Main
Thermoprinter, UP-890CE	Intas GmbH, Göttingen

Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Tischzentrifuge, Mikro 24-48	Andreas Hettich GmbH u. Co KG, Tuttlingen
Trockenschrank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
UV-Transilluminator TM2, $\lambda = 254 \text{ nm}$	UVP, Inc., San Gabriel (USA)
VacuGene Pump	Pharmacia Biotechnology Inc., Freiburg
VacuGene XL	Pharmacia Biotechnology Inc., Freiburg
Vakuum Apparatur für Plasmid Isolation	Macherey Nagel GmbH & Co KG, Düren
Wasserbad GFL	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

3.2 Chemikalien und Materialien

3.2.1 Feinchemikalien und Verbrauchsmaterialien

Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ap	Serva GmbH & Co KGaA, Heidelberg
APS	Serva GmbH & Co KGaA, Heidelberg
Borsäure	Riedel-de Haen AG, Seelze
Bromphenolblau	Serva GmbH & Co KGaA, Heidelberg
Chloroform	Serva GmbH & Co KGaA, Heidelberg
Cm (kristallin)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
CTAB	Serva GmbH & Co KGaA, Heidelberg
DMF	Serva GmbH & Co KGaA, Heidelberg
DMSO	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
DNA-Agarose	BIOzym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
EDTA	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Einmal-Filterhalter (steril - pyrogen-frei)	Schleicher & Schuell GmbH, Dassel
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Fleischextrakt	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Merck KGaA, Darmstadt
HCl	Merck KGaA, Darmstadt
Isoamylalkohol	Merck KGaA, Darmstadt

Metaphor-Agarose	FMC Bio Products, Rockland, USA
KNO ₃	Merck KGaA, Darmstadt
Km	Serva GmbH & Co KGaA, Heidelberg
NaCl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
NaOH	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
NaNO ₂	Merck KGaA, Darmstadt
10 x PCR-Puffer	Pharmacia Biotechnology Inc., Freiburg
2-Propanol	Merck KGaA, Darmstadt
Pepton aus Fleisch	Merck KGaA, Darmstadt
Phenol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Verwendete Primer	Interactiva biotechnologie GmbH, Ulm
Proteinase K	Serva GmbH & Co KGaA, Heidelberg
SDS	Serva GmbH & Co KGaA, Heidelberg
Sequagel complete	BIOzym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
Sequagel XR	BIOzym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
Taq-Polymerase	Pharmacia Biotechnology Inc., Freiburg
Tris	Merck KGaA, Darmstadt
X-Gal	Biomol Feinchemikalien GmbH, Hamburg

3.2.2 Restriktionsenzyme

HhaI: Konzentration 10 Units·μl⁻¹; Schnittstelle: 5'-GCG↓C-3' / 3'-C↑GCG-5' (Invitrogen Life Science, Groningen, Niederlande)

DdeI: Konzentration 10 Units·μl⁻¹; Schnittstelle: 5'-C↓TNAG-3' / 3'-GANT↑C-5' (Invitrogen Life Science, Groningen, Niederlande)

Sau3AI: Konzentration 10 Units·μl⁻¹; Schnittstelle: 5'-↓GATC -3' / 3'-CTAG↓-5' (Amersham Bioscience Europe, Freiburg)

MspI: Konzentration 10 Units·μl⁻¹; Schnittstelle: 5'-C↓CGG-3' / 3'-GGC↑C-5' (New England BioLabs, Frankfurt)

EcoRI: Konzentration 10 Units·μl⁻¹; Schnittstelle: 5'-G↓AATC-3' / 3'-CTAA↑G-5' (Amersham Bioscience Europe, Freiburg)

3.2.3 Nährmedien

Agar Agar, reinst	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Circle Grow Medium	BIO 101, Inc., Vista (USA)
LB Medium	Hergestellt nach MANIATIS et al. 1982
PA Medium (Antibiotic Medium No.3)	Oxoid Limited, Basingstoke (UK)

3.2.4 Kits

Nucleospin Multi-8 Plasmid Kit	Macherey Nagel, Düren
QIAexpress Kit	QIAGEN, Hilden
Spectroquant Ammonium	Merck KGaA, Darmstadt
Spectroquant Nitrat	Merck KGaA, Darmstadt
Spectroquant Nitrit	Merck KGaA, Darmstadt
Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway (USA)
TOPO TA Cloning Kit	Invitrogen Life Science, Groningen (NL)

3.2.5 Puffer und LösungenTAE-Puffer (Tris-Acetat-EDTA-Puffer, MANIATIS et al. 1982):

40 mM Tris-Acetat
2 mM EDTA
pH 8,0

TBE-Puffer (Tris-Borat-EDTA-Puffer, MANIATIS et al. 1982):

89 mM Tris
89 mM Borsäure
2 mM EDTA

TE-Puffer (Tris-EDTA- Puffer, MANIATIS et al. 1982):

10 mM Tris-HCl
1 mM EDTA
pH 8,0

Beschwerungspuffer (bluejuice):

125 mM EDTA (pH 8,0)

44,6 % (v:v) Glycerin

0,125 % (w:v) Bromphenolblau

3.3 Freilandmessungen

3.3.1 Multilevel-Sonden

Zur Porenwasserentnahme aus dem hyporheischen Interstitial der Lahn wurden am Institut für Wasserbau und Wasserwirtschaft der TU Darmstadt entwickelte Multilevel-Sonden verwendet (KRETZER 1992, Abb. 5). Diese ermöglichen eine Entnahme von Porenwasser aus unterschiedlichen Tiefen des hyporheischen Interstitials. Die Multilevel-Sonde besteht aus einer ca. 50 cm langen Stahlröhre mit einer Stahlspitze. In den Stahlmantel sind vier umlaufende Entnahmehorizonte aus porösem Kunststoff integriert, mit einer Tiefenauflösung von 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm.

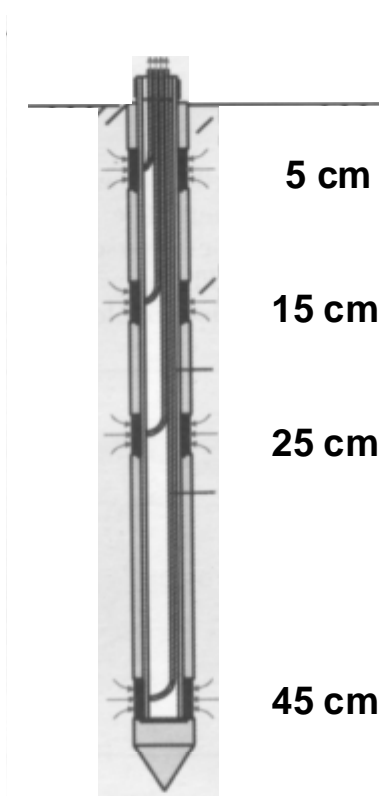


Abb. 5: Querschnitt durch eine Multilevel-Sonde mit den vier Entnahmetiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm.

Die Porenweite des Kunststoffilters beträgt 10 μm . An die Kunststoffilter sind Probenahmeschläuche angebracht, über die mit einem definierten Unterdruck Porenwasser aus den jeweiligen Tiefen simultan entnommen werden kann. Mit einem Rüttler wurden die Sonden in das Interstitial eingebracht. Durch dieses Verfahren konnte ein direkter Kontakt zwischen Kunststoffilter und Probenahmehorizont erreicht werden. Mit Hilfe dieser Multilevel-Sonden konnte über einen längeren Zeitraum Interstitialwasser aus dem Sediment der Lahn entnommen werden. Um eine Kurzschlußströmung aus dem Flußwasserkörper an der Sonde entlang zu vermeiden, wurden die Sonden frühzeitig in das Flußbett der Lahn eingebracht und zusätzlich Manschetten an die Sondenköpfe angebracht, die den Sondenhals fest abschließen (SAENGER 2000). Labortests mit den Sonden ergaben keine Kurzschlußströme zwischen den einzelnen Entnahmetiefen und ergaben für jede Tiefe einen Entnahmehorizont von ca. 5 cm (WITZSCHE 1999). Die aus dem Sediment ragenden Probenahmeschläuche waren mit Plastikstopfen verschlossen und lagen frei auf der Sedimentoberfläche.

3.3.2 Entnahme von Wasserproben aus dem hyporheischen Interstitial der Lahn

Im Probenahmezeitraum von 1999 - 2001 wurden mit Hilfe der Interstitialsonden Wasserproben aus dem Interstitial der Lahn (Transekte I, III, V und VII) entnommen (Tab. 1). Dazu wurden die zuvor geöffneten Probenahmeschläuche mit Teflonschläuchen an Unterdrucksammelbehälter angeschlossen. Diese waren mit Manometer und einem Pumpventil für Unterdruckpumpen versehen, um bei einem einheitlichen Unterdruck von 0,2 bar das Interstitialwasser aus den vier verschiedenen Entnahmehorizonten der Multilevel-Sonden (5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm) zu entnehmen. Zur Eliminierung des Totvolumens in den Teflonschläuchen wurden die ersten 100 ml Wasserprobe verworfen. Zusätzlich wurden Wasserproben direkt aus dem Kläranlagenablauf, aus der fließenden Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes (auf der Höhe von Transekt I) und flußabwärts des Kläranlagenablaufes (auf der Höhe von Transekt VII) mit Hilfe von verschließbaren PE-Flaschen entnommen (Lageplan der Sonden: siehe Kapitel 2).

Tab. 1: Tabellarische Übersicht der Probenahmetermine im Probenahmezeitraum 1999-2001. Es wurden Wasserproben aus der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes, aus dem Klärwasser (KA) und aus den Transekten I, III, V und VII entnommen. Alle Probenahmen wurden bei Niedrigwasser durchgeführt.

Probestelle Probenahmetermin	FW V	Transekt I	Transekt III	KA	Transekt V	Transekt VII	FW N
1999							
06. Juli	x	x	x	x	x	x	x
27. Juli/23. August	x			x	x	x	x
21. September	x	x	x	x	x	x	x
16. November	x	x	x	x	x	x	x
2000							
22. März	x	x	x	x	x	x	x
19. Mai	x	x	x	x	x	x	x
26. Juni	x	x	x	x	x	x	x
10. Juli	x	x	x	x	x	x	x
24. Juli	x	x	x	x	x	x	x
14. August	x	x	x	x	x	x	x
04. September	x	x	x	x	x	x	x
26. September	x	x	x	x	x	x	x
2001							
01. Mai	x	x	x	x	x	x	x
03. Juli	x	x	x	x	x	x	x
16. Oktober	x	x	x	x	x	x	x

3.3.3 Analysen der Interstitialwasserproben

Von den Wasserproben ($n = 3$ Wasserproben a 100 ml) wurden folgende chemisch-physikalische Parameter im Freiland mit Hilfe der portablen Geräten Oxi 96, LF 96 und pH 95 (Wiss. Techn. Werkstätten, Weilheim) bestimmt: Elektrische Leitfähigkeit, pH-Wert und Sauerstoffgehalt, wobei bei der Sauerstoffmessung mit Hilfe eines portablen Magnetrührers (Scienceware, Pequannock, USA) die zur Messung erforderliche Anströmung durch einen Rühraufsatz auf der Sauerstoffsonde erzeugt wurde. Ca. 400 ml der entnommenen Klär-, Oberflächen- und Interstitialwasserproben wurden auf Eis ins Labor transportiert und innerhalb von ca. 5 Stunden zu weiteren Analysen eingesetzt.

Im Labor wurden die Wasserproben auf die Konzentration von Ammonium-N, Nitrat-N und Nitrit-N hin spektrophotometrisch mit Hilfe eines Spektrometers (Kontron Instruments, Zürich) mit externer Kalibrierung untersucht (nach STIEF & NEUMANN 1998). Im Untersuchungsjahr 2001 wurde die Nitratkonzentration der Wasserproben mittels HPLC (High Performance Liquid Chromatography) mit einem Mikroanionentauscher A09 (Sykam, Gilching) gemessen.

3.4 Ermittlung der relativen Anzahl denitrifizierender Bakterien in den Wasserproben

Die Umsetzung von Nitrat zu Nitrit in $\text{mg NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ - die Denitrationspotenz - in den Wasserproben ermittelt. Die Denitrationspotenz nach RHEINHEIMER (1965) stellt ein relatives Maß für die Aktivität und die Anzahl der in der Wasserprobe vorhandenen Mikroorganismen dar, die der entsprechenden physiologischen Gruppe der nitratreduzierenden und denitrifizierenden Bakterien angehören. Zu 5 ml einer Nitratnährlösung wurden 50 ml einer Wasserprobe ($n = 2$) hinzugegeben, für 48 Stunden bei 28 °C inkubiert und danach die Konzentration des gebildeten Nitrit-N photometrisch bestimmt. Eine autoklavierte Wasserprobe des Klärwassers wurde als Negativkontrolle in die Analyse mit einbezogen. Die methodischen Vorarbeiten zeigten, daß die Messung der Denitrationspotenzen eine hohe Aussagekraft besitzt, da parallele Ansätze ($n = 4$) derselben Probenahme nur geringe Abweichungen in der Denitrationspotenz aufwiesen.

3.5 Anreicherung von denitrifizierenden Bakterien

Zur Anreicherung von denitrifizierenden Bakterien wurden ca. 200 µl der Wasserproben in 10 ml einer Nitrat- sowie Nitritlösung (jeweils $n = 2$) in Schraubverschlußröhrchen mit Gummistopfen und Durham-Röhrchen unter anaeroben Bedingungen inkubiert (ALEF 1991). Als Negativkontrolle diente wiederum eine autoklavierte Wasserprobe des Klärwassers. Während der

5 - 15 Tage dauernden Inkubationszeit wurden mögliche Gasbildungen - bei der Denitrifikation entstehen überwiegend N_2O und N_2 (TIEDJE 1994) - mit Hilfe der Durham-Röhrchen nachgewiesen. Als Isolatbezeichnungen wurden 1. Monat, 2. Jahr, 3. laufende Nummer und 4. Probenahmestelle gewählt. Die Transekte tragen dabei die römischen Ziffern I, III, V und VII und die vier verschiedenen Entnahmehorizonte die Buchstaben A = 5 cm, B = 15 cm, C = 25 cm und D = 45 cm.

3.6 Isolierung von denitrifizierenden Bakterien aus den Anreicherungskulturen

In den Durham-Röhrchen wurden die entstehenden gasförmigen Produkte der Denitrifikation gesammelt. Trat eine Gasbildung auf, wurden Nitrat- und Nitritkonzentration der Inkubationslösungen ermittelt. Bei einer vollständigen Reduktion von Nitrat und Nitrit wurden ca. 200 μ l der Bakteriensuspension auf Nitrat- und Nitrit-Komplexmedien ausplattiert und bei 28 °C inkubiert (ALEF 1991). Die Anreicherung von denitrifizierenden Bakterien in einer Nitrit- statt in einer Nitratlösung hat nach ALEF (1991) den Vorteil, daß viele der nicht-denitrifizierenden Bakterien ab einer Konzentration von 0,1 % NO_2 -N gehemmt werden, wovon allerdings fermentative Bakterien nicht betroffen sind (COLE & BROWN 1980). So konnte das Wachstum vieler falsch-positiver Bakterien durch eine Inkubation in Nitritlösung verhindert werden. Auf die zusätzliche Zugabe von Zuckern in die Nitrat- und Nitritlösung wurde verzichtet, da diese vergoren werden können, was eine Gasproduktion zur Folge haben könnte. Die Aminosäuren aus dem Pepton werden nur zu wenigen C-Körpern abgebaut, die nicht vergoren werden können, demnach auch nicht zur Gasproduktion beitragen.

Nach 24 - 48 Stunden wurden aus diesen Mischkulturen durch selektive Überimpfungen Reinkulturen angezogen. Diese Reinkulturen wurden zur Verifizierung der Fähigkeit zur Denitrifikation wiederum in Nitrat- und Nitritlösung in Schraubverschlußröhrchen mit Durham-Röhrchen inkubiert. Nur zweifach positiv getestete Reinkulturen wurden für weitere Untersuchungen verwendet. Nach MAHNE & TIEDJE (1995) gelten nur solche Bakterien als Denitrifikanten, die zwei Kriterien erfüllen: Eine Reduktion von Nitrat bzw. Nitrit muß mit einer Gasproduktion verbunden sein und mit einem Wachstum der Zellen einhergehen. Beiden Kriterien wird mit der hier verwendeten Anreicherungstechnik Rechnung getragen.

3.7 Gesamt DNA-Isolierung

Die Gesamt DNA wurde nach folgendem Protokoll isoliert (verändert, nach AUSUBEL et al. [1994]):

- Inkubation der denitrifizierenden Reinkulturen in ca. 10 ml einer Nitratnährlösung: ü.N. bei 28 ° C.
- 2 ml der Bakteriensuspension zentrifugieren (Tischzentrifuge, 14000 rpm, 2 min).
- Überstand verwerfen.
- Pellet zweimal mit 0,85 % NaCl waschen, Überstand verwerfen (Pellets können bei 4 °C ü.N. oder bei -20 °C länger aufbewahrt werden).

Aufbrechen der Bakterienzellwand:

- Pellet in 756 µl 1 x TE Puffer resuspendieren.
- Zugabe von 40 µl 10 % SDS und 5 µl Proteinase K (20 mg ml⁻¹).
- Inkubation bei 37 °C für 1,5 - 2 h.

Extraktion von Protein/Polysaccharid-Komplexen:

- Ansatz: 133,3 µl 5M NaCl und 106,7 µl CTAB: NaCl Lsg. (10 % [w:v] CTAB; 4,1 % [w:v] NaCl).
- Inkubation bei 65 °C für 15 min.
- Zugabe von 850 µl Chloroform: Isoamylalkohol (24:1, [v:v]).
- Zentrifugation: Tischzentrifuge, 14000 rpm, 10 min.
- Obere (wäßrige) Phase in ein neues 2 ml Cup überführen.
- Zugabe von 850 µl Phenol: Chloroform (1:1, [v:v]).
- Zentrifugation: Tischzentrifuge, 14000 rpm, 10 min.
- Obere (wäßrige) Phase in ein neues 1,5 ml Cup überführen.

DNA-Fällung:

- Zugabe von 470 µl 2-Propanol, vorsichtiges Mischen (DNA fällt aus).
- Zentrifugation: Tischzentrifuge, 14000 rpm, 2 min.
- Überstand verwerfen.
- Zugabe von 470 µl 70 % Ethanol.
- Zentrifugation: Tischzentrifuge, 14000 rpm, 2 min.
- Überstand verwerfen.
- Pellet unter sterilen Bedingungen (Cleanbench) 1-2 h trocknen.
- Pellet in 50 µl 1x TE Puffer aufnehmen.
- Lösen des DNA-Pellets: ü.N. bei 4 °C.

3.8 Quantifizierung und Überprüfung der Reinheit der DNA

Reinheit und Konzentration der DNA-Lösung wurden mit dem Gene Quant II (Pharmacia Biotechnology, Freiburg) ermittelt. Die DNA-Lösung wurde mit 1 x TE Puffer 1:50 verdünnt und

gegen 1 x TE Puffer als Referenz gemessen. Durch Eingabe des Verdünnungsfaktors und der Art der DNA (doppelsträngig oder einzelsträngig) konnten sowohl Konzentration als auch Reinheit der DNA-Lösung bestimmt werden. Hierbei wird das Absorptionsspektrum der DNA-Lösung im Wellenlängenbereich zwischen 220 - 300 nm ermittelt. Der Quotient aus der Absorption bei 260 nm und 280 nm Wellenlänge beträgt für reine DNA-Lösungen ca. 1,8 - 1,9 (AUSUBEL et al. 1994).

Zusätzlich zur Konzentrationsbestimmung durch den Gene Quant II wurden 5 µl der DNA-Lösung mit 2 µl Beschwerungspuffer (Bluejuice) vermischt und in die Geltaschen eines 0,8 %igen (w:v) Agarosegels gegeben. Nach einer Elektrophoresedauer von ca. 20 min bei 100 Volt in 1 x TA wurde das Gel zur Anfärbung der DNA in eine Ethidiumbromidlösung ($0,5 \mu\text{gml}^{-1}$) gegeben und nach ca. 20 - 30 min auf einem UV-Transilluminator ausgewertet. Durch die optische Analyse der Reinheit der DNA auf den entstandenen Gelbildern konnte die DNA-Konzentration, die vom Gene Quant II ermittelt wurde, abgeglichen und gegebenenfalls korrigiert werden.

3.9 Genotypische Charakterisierung und Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien

3.9.1 Polymerase Kettenreaktion - Polymerase Chain Reaction (PCR)

Durch die von SAIKI et al. (1988) entwickelte polymerase Kettenreaktion (PCR) werden spezifische Abschnitte des Genoms mit selektiven einzelsträngigen DNA-Molekülen (Primern) vervielfältigt (amplifiziert). Diese in vitro Technik besteht aus einer dreischrittigen temperaturabhängigen Reaktionsabfolge: Durch hohe Temperaturen denaturiert die DNA (template) in ihre Einzelstränge und beim Abkühlen des Reaktionsgemisches lagern sich die Primer an die komplementäre Sequenz der einzelsträngigen DNA an (Annealing). Schließlich werden die Einzelnukleotide, katalysiert durch eine hitzestabile Polymerase, entsprechend der komplementären Sequenz des Einzelstranges angefügt (Extension). Mit jeder zyklischen Reaktionsabfolge (Denaturierung, Annealing und Extension) wird der Sequenzabschnitt amplifiziert, der sich zwischen den beiden Primern befindet.

3.9.2 PCR der 16S rDNA aus der isolierten Gesamt DNA der denitrifizierenden Bakterien

Die 16S rDNA wird aufgrund ihrer hohen Konserviertheit für taxonomische und phylogenetische Untersuchungen verwendet (STAHL et al. 1988, AMANN et al. 1995). Von der isolierten DNA

wurde eine konzentrierte DNA-Lösung ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) hergestellt, die als template für eine PCR benutzt wurde.

Die PCR wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

H ₂ O (A. bidest.)	37,2 μl
10 x PCR Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)	5 μl
DMSO (optional, sonst A. bidest.)	2,5 μl
Reaktionsmix mit dATP, dCTP, dGTP und dTTP (jeweils 10 mM)	1 μl
Sense Primer ($10 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	1,5 μl
Antisense Primer ($10 \text{ pmol}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	1,5 μl
<i>Taq</i> Polymerase ($10 \text{ Units}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	0,3 μl
Template DNA ($50 \text{ ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$)	1 μl
Reaktionsvolumen	50 μl

Zur Amplifizierung der 16S rDNA aus der isolierten Gesamt DNA wurde ein Thermocycler (Perkin-Elmer, Überlingen) mit folgenden Temperatureinstellungen verwendet (verändert nach VINUESA [1998]):

95 °C	2:45 min	
94 °C	0:10 min	← x 34
93,5 °C	0:45 min	
56,5 °C	0:30 min	
72 °C	2:00 min	
72 °C	6:00 min	
4 °C	∞	

Zur Effizienzkontrolle und zur Ermittlung der Länge des amplifizierten DNA-Fragments wurde das PCR-Produkt durch eine Elektrophorese in einem 0,8 %igem Agarosegel in 1 x TA aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Ein 1 kb Leiter (GIBCO BRL, Eggenstein) wurde in der mittleren und in den äußeren Taschen des Gels als Referenz mit aufgetragen.

3.9.3 Detektierung des Nitritreduktasetyps mittels Touchdown-PCR

Die Fähigkeit der aus der Lahn isolierten Bakterien zur Denitrifikation bzw. die genetische Codierung der zur Denitrifikation benötigten Enzyme wurden mit Hilfe der Primerkombination von BRAKER et al. (1998) verifiziert. Mit dieser Primerkombination konnten DNA-Fragmente

der die Nitritreduktase codierenden Gene amplifiziert werden, wobei die *NirS*-Primer DNA-Fragmente der cytochrom-*cd*₁-haltigen Nitritreduktase (*nirS*) und die *NirK*-Primer DNA-Fragmente der kupferhaltigen Nitritreduktase (*nirK*) einschließen.

Für diese Amplifizierung wurde eine Touchdown-PCR durchgeführt. Bei einer Touchdown-PCR werden in den ersten Zyklen hohe Annealingtemperaturen eingesetzt, um eine unspezifische Anlagerung der Primer zu verhindern. In den weiteren Zyklen kann die Annealingtemperatur gesenkt werden, um eine vermehrte Anlagerung und Amplifizierung zu erreichen (DON et al. 1991).

Die PCR wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

H ₂ O (A. bidest.)	37,2 µl
10 x PCR Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)	5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	2,5 µl
DMSO (optional, sonst A. bidest.)	2,5 µl
Reaktionsmix mit dATP, dCTP, dGTP und dTTP (jeweils 10 mM)	1 µl
Sense Primer (10 pmol µl ⁻¹)	1,5 µl
Antisense Primer (10 pmol µl ⁻¹)	1,5 µl
<i>Taq</i> Polymerase (10 Units µl ⁻¹)	0,3 µl
Template DNA (50 ng µl ⁻¹)	1 µl
Reaktionsvolumen	50 µl

Für diese Touchdown-PCR wurden folgende Temperatureinstellungen (verändert nach Braker et al. [1998]) verwendet:

95 °C	10:00 min	
95 °C	1:00 min	← x 37
65 °C*	1:30 min	
72 °C	1:30 min	
72 °C	10:00 min	
4 °C	∞	

* = Die Annealingtemperatur wurde pro Zyklus um 0,5 °C erniedrigt (von 65 °C auf 46,5 °C)

Zur Ermittlung der Länge des amplifizierten DNA-Fragments wurde das PCR-Produkt durch eine Elektrophorese in einem 0,8 %igem Agarosegel in 1 x TA aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Ein 1 kb Leiter (GIBCO BRL, Eggenstein) wurde in der mittleren und in den äußeren Taschen des Gels als Referenz mit aufgetragen.

3.9.4 Phylogenetische Analyse der denitrifizierenden Bakterien mittels Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA)

Nach der erfolgreichen Amplifizierung der 16S rDNA wurden die ca. 1500 bp langen DNA-Fragmente mit den vier Enzymen *HhaI*, *DdeI*, *Sau3AI* und *MspI* (Amersham Bioscience Europe, Freiburg) nach folgendem Protokoll restringiert (Tab. 2):

Tab. 2: Tabellarische Darstellung der Zusammensetzung des Ansatzes zur Restriktion der zuvor amplifizierten 16S rDNA durch die vier Enzyme *HhaI*, *DdeI*, *Sau3AI* und *MspI* (nach VINUESA 1998)

<i>HhaI</i>		<i>DdeI</i>		<i>Sau3AI</i>		<i>MspI</i>	
Bi dest	9,4 µl	Bi dest	9,2 µl	Bi dest	9,2 µl	Bi dest	9,2 µl
Puffer 4	2 µl	Puffer 3	2 µl	Puffer H	2 µl	Puffer L	2 µl
<i>HhaI</i>	0,4 µl	<i>DdeI</i>	0,8 µl	<i>Sau3AI</i>	0,8 µl	<i>MspI</i>	0,8 µl
BSA	0,2 µl						
Template DNA	8 µl	Template DNA	8 µl	Template DNA	8 µl	Template DNA	8 µl
Restriktions- ansatz	20 µl		20 µl		20 µl		20 µl

Die 16S rDNA der isolierten denitrifizierenden Bakterien wurde mit dem Enzym *Sau3AI* am seltensten geschnitten (durchschnittliche Fragmentanzahl 3,93), wogegen beim Enzym *HhaI* mit 4,56 die größte durchschnittliche Fragmentanzahl festgestellt werden konnte (Tab. 3).

Tab. 3: Tabellarische Darstellung der durchschnittliche Fragmentanzahl der 16S rDNA der isolierten Bakterien nach der Restriktion mit den Enzymen *DdeI*, *Sau3AI*, *HhaI* bzw. *MspI*.

Enzym	Durchschnittliche Fragmentanzahl
<i>DdeI</i>	4,19
<i>Sau3AI</i>	3,93
<i>HhaI</i>	4,56
<i>MspI</i>	4,48

In einer Elektrophorese wurde die geschnittene DNA auf einem 2 %igen Metaphoragarosegel (Biozym, Hess. Oldendorf) in TBE Puffer bei 55 V für 2,8 h aufgetrennt. Um eine Vergleichbarkeit von verschiedenen Gelen zu erreichen wurde als Referenz an beiden Seiten und in der Mitte des Gels ein 100 bp Leiter (GIBCO BRL, Eggenstein) eingesetzt. Die Gele wurden im Ethidiumbromidbad für ca. 20-30 min gefärbt und mit Hilfe einer Geldokumentationsanlage (INTAS, Göttingen) durch UV-Licht sichtbar gemacht, durch eine Videokamera digitalisiert und als tif-Datei gespeichert.

3.9.5 Computergestützte Auswertung der Restriktionsfragmentlängen

Die erhaltenen Banden der DNA-Fragmente wurden in die Computersoftware GelCompar (Version 4.0, Applied-Math, Kortrijk, Belgien) eingelesen, definiert und mit Hilfe des Längenmarkers normalisiert. Für die Clusteranalyse der Restriktionsfragmente der einzelnen Isolate wurde der Algorithmus UPGMA (Unweighted pair-group method arithmetic average, SOKAL & MICHENER 1958) in Verbindung mit dem Dice-Koeffizienten (HEYNDRICKX et al. 1996) angewendet.

3.9.6 MicroLog-System (Biolog Inc., Hayward, USA)

Auf eine Vorsortierung der Bakterien nach dem Gramverhalten wurde verzichtet, da besonders Gram-positive Bakterien durch schlechte Kultivierbarkeit, nicht logarithmische Wachstumsphasen und durch die Zusammensetzung des Mediums Tendenzen zur Entfärbung zeigen (HOCH 1999). Die Identifizierung der isolierten Bakterien mittels des MicroLog-Systems wurde nach Angaben des Herstellers nach folgendem Protokoll durchgeführt:

Anzucht der Bakterien:

- Denitrifizierende Isolate in ca. 10 ml 20E Flüssigmedium suspendieren und ü.N. bei 28 °C inkubieren.
- Zur Reinheitskontrolle die Isolate jeweils auf zwei 20E Platten ausstreichen.

Waschen der Bakterien:

- 2 ml der Bakteriensuspension zentrifugieren (5000 rpm; 2 min).
- Überstand verwerfen.
- Pellet zweimal mit NaCl (0,85 %) waschen und anschließend mit 1 ml NaCl (0,85 %) versetzen.
- Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm im Photometer.

Verdünnung der Bakteriensuspension für die MicroLog-Platten:

- Die Konzentration der Bakteriensuspension liegt bei ca. 1×10^9 Keime ml⁻¹, wenn bei einer Wellenlänge von 600 nm die optische Dichte der Bakteriensuspension 1 beträgt.
- Die gewünschte Verdünnung für die MicroLog-Platten beträgt ca. 5×10^8 Keime ml⁻¹.
- In die pro Platte vorhandenen 96 Vertiefungen jeweils 150 µl Bakteriensuspension pipettieren (insgesamt ca. 15 ml).

Inkubation und Messungen der MicroLog-Platten:

- Die MicroLog-Platten bei 28 °C unter Lichtabschluß inkubieren.

- Nach 4, 6, 16 und 24 h wird die Absorption bei 595 nm mit Hilfe des Mikroplatten-Lesegeräts Emax (Molecular Devices, München) für die einzelnen Zellsuspensionen bestimmt, wobei bei den ersten drei Messungen der Deckel der Platten aus Sterilitätsgründen nicht entfernt wurde. Nur bei der Messung nach 24 h wurde die Absorption ohne den Deckel der Platten ermittelt.
- Zusätzlich zur Absorption wurde eine Sichtkontrolle der Platten durchgeführt.

Auswertung der MicroLog-Daten:

- Die gesammelten Daten wurden mit Hilfe des Computerprogramms MicroLog 4.2 mit Hilfe der MicroLog Datenbanken GN und GP 6.01 (Biolog Inc., Hayward, USA) ausgewertet. Mit diesem Programm können die unterschiedlichen Bakterienisolate physiologisch analysiert und durch einen Datenbankabgleich mit bekannten Bakterien identifiziert bzw. näher charakterisiert werden.

3.9.7 Nachweis der Produktion von Fluorescein durch die isolierten denitrifizierenden Bakterien

Zur Ergänzung der physiologischen und molekulargenetischen Untersuchungen wurden fluoreszierende Pseudomonaden direkt identifiziert. Die denitrifizierenden Isolate wurden dazu auf KingB Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 28 °C inkubiert. Unter UV-Licht wurde kontrolliert, ob die Bakterien Fluoreszenz zeigten.

3.9.8 Statistische Auswertung

Die statistische Analyse der Freiland- und Labordaten wurde mit dem Computerprogramm SPSS (SPSS 11.5, SPSS Inc., München) durchgeführt. Zur Überprüfung der Daten auf Normalverteilung wurde der Kolmogorov-Smirnov-Test verwendet. Es wurden die nicht-parametrischen Tests Mann-Whitney-U- und Kruskal-Wallis-Test durchgeführt, da die Anzahl der Stichproben nicht ausreichend oder eine Normalverteilung der Daten nicht gewährleistet war.

3.9.9 Agarstrichverfahren: Test auf Wachstumshemmung bei Referenzbakterien verursacht durch fluoreszierende Pseudomonaden

Die als fluoreszierende Pseudomonaden charakterisierten Isolate wurden mit Hilfe des Agarstrichverfahrens auf die Produktion von antibiotisch wirksamen Substanzen hin untersucht (in Zusammenarbeit mit Dr. Suresh Babu Selvaraju).

Die zu testenden fluoreszierenden Pseudomonaden wurden jeweils in der Form eines dicken Impfstriches in der Mitte von LB-Medium Agarplatten ausgestrichen (je eine Platte für jedes Bakterium). Nach einer zweistündigen Inkubation bei 28 °C wurden Übernachtskulturen der Referenzstämme *Agrobacterium tumefaciens* 30150 DSM, *Azospirillum spec.*, *Escherichia coli* K12, *Rhizobium trophici* CIAT 899 und *Rhizobium etli* Cli 80 senkrecht zum Impfstrich des fluoreszierenden Pseudomonaden hin ausgestrichen. Die Platten wurden danach für 1 - 2 Tage bei 28 °C inkubiert. Die Mikroorganismen, die sensitiv gegenüber den antibiotisch wirksamen Substanzen des jeweiligen fluoreszierenden Pseudomonaden sind, können in seiner unmittelbaren Umgebung nicht wachsen. Die auftretenden Hemmhöfe bzw. ein unbeeinflusstes Wachstum der Referenzstämme wurden dokumentiert.

3.9.10 Nachweis von *hsdA*, ein für den Steroidabbau essentielles Gen von *Comamonas testosteroni*

Für den molekulargenetischen Nachweis der Fähigkeit zum Steroidabbau bei den *Comamonadaceae* wurde ein Primerpaar von Dr. Xiong verwendet (MASER et al. 2001, XIONG & MASER 2001). Mit Hilfe dieser Primer kann ein Teilfragment der Genregion der 3 α -Hydroxysteroid Dehydrogenase/Carbonyl Reduktase (*hsdA*) von *Comamonas testosteroni* amplifiziert werden. *Comamonas testosteroni* wurde als Positivkontrolle verwendet. Für die Amplifizierung wurde der gleiche PCR-Ansatz und die gleiche zyklische Reaktionsabfolge wie für die 16S rDNA PCR verwendet (siehe Kapitel 3.9.1). Zur Ermittlung der Länge des amplifizierten DNA-Fragments wurde das PCR-Produkt durch eine Elektrophorese in einem 0,8 %igem Agarosegel in 1 x TA aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Ein 1 kb Leiters (GIBCO BRL, Eggenstein) wurde in der mittleren und in den äußeren Taschen des Gels als Referenz mit aufgetragen.

3.10 Sterilisation von Verbrauchsmaterialien und Nährmedien

Die verwendeten Gefäße, Kunststoffartikel sowie hitzestabile Nährmedien und Lösungen wurden bei 121 °C für 20 min bei 1 bar Überdruck autoklaviert. Die Sterilisation von Glasgeräten erfolgte bei 180 °C für mindestens 2,5 h. Nicht hitzebeständige Lösungen wurden mit Hilfe von Einmal-Filtern (Rotrand - 0,2 mm - steril - pyrogen-frei) sterilfiltriert.

3.11 Bakterienstämme

Stämme	Referenz
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> 30150 DSM	DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen)
<i>Azospirillum</i> spec.	DSMZ
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	HANAHAN (1983)
<i>Escherichia coli</i> K12	DSMZ
<i>Pseudomonas fluorescens</i> W 24	REDECKER et al. (1999)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> W 34	REDECKER et al. (1999)
<i>Rhizobium trophici</i> CIAT 899	MARTINEZ et al. (1985)
<i>Rhizobium etli</i> Cli 80	DSMZ

3.12 Primer

Es wurden Primer für die Amplifizierung verschiedener DNA-Fragmente sowie für die direkte Sequenzierung mittels PCR verwendet. Die DNA-Konzentration der jeweiligen Primerlösung wurde durch Verdünnen mit A. bidest. auf die benötigte Molarität eingestellt.

Folgende Primer wurden bei der PCR eingesetzt:

Für die Amplifizierung der 16S rDNA-Region (WEISBURG et al. 1991):

fDI: 5' – AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG – 3'

rDI: 5' – AAG GAG GTG ATC CAG CC – 3'

Erwartete Fragmentgröße: ca. 1500 bp

Für die Amplifizierung von DNA-Fragmenten des Nitritreduktasegenes (BRAKER et al. 1998):

Cytochrom-*cd₁*-haltige Nitritreduktase NirS (1682 bp)

nirS1F: 5' – CCT AYT GGC CGC CRC ART – 3'

nirS6R: 5' – CGT TGA ACT TRC CGG T – 3'

Erwartete Fragmentgröße: 890 bp

Kupferhaltige Nitritreduktase NirK (1130 bp)

nirK1F: 5' – GCR ATG GTK CCS TGG CA – 3'

nirK5R: 5' – GCC TCG ATC AGR TTR TGG – 3'

Erwartete Fragmentgröße: 514 bp

Für die Sequenzierung wurden folgende Primer verwendet.

M13f: 5' – GTA AAA CGA CGG CCA GT – 3'

M13r: 5' – CAG GAA ACA GCT ATG ACC – 3'

IUB-Code:

R = A/G

Y = C/T

M = C/A

K = G/T

W = A/T

S = C/G

B = C/G/T

D = G/A/T

H = A/C/T

V = A/C/G

N = A/C/G/T

3.13 Nährmedien

Zur Anreicherung von denitrifizierenden Bakterien wurde ein Nitrat- sowie Nitritmedium nach ALEF (1991) verwendet:

Nitratmedium:

5 g Pepton aus Fleisch

3 g Fleischextrakt

1, 5 g Kaliumnitrat

A. bidest. ad 1000 ml

pH 6,8

Nitritmedium:

5 g Pepton aus Fleisch

3 g Fleischextrakt

1, 5 g Natriumnitrit

A. bidest. ad 1000 ml

pH 6,8

KingB [Pseudomonas Agar F Base] (Merck KGaA, Darmstadt):

Dieses Fertigmedium mit der exakten Bezeichnung Pseudomonas Agar F Base wurde nach Angaben des Herstellers in A. bidest. gelöst und vor Gebrauch autoklaviert.

20E Medium (WERNER et al. 1975):

4,6 g Glycerin

2,0 g Hefeextrakt
1,82 g Mannit
506 mg KNO₃
370 mg MgSO₄ x 7 H₂O
87 mg K₂HPO₄
73,5 mg CaCl₂ x 2 H₂O
68 mg KH₂PO₄
9,3 mg EDTA-Na₂
6,95 mg FeSO₄ x 7 H₂O
4,84 mg Na₂MoO₄ x 2 H₂O
A. bidest. ad 1000 ml
pH 6,8

Circle Grow Medium (BIO 101, Vista, USA):

Das Fertigmedium wurde nach Angaben des Herstellers in A. bidest. gelöst und vor Gebrauch autoklaviert. Das Circle Grow Medium hat den Vorteil, daß *Escherichia coli* darin sehr schnell wächst, so daß eine Flüssigkultur bereits 8 h nach dem Animpfen für die Plasmidisolierung geerntet werden kann. Das Medium eignet sich allerdings weder für die Stammhaltung noch für Agarplatten, da die Bakterien in Circle Grow Medium relativ schnell absterben.

LB Medium (MANIATIS et al. 1982):

10 g Pepton
5 g Hefeextrakt
5 g NaCl
A. bidest. ad 1000 ml
pH 7,5

LBG Medium (MANIATIS et al. 1982):

Dieses Medium entspricht dem LB-Medium, unter Zusatz von 1 g Glucose pro Liter Medium.

PA Medium (Oxoid, Basingstoke, UK):

Dieses Fertigmedium mit der exakten Bezeichnung Antibiotic Medium No.3 wurde nach Angaben des Herstellers in A. bidest. gelöst und vor Gebrauch autoklaviert.

Zur Herstellung von Agarnährmedien wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren Agar Agar in einer Konzentration von 15 g·l⁻¹ zugesetzt.

3.14 Konzentrationen von Antibiotika und anderen Zusätzen

Antibiotika	Lösungsmittel	Konzentration im Medium (w:v)
Ampicillin	A. bidest.	50 mg·l ⁻¹
Kanamycin	A. bidest.	50 mg·l ⁻¹
5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranoside	DMF	40 mg·l ⁻¹

3.15 Anzuchtbedingungen und Stammhaltung von Bakterienkulturen

Die isolierten Bakterien, wie auch *Comamonas testosteroni* und die *Pseudomonas fluorescens* Stämme W 24 und W 34 wurden unter konstanten Temperaturbedingungen in einem Brutschrank bei 28 °C angezogen, die Kulturen von *E. coli* bei 37 °C. Eine selektive Anzucht wurde durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika zum Nährmedium erreicht.

Die Stammhaltung der isolierten denitrifizierenden Bakterien erfolgte auf Agarplatten mit Nitratmedium, bei *E. coli* mit PA-Medium. Sie wurden nach der Anzucht bei 4 °C aufbewahrt. Des weiteren wurden Kulturen in Form von Glycerinkulturen gelagert: 0,5 ml einer spätlogarithmischen Flüssigkultur der isolierten Bakterien wurden zur Herstellung einer Glycerinkultur zu 0,5 ml Glycerin gegeben. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C oder -75 °C.

3.16 Transformation und Minipräparation von Plasmiden

Mit den erhaltenen PCR-Produkten wurden mittels des TA cloning kit (Invitrogen Corporation, San Diego, USA) nach den Angaben des Herstellers Klone hergestellt. Die rekombinanten Plasmide der Klone wurden mit Hilfe des QIAprep spin Miniprep Kit (Qiagen AG, Hilden) bzw. mit Hilfe des Nucleospin Multi-8 Plasmid Kit (Macherey Nagel, Düren) nach den jeweiligen Angaben des Herstellers isoliert. Um das PCR-Produkt zu separieren, wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe des Enzyms *EcoRI* geschnitten und zur Ermittlung der Fragmentlänge durch eine Elektrophorese in einem 0,8 %igem Agarosegel in 1 x TA aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und mittels UV-Licht sichtbar gemacht. Ein 1 kb Leiters (GIBCO BRL, Eggenstein) wurde in der mittleren und in den äußeren Taschen des Gels als Referenz mit aufgetragen.

3.17 Sequenzierung

3.17.1 Sequenzierreaktion mit Hilfe der PCR

Die Sequenz der 16S rDNA Fragmente wurde mit Hilfe des Thermo Sequenase DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA) nach den Empfehlungen des Herstellers (den vorliegenden Gegebenheiten angepaßt) ermittelt:

DMSO	1,0 µl
Reaktionsmix mit ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP (2 pmol·µl ⁻¹)	1,0 µl
Primer M 13 (10 pmol·µl ⁻¹)	1,1 µl
Template DNA (300 ng·µl ⁻¹)	15,0 µl

Für diese PCR wurden folgende Einstellungen (nach Angaben des Herstellers) verwendet:

95 °C	3:00 min		
95 °C	0:20 min	←	x 29
60 °C	0:30 min	_____	
70 °C	0:30 min	_____	
95 °C	0:20 min	←	x 29
70 °C	0:30 min	_____	
4 °C	∞		

Die Reaktion wurde nach Beendigung der PCR mit 2,5 µl der im Kit enthaltenen Stop-Solution gestoppt. Die Lagerung der PCR-Produkte erfolgte bei 4 °C oder -20 °C unter Lichtabschluß.

3.17.2 Polyacrylamid Gelelektrophorese mit Hilfe des LICOR DNA-Sequencers

Die Handhabung des DNA-Sequencers erfolgte nach den Empfehlungen des Herstellers. Zwei Glasplatten für das Polyacrylamidgel wurden gereinigt, mit 96 % EtOH abgerieben und in die Gelapparatur gespannt. Das Polyacrylamidgel wurde aus den Fertiglösungen Sequagel XR (24 ml), Sequagel complete (6 ml) und APS-Lösung (300 µl) hergestellt (BECKER 2002). Nach 2 Stunden Polymerisierungszeit wurde die Geltasche gereinigt und ein Kamm mit 64 Taschen über die Gelfront gesetzt, so daß insgesamt 16 Sequenzierungen gleichzeitig aufgetrennt und durch den Licor DNA-sequencer model 4000 ausgewertet werden konnten. Je nach Qualität der Sequenzierreaktion wurden 0,8 – 1,5 µl eines Reaktionsansatzes aufgetragen. Als Puffer der

gelelektrophoretischen Auftrennung fungierte TBE-Puffer. Sie verlief unter folgenden Bedingungen:

Elektrische Spannung	1500 V
Stromstärke	20 - 35 mA
Leistung	30 - 31,5 W
Temperatur	50 °C

Der DNA-Sequencer detektiert mit Hilfe eines Laserscanners die fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente. Unter optimalen Bedingungen können bis 800 bp einer DNA-Sequenz ermittelt werden.

3.17.3 Auswertung der Sequenzdaten

Anhand des vom Sequencer generierten Gelbildes wurde die Nukleotidsequenz der DNA ermittelt. Für die weitere Auswertung der Sequenzdaten wurden folgende Computerprogramme genutzt:

Wordpad (Microsoft Corporation, Redmond, USA)

Genmon 4.3 (GBF, Braunschweig)

GeneCompar 1.3 (Applied Maths, Kortrijk, Belgien)

Mega 2.1 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis)

ClustalX (THOMPSON et al. 1997)

Bioedit (Tom Hall, Department of Microbiology, NCSU, USA)

Die Sequenzen wurden via Internet mit den Datenbanken des NCBI (National Centre for Biotechnology Information, USA) mittels der internen Software blastn (nucleotide - Basic Local Alignment Search Tool) durchgeführt (ALTSCHUL et al. 1990).

3.18 Vergleich der Methoden und die Einschätzung ihrer spezifischen Anwendbarkeit

Das MicroLog-System zeigte deutliche Unterschiede in der Auswertbarkeit bei der Identifizierung von Gram negativen und Gram positiven Bakterien. So konnten z.B. Bakterien, die laut der 16S rDNA Sequenzierung das Gram positive Bakterium *Bacillus cereus* darstellen, nicht mit dem MicroLog-System identifiziert werden. Trotz Anpassungen des MicroLog-Systems, wie z.B. Einsatz verschiedener Verdünnungsstufen oder Auswertung der Kohlenstoffverwertung schon

nach 4 - 8 Stunden, konnten viele der isolierten denitrifizierenden Bakterien nicht eindeutig bestimmt werden. So war auch eine eindeutige taxonomische Zuordnung bis auf Artniveau bei einigen denitrifizierenden Isolaten durch das MicroLog-System nicht möglich. Allerdings weist der Hersteller auch darauf hin, daß dieses System in erster Linie für den pharmazeutisch-medizinischen Bereich optimiert ist, wogegen die Identifizierungsrate von Bakterien aus weniger untersuchten Habitaten erniedrigt ist (HOCH 1999). Für die Identifizierung von Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Comamonas* und *Alcaligenes* kann zumindest für die Gattungsbestimmung das MicroLog-System eingesetzt werden, wogegen es bei anderen Isolaten teilweise zu einer divergierenden Identifizierung durch das MicroLog-System und die 16S rDNA Sequenzanalyse kam. Beispielsweise wurde ein mittels 16S rDNA Sequenzanalyse als *Acinetobacter* Spezies identifiziertes Bakterium vom MicroLog-System als *Pseudomonas pseudoalcaligenes* eingestuft.

Im Zuge dieser Untersuchung zeigte sich, daß den Identifizierungsdatenbanken des MicroLog-Systems insbesondere Stämme aus verschiedenen natürlichen Habitaten fehlen und die Wachstumsbedingungen dieser phänotypischen Identifizierungsmethode für einige aquatische Mikroorganismen nicht adäquat sind. Demnach ist das MicroLog-System für die Identifizierung von aus natürlichen Habitaten isolierten Bakterien, insbesondere von Gram positiven Bakterien, nur eingeschränkt einsetzbar. So wird in der vorliegenden Untersuchung den Identifizierungsergebnissen der 16S rDNA Sequenzanalyse ein höherer Stellenwert eingeräumt als denen des MicroLog-Systems.

Die Sequenzanalyse der 16S rDNA wird aufgrund der hohen Konserviertheit der 16S rDNA für taxonomische und phylogenetische Untersuchungen verwendet (STAHL et al. 1988, AMANN et al. 1995). Mit Hilfe der Sequenzanalyse konnte der überwiegende Teil der isolierten denitrifizierenden Bakterien bis auf Artniveau identifiziert werden. Insbesondere bei den *Comamonadaceae* und den Pseudomonaden ermöglichte die Sequenzanalyse aufgrund einer geringen Sequenzähnlichkeit ($\leq 97\%$) mit den 16S rDNA Sequenzen der in den Datenbanken enthaltenen Organismen keine eindeutige Artidentifizierung. Jedoch konnten viele der Pseudomonaden aufgrund der weiteren Charakterisierung der untersuchten Isolate mittels MicroLog-System, Produktion von Fluorescein und Wachstumshemmung bei Referenzbakterien als *Pseudomonas fluorescens* und *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert werden.

Die Kombination der physiologischen und molekulargenetischen Identifizierungsmethoden konnte überwiegend die Gruppierung der Isolate durch die ARDRA-Analyse bestätigen. Die ARDRA-Methode ermöglicht eine Typisierung und Einteilung von verschiedensten phylogenetischen Gruppen aufgrund der Restriktionsfragmentlängen ihrer 16S rDNA (HEYNDRICKX et al. 1996). Diese Methode ermöglicht es, Bakterien auf Gattungs- bzw.

Artniveau zu unterscheiden, entwickelt aber keine ausreichende taxonomische Tiefe, um Stämme innerhalb einer Spezies zu differenzieren (FOX et al. 1992). So zeigt die ARDRA-Methode in Bezug auf die Gruppierung der Pseudomonaden teilweise eine geringe Trennschärfe innerhalb der Gattung *Pseudomonas*, während innerhalb der Arten *Bacillus cereus*, *Klebsiella pneumoniae* und anderen z.T. große Unterschiede in den Restriktionsfragmentlängen auftraten. Dadurch wurden in bestimmten Fällen Stämme derselben Art unterschiedlichen ARDRA-Gruppen zugeordnet. Jedoch ist die innerhalb dieser Spezies auftretende Heterogenität bezüglich der 16S rDNA allgemein bekannt und wurde auch in dieser Untersuchung bestätigt. Demnach ist die ARDRA-Methode zwar für eine eindeutige Differenzierung von Spezies nur eingeschränkt einsetzbar, eignet sich aber, wie in der vorliegenden Untersuchung bestätigt, für eine Bestimmung der Diversität und für eine Detektierung von Veränderungen in einer Bakterienpopulation.

4 ERGEBNISSE

Im Rahmen dieser Untersuchung wurden von Juli 1999 bis Oktober 2001 an 14 Probenahmeterminen Interstitial- und Oberflächenwasserproben aus der Lahn und Wasserproben aus dem Kläranlagenablauf der Kläranlage Sarnau entnommen und in Hinblick auf physikalisch-chemische Parameter, Denitrationspotenz und denitrifizierende Bakterien untersucht.

4.1 Physikalisch-chemische Parameter

Zur Ermittlung der chemisch-physikalischen Parameter des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers wurden die Ammonium-, Nitrat- und Nitritkonzentration sowie Sauerstoffkonzentration, pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit an jedem Probenahmetermin bestimmt, und dabei Daten über die Stickstoffparameter des Klärwassers vom Betreiber der Kläranlage Sarnau (Abwasserverband Lahn-Weschaft) miteinbezogen.

4.1.1 Ammonium-, Nitrat- und Nitritkonzentrationen des Klärwassers

Während des Probenahmezeitraumes von 1999-2001 wurden Änderungen in der Stickstoffzusammensetzung des Klärwassers gemessen. Diese Veränderungen standen in Zusammenhang mit dem Ausbau der Kläranlage Sarnau von 15.500 Einwohnerwerten (EW) auf 24.000 EW im Jahr 2000. Im März 2000 wurde der erste Teil der 3. Reinigungsstufe zur biologischen Stickstoff- und Phosphatelimination - die Nitrifikationsstufe - in Betrieb genommen und im Dezember 2000 folgte mit der Denitrifikationsstufe der zweite Teil der 3. Reinigungsstufe.

Zu Beginn der Untersuchung im Juli 1999 wurde die Lahn durch den Abwassereintrag der Kläranlage mit Maximalwerten bis zu $16 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ einer hohen Ammoniumbelastung ausgesetzt (Abb. 6). Bis März 2000 betragen die gemessenen Ammoniumkonzentrationen im Abwasser durchschnittlich $6,1 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ (Abb. 7). Die Messungen des Kläranlagenbetreibers (Betreiberdaten werden im folgenden mit BD abgekürzt) ergaben mit durchschnittlich $9,1 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ sogar eine noch höhere Belastung. Zwischen März 2000 und Ende Dezember 2000 sank die Ammoniumkonzentration im Kläranlagenablauf bis auf ca. $1,0 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ (BD: $1,7 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Ab Januar 2001 stieg der Ammoniumgehalt des Klärwassers wieder und lag durchschnittlich bei einer Ammoniumkonzentration von ca. $2,6 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ (BD: $2,5 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Bis März 2000 wurden im Klärwasser Nitratkonzentrationen von durchschnittlich $1,7 \text{ mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ gemessen (BD: $2,8 \text{ mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Ab März 2000 stieg die Nitratkonzentration im Kläranlagenabfluß temporär bis auf $21 \text{ mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$. Durchschnittlich lag die $\text{NO}_3\text{-N}$ -Konzentration von März bis Dezember 2000 bei $6,8 \text{ mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ (BD: $12,6 \text{ mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Ab

Dezember 2000 sank die Konzentration an Nitrat-N im Klärwasser wieder auf - im Mittel - 4,8 mg $\text{NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ (BD: 2,5 mg $\text{NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$).

Bezüglich der Nitritkonzentration konnten keinen deutlichen Änderungen der Konzentration im Klärwasser während des gesamten Probenahmezeitraumes gemessen werden. Durchschnittlich lag die Konzentration bei ca. 0,2 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$. Während des gesamten Probenahmezeitraumes wurde ein Wert von 1 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ nicht überschritten. Eine Ausnahme gab es im Februar 2000, als mit 3,1 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ einmalig ein Wert von über 1 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ gemessen wurde. Nach Daten des Kläranlagenbetreibers wurden in den Winter- und Sommermonaten regelmäßig Nitritkonzentrationen im Klärwasser von über 0,5 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ gemessen (Abb. 6).

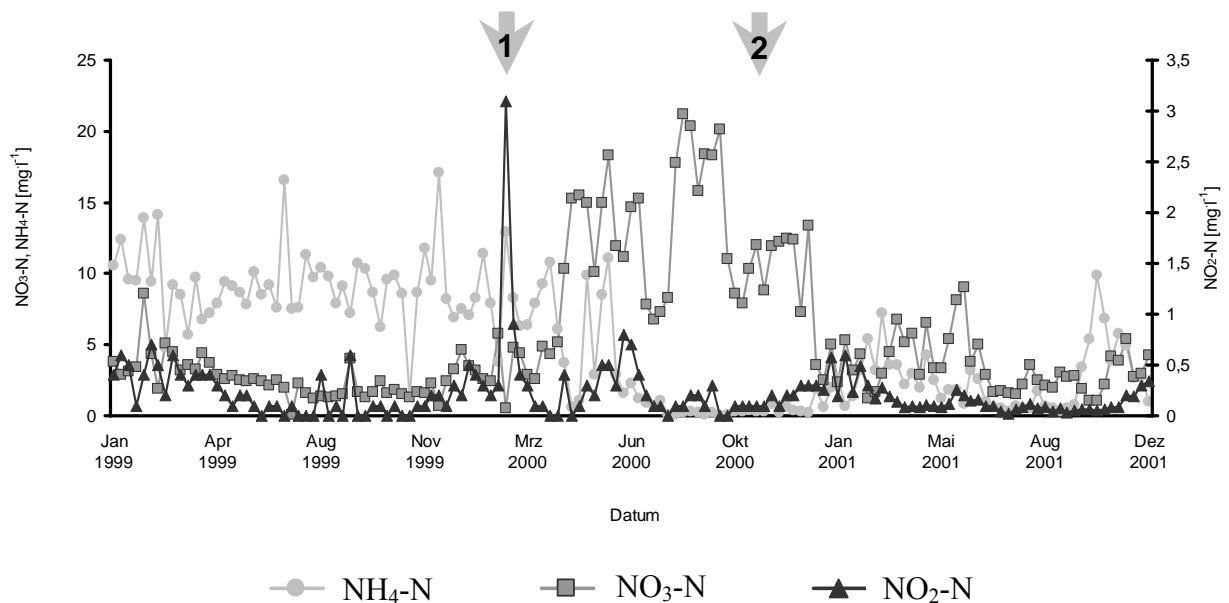


Abb. 6: Graphische Darstellung der Ammonium-, Nitrat- und Nitritkonzentration im Klärwasser der Kläranlage Sarnau in den Jahren 1999 bis 2001 (Daten des Abwasserverbandes Lahn-Wetschaft). Der erste graue Pfeil (1) markiert den Zeitpunkt der Inbetriebnahme der Nitrifikationsstufe, der zweite graue Pfeil (2) markiert den Zeitpunkt der Inbetriebnahme der Denitrifikationsstufe in der Kläranlage Sarnau.

4.1.2 Ammoniumkonzentrationen des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers

Mit dem Klärwasser wurden von Juli 1999 bis März 2000 durchschnittlich 6,1 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ in die Lahn eingetragen (Abb. 7). Die Ammoniumkonzentration in der fließenden Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes stieg dadurch im Vergleich zur fließenden Welle flußaufwärts signifikant von 0,19 auf bis zu 0,85 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ (Mann-Whitney U-Test: $p = 0,011$).

Die Ammoniumkonzentration im Interstitial der Transekte I und III flußaufwärts des Kläranlagenablaufes unterschied sich dagegen nicht deutlich von der des Transektes V flußabwärts des Kläranlagenablaufes. Die Werte der Ammoniumkonzentration lagen durchschnittlich zwischen 0,00 bis 0,03 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$. In der Sedimenttiefe von 5 cm lag bei

diesen drei Transekten eine signifikant höhere Konzentration an $\text{NH}_4\text{-N}$ vor, als in den tieferen Schichten (15 - 45 cm) (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,033$).

Signifikant höhere Ammoniumkonzentrationen wurden in den Sedimenttiefen des Transektes VII gemessen (Kruskal-Wallis-Test: $p = 0,011$), wobei im September 1999 mit einer $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentration von $1,56 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ in der Sedimenttiefe von 5 cm dieses Transektes die höchste Ammoniumkonzentration gemessen wurde. In diesem Transekt wurden mit durchschnittlich $0,63 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1} \text{ NH}_4\text{-N}$ die höchsten Ammoniumkonzentrationen festgestellt (Abb. 7).

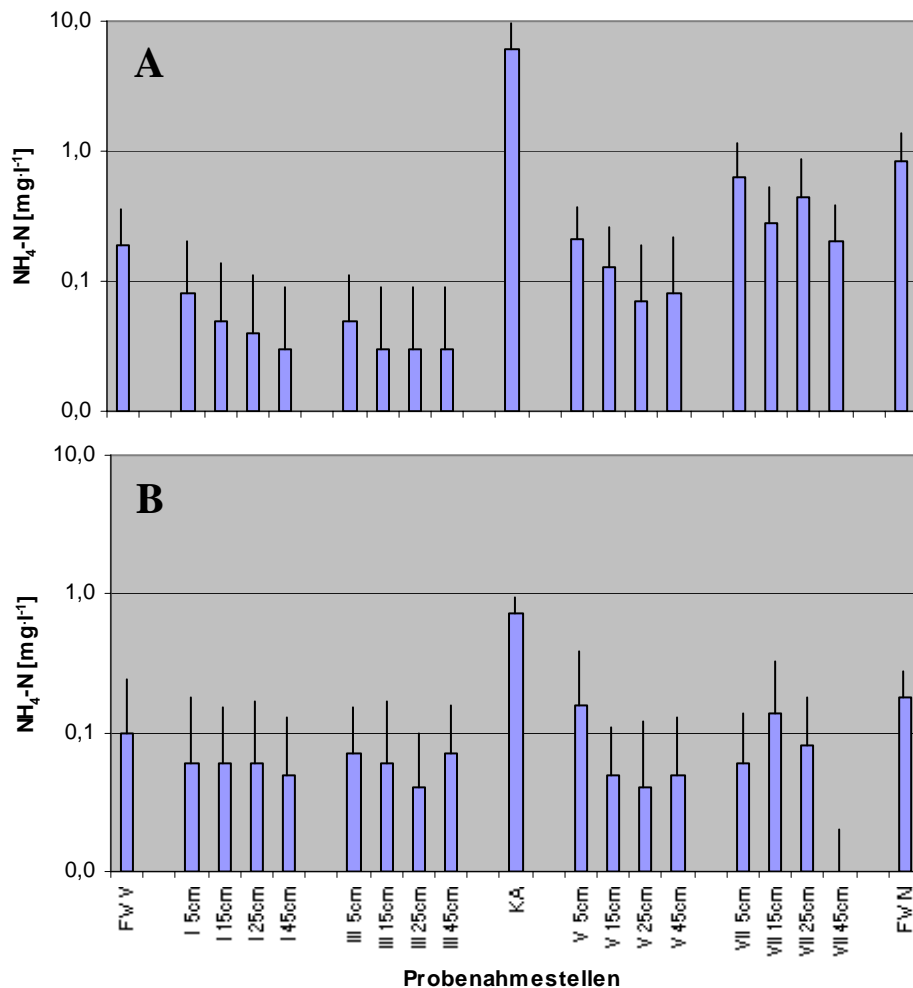


Abb. 7: Graphische Darstellung der Ammoniumkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flüßaufwärts (FW V) und flüßabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus fünf Messungen für die Ammoniumkonzentration in den Wasserproben vor den Veränderungen in der Kläranlage (A) und vier Messungen für die Ammoniumkonzentration nach den Veränderungen in der Kläranlage (B) im Probenahmezeitraum 1999 - 2001. Die Meßwerte wurden logarithmisch aufgetragen.

Ab März 2000 reduzierte sich die hohe Ammoniumkonzentration im Klärwasser auf durchschnittlich $0,70 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$. Ab diesem Zeitpunkt konnten zwar noch höhere Ammoniumkonzentrationen in der fließenden Welle flüßabwärts des Kläranlagenablaufes im Vergleich zur fließenden Welle flüßaufwärts festgestellt werden, allerdings lag das Niveau des

Anstiegs niedriger ($0,10 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ versus $0,18 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Ab diesem Zeitpunkt sanken auch die Ammoniumkonzentrationen im Transekt VII auf einen ähnlichen Level wie in den Interstitialwasserproben der anderen Transekte I, III und V ($0,10 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ bis $0,16 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$), wobei in 45 cm Sedimenttiefe des Transektes VII mit durchschnittlich $0,01 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ stark erniedrigte Ammoniumkonzentrationen gemessen wurden.

Zur Verdeutlichung des hohen Ammoniumeintrages durch das Klärwasser wurden alle Meßwerte der 13 Probenahmeterminen gemittelt (Abb. 8). Über den gesamten Probenahmezeitraum konnten erhöhte Ammoniumkonzentrationen im Sediment des Transektes VII und in der fließenden Welle flußabwärts des Kläranlagenabflusses im Vergleich mit den vom Klärwasser unbeeinflussten Probenahmestellen gemessen werden. Auch das Abwasser wies eine hohe Ammoniumbelastung auf. Die Ammoniumkonzentration im Sediment von Transekt V, das direkt im Bereich der Abwasserfahne liegt, weist im Vergleich zu den vom Klärwasser unbeeinflussten Interstitialwasserproben erhöhte Werte auf. Die Ammoniumkonzentration in den 5 cm tiefen Sedimentschichten aller untersuchten Transekte wies einen höheren Wert auf, als die tiefer liegenden Sedimentschichten (15 – 45 cm). Eine deutliche Abnahme der durchschnittlichen Ammoniumkonzentration mit zunehmender Tiefe konnte nur in den Transekten I und VII gemessen werden.

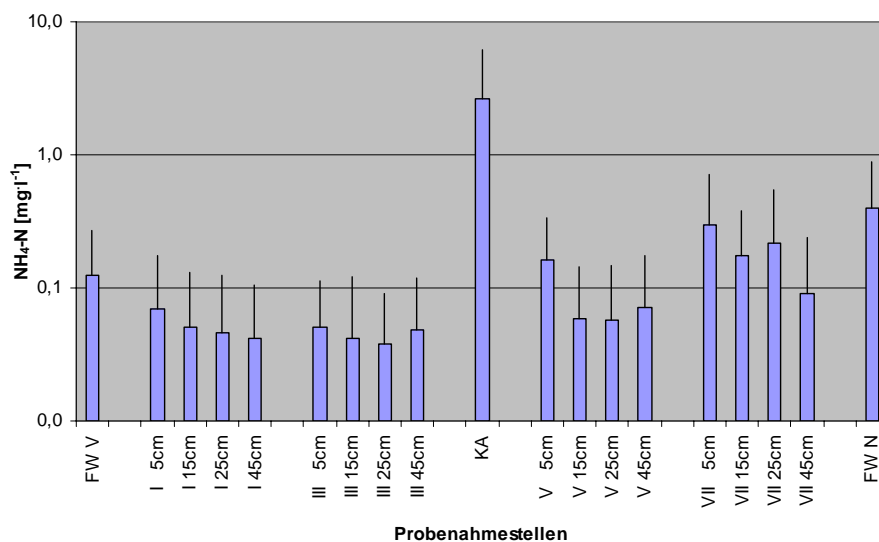


Abb. 8: Graphische Darstellung der Ammoniumkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus 14 Messungen im Probenahmezeitraum 1999-2001. Die Meßwerte wurden logarithmisch aufgetragen.

4.1.3 Nitratkonzentrationen des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers

Von Juli 1999 bis März 2000 lagen die Nitratkonzentrationen in der fließenden Welle flußaufwärts und flußabwärts des Kläranlagenablaufes im Bereich von 2,8 bis 3,3 mg $\text{NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ und im Kläranlagenabfluß durchschnittlich bei 1,7 mg $\text{NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ (Abb. 9).

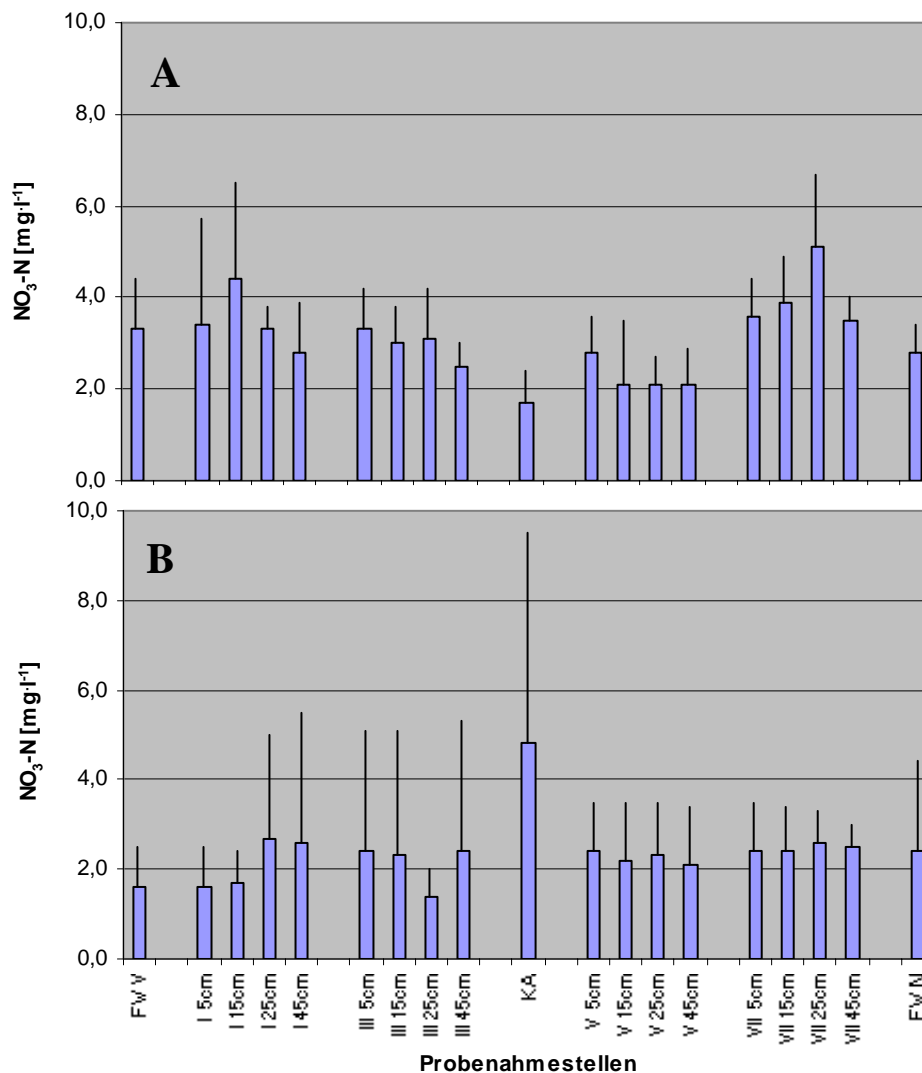


Abb. 9: Graphische Darstellung der Nitratkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus fünf Messungen für die Nitratkonzentration in den Wasserproben vor den Veränderungen in der Kläranlage (A) und vier Messungen für die Nitratkonzentration nach den Veränderungen in der Kläranlage (B) im Probenahmezeitraum 1999 - 2001.

Trotz des Anstiegs der Nitratkonzentration im Klärwasser ab März 2000 von 2,6 mg $\text{NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ auf bis zu 21,2 mg $\text{NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ (vgl. Abb. 6) und einer erhöhten Nitratkonzentration in Transekt VII konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Transekten bezüglich der Nitratkonzentration ermittelt werden (Kruskal-Wallis-Test: $p > 0,05$). Eine Unterscheidung von Infiltrationszone (Transekte I, V und VII) und Exfiltrationszone (Transekt III) konnte bezüglich

der durchschnittlichen Nitratkonzentration nicht getroffen werden. Eine Auftrennung der Transekte in vom Klärwasser unbeeinflusste (Transekt I und III) und beeinflusste (V und VII) Transekte wies keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Nitratkonzentration auf (Mann-Whitney-U-Test: $p > 0,05$).

Die durchschnittlichen Nitratkonzentrationen von allen Probenahmeterminen in den Probenahmejahren 1999 bis 2001 verdeutlichen den temporär hohen Eintrag von Nitrat-N zwischen März und Dezember 2000 durch das Klärwasser, weisen aber keine deutlich höheren Nitratkonzentrationen in den Transekten V und VII im Vergleich zu den Transekten I und III auf (Abb. 10). In allen Interstitialwasserproben lag die durchschnittliche Nitratkonzentration zwischen 2 und 3,4 $\text{mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$. Mit bis zu 8,8 $\text{mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ konnten die höchsten Nitratkonzentrationen im Interstitial temporär Ende September 2000 in Transekt III gemessen werden; zu dem Zeitpunkt, als der direkt in Ufernähe des Transektes III gelegene Schönungsteich erweitert und geflutet wurde. Eine deutliche Abnahme der Nitratkonzentration mit zunehmender Tiefe konnte für die untersuchten Sedimenttiefen nicht gemessen werden.

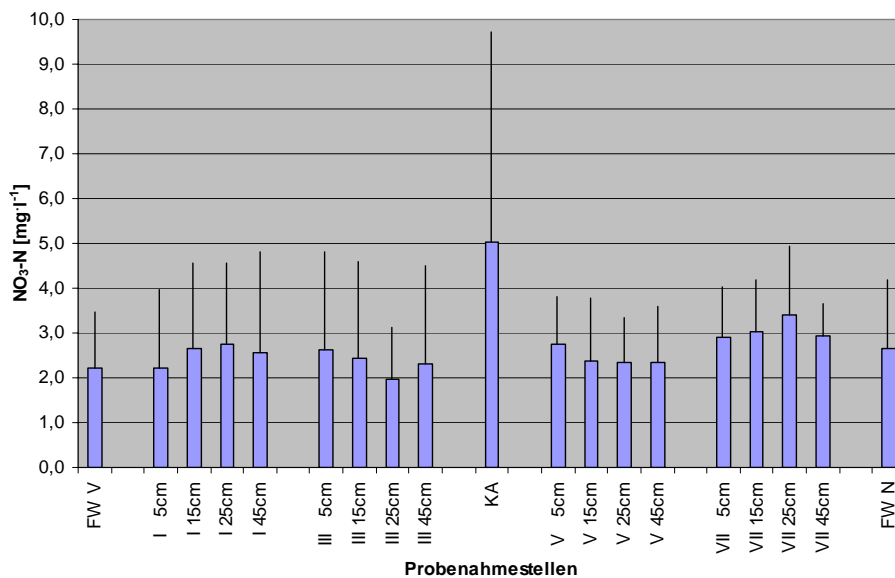


Abb. 10: Graphische Darstellung der Nitratkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus 12 Messungen im Probenahmezeitraum 1999-2001.

4.1.4 Nitritkonzentrationen des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers

Die höchsten Konzentrationen an Nitrit-N mit bis zu $0,47 \text{ mg NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ wurden an folgenden Probenahmeterminen in den Interstitialwasserproben des Transektes V gemessen (Abb. 11):

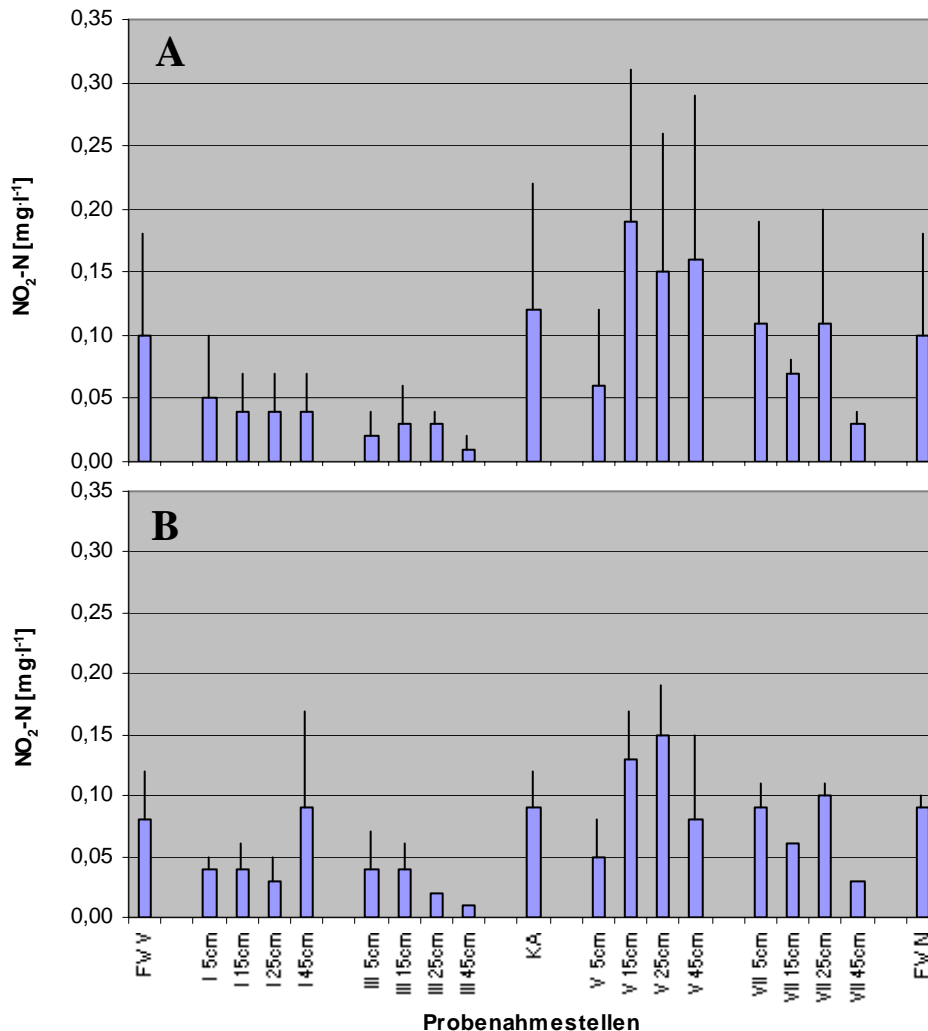


Abb. 11: Graphische Darstellung der Nitritkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus fünf Messungen für die Nitritkonzentration in den Wasserproben vor den Veränderungen in der Kläranlage (A) und vier Messungen für die Nitritkonzentration nach den Veränderungen in der Kläranlage (B) im Probenahmezeitraum 1999 - 2001.

Im Juli 1999 und 2001 in den Tiefen 15 cm, 25 cm und 45 cm ($0,32 \text{ mg NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ bis $0,47 \text{ mg NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$) und im November 1999 in der Tiefe von 15 cm ($0,30 \text{ mg NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Die Nitritkonzentrationen der Interstitialwasserproben aus allen vier untersuchten Tiefen von Transekt V unterschieden sich höchst signifikant von den Nitritkonzentrationen der jeweiligen Tiefen der Transekte I, III und VII (Kruskal-Wallis-Test: $p \leq 0,001$). Die Nitritkonzentrationen der Interstitialwasserproben des Transektes VII unterschieden sich noch signifikant von den Nitritkonzentrationen der Transekte I und III (Kruskal-Wallis-Test: $p \leq 0,05$), wobei insgesamt

signifikant höhere Nitritkonzentrationen in den Interstitialwasserproben flußabwärts des Kläranlagenablaufes (Transecte V und VII) im Vergleich zu den Interstitialwasserproben der Transecte flußaufwärts des Kläranlagenablaufes (Transecte I und III) gemessen wurden (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,002$). Die erhöhten Nitritkonzentrationen in den Transecten V und VII konnten nicht mit den Nitritkonzentrationen im Klärwassers in Verbindung gebracht werden (Mann-Whitney-U-Test: $p > 0,05$). Auffällig ist, daß die Schwankungen in der Nitritkonzentration nach den Umbaumaßnahmen geringer wurden, was an den verringerten Standardabweichungen abzulesen ist (Abb. 11). Die Erweiterung und Flutung des Schönungsteiches Ende September 2000 führte nicht zu erhöhten Nitritkonzentrationen im Transect III.

Die deutlich erhöhten Nitritkonzentrationen im Sediment von Transect V und VII werden bei Betrachtung der Mittelwerte der Nitritkonzentration des gesamten Probenahmezeitraumes deutlich (Abb. 12): Die vom Klärwasser unbeeinflussten Transecte I und III wiesen geringere Nitritkonzentrationen auf, als die vom Klärwasser beeinflussten Transecte V und VII. Insbesondere in Transect V wurden deutlich erhöhte Nitritkonzentrationen gemessen (durchschnittlich 0,08 bis 0,15 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Eine starke Differenz in der Nitritkonzentration von Exfiltrationsbereich (Transect III) und Infiltrationsbereich (Transecte I, V und VII) wurde nicht festgestellt.

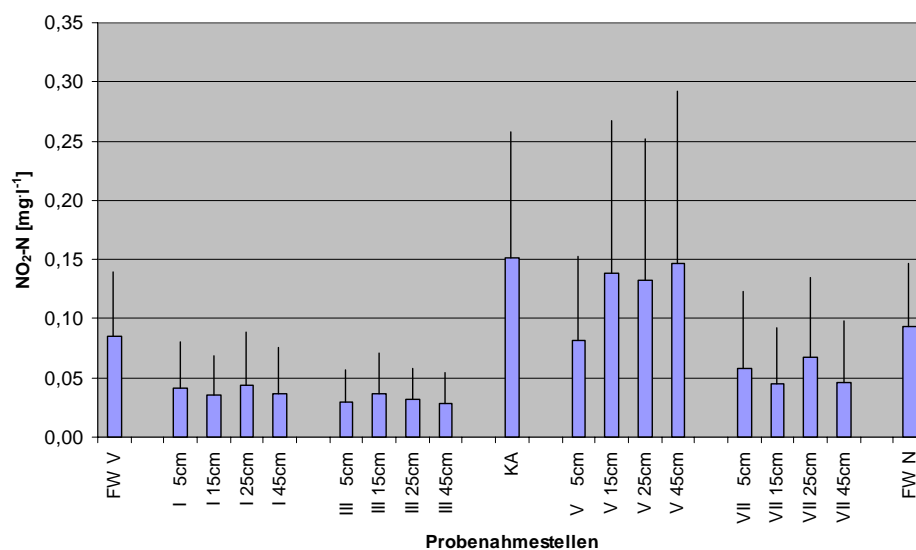


Abb. 12: Graphische Darstellung der Nitritkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transecte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus 14 Messungen im Probenahmezeitraum 1999-2001.

Die Dynamik der Nitritkonzentration im Interstitial wird in Abbildung 13 deutlich. Es wurden in den Probenahmejahren 1999 bis 2001 deutliche Unterschiede in den Nitritkonzentrationen der Transecte I und III im Vergleich zu denen der Transecte V und VII gemessen. In diesen Probenahmejahren lagen die Nitritkonzentrationen der Transecte I und III durchschnittlich 0,1 mg

$\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ unter den Nitritkonzentrationen der Transekte V und VII. Im Untersuchungszeitraum 2000 wurden nur geringfügige Unterschiede zwischen den Nitritkonzentrationen der Transekte I und III im Vergleich zu den Nitritkonzentrationen der Transekte V und VII gemessen (Maximale Differenz: $0,6 \text{ mg NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Die hohen Standardabweichungen der Werte für die Nitritkonzentrationen in den Transekten V und VII kommen insbesondere durch stark erhöhte Nitritwerte in Transekt V im Vergleich zu denen in Transekt VII zustande (Abb. 13).

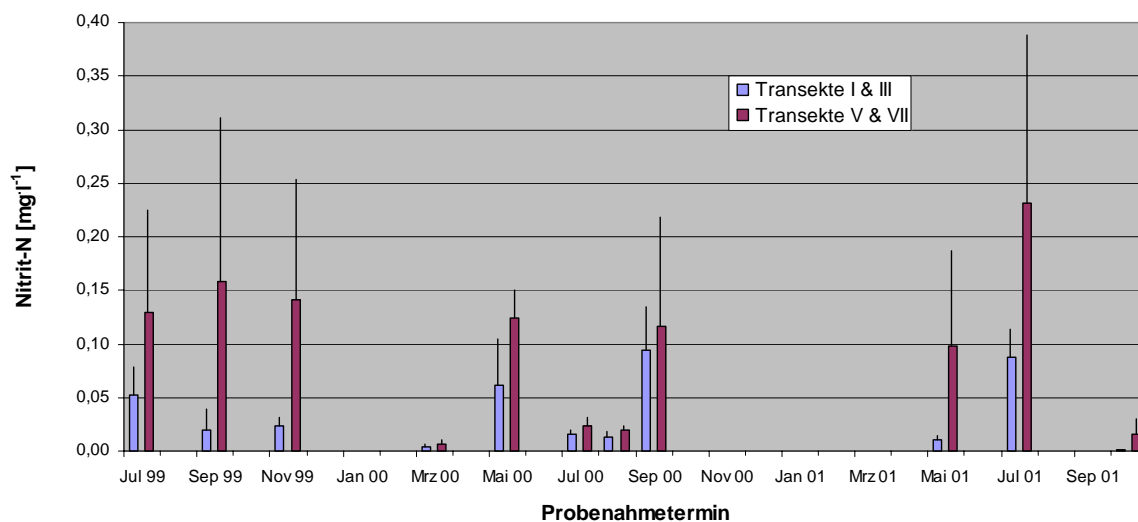


Abb. 13: Graphische Darstellung der Nitritkonzentration der Interstitialwasserproben der Mittelwerte von den vier untersuchten Sedimenttiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 der Transekte I und III und V und VII ($n = 8$ pro Transekt und Probenahmetermin). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus 11 Messungen im Probenahmezeitraum 1999-2001.

4.1.5 Sauerstoffkonzentrationen des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers

Die Sauerstoffkonzentration im Klärwasser lag vor den baulichen Veränderungen in der Kläranlage im Mittel bei $5,6 \text{ mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$, danach bei durchschnittlich $9,6 \text{ mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$ (Abb. 14). Die Sauerstoffkonzentration in der fließenden Welle lag vor der Umbaumaßnahme der Kläranlage flüßaufwärts des Kläranlagenablaufs durchschnittlich bei $9,8 \text{ mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$ und erhöhte sich nach der Umbaumaßnahme auf $11,4 \text{ mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$. In der fließenden Welle flüßabwärts des Kläranlagenablaufes betrug die Sauerstoffkonzentration im Mittel $8,5 \text{ mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$ und stieg nach der Umbaumaßnahme auf $10,4 \text{ mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$. Die Sauerstoffkonzentrationen in der fließenden Welle flüßabwärts des Kläranlagenablaufes lagen sowohl vor als auch nach der Umbaumaßnahme in der Kläranlage zwar im Vergleich um mindestens $1 \text{ mg O}_2\cdot\text{l}^{-1}$ unter den Werten der fließenden Welle flüßaufwärts des Kläranlagenablaufes, waren allerdings nicht deutlich erniedrigt.

In allen Interstitialwasserproben wurde eine deutlich niedrigere Sauerstoffkonzentration als in den Oberflächenwasserproben gemessen (Abb. 14). In allen Entnahmetiefen des Transektes III

wurden an allen Probenahmeterminen im Vergleich zu den Sedimenttiefen der anderen untersuchten Transekten signifikant niedrigere Sauerstoffkonzentrationen gemessen (Mann-Whitney-Test: $p = 0,000 - 0,029$). In Transekt III lag sie im Mittel bei 3,6 bis 3,9 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$, während in den Transekten I, V und VII durchschnittlich 4,3 bis 7,1 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ gemessen wurden. Im Transekt III wurden keine erniedrigten Sauerstoffkonzentrationen im Zuge der Erweiterung und Flutung des Schönungsteiches Ende September 2000 gemessen. Mit Ausnahme des Transektes III wiesen die tieferen Sedimentschichten (≥ 15 cm) im Vergleich zu der ersten Sedimenttiefe (5 cm) signifikant niedrigere Sauerstoffkonzentrationen auf (Mann-Whitney-Test: $p = 0,005 - 0,037$). Deutlich erniedrigte Sauerstoffkonzentrationen wurden in 45 cm Sedimenttiefe des Transektes VII im Vergleich zu den höher gelegenen Sedimentschichten dieses Transektes gemessen.

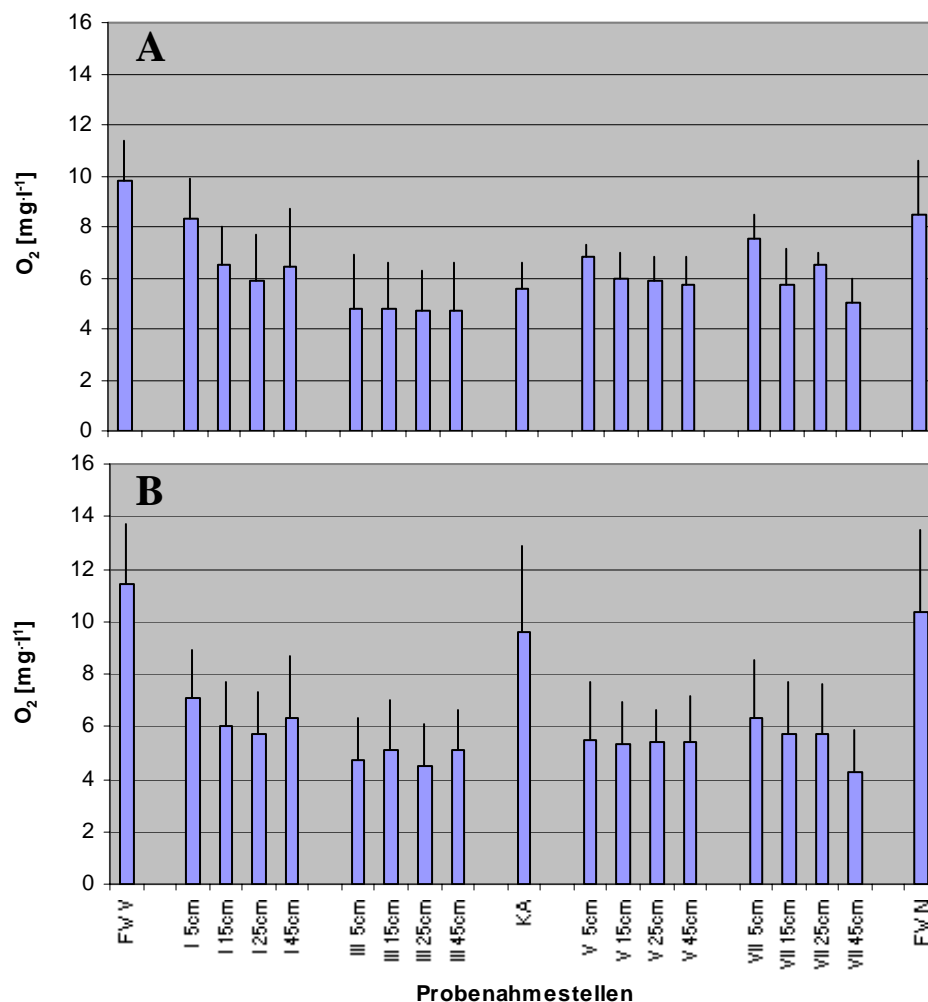


Abb. 14: Graphische Darstellung der Sauerstoffkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flussaufwärts (FW V) und flussabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus fünf Messungen für die Sauerstoffkonzentration in den Wasserproben vor den Veränderungen in der Kläranlage (A) und vier Messungen für die Sauerstoffkonzentration nach den Veränderungen in der Kläranlage (B) im Probenahmezeitraum 1999 - 2001.

Während des gesamten Probenahmezeitraumes von 1999- 2001 weist das Interstitialwasser des Transektes III signifikant erniedrigte Sauerstoffkonzentrationen auf (Mann-Whitney-Test: $p = 0,000 - 0,029$; Abb. 15). Die Sauerstoffkonzentration in der Sedimenttiefe von 5 cm in den Transekten I, V und VII ist im Vergleich zu der 5 cm Sedimenttiefe des Transektes III deutlich erhöht.

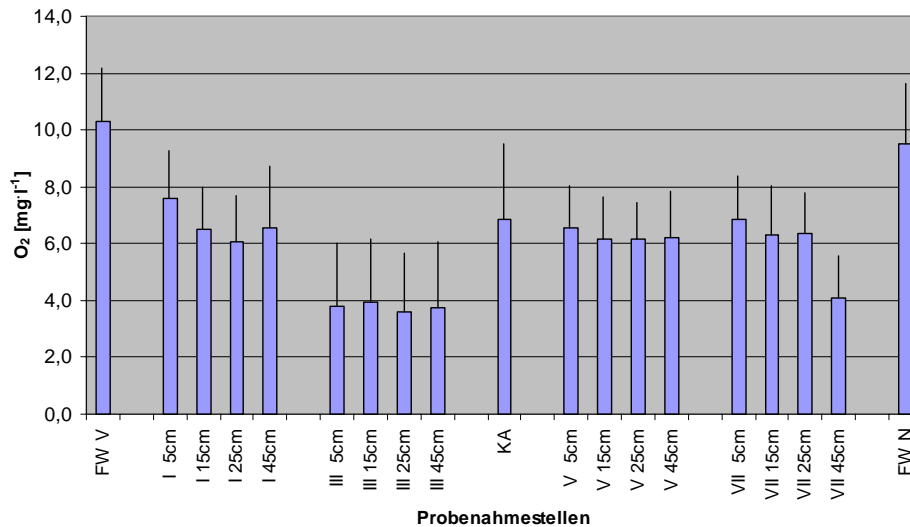


Abb. 15: Graphische Darstellung der Sauerstoffkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm 25 cm und 25 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus 13 Messungen im Probenahmezeitraum 1999-2001.

4.1.6 pH-Wert des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers

Der pH-Wert lag in allen Wasserproben im Mittel zwischen 6,8 und 7,5 (Abb. 16). Es wurden keine signifikanten Unterschiede bezüglich des pH-Wertes zwischen den verschiedenen Transekten gemessen (Kruskal-Wallis-Test: $p > 0,05$), wobei auch eine vertikale Zonierung innerhalb der Transekte nicht festgestellt werden konnte. Die höchsten pH-Werte von bis zu 7,5 im Mittel traten in den Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes auf, die niedrigsten pH-Werte mit bis zu pH 6,3 wurden in Transekt III und im Kläranlagenablauf gemessen. Die Erweiterung und Flutung des Schönungsteiches Ende September 2000 hatte keine Auswirkungen auf den pH-Wert im Transekt III.

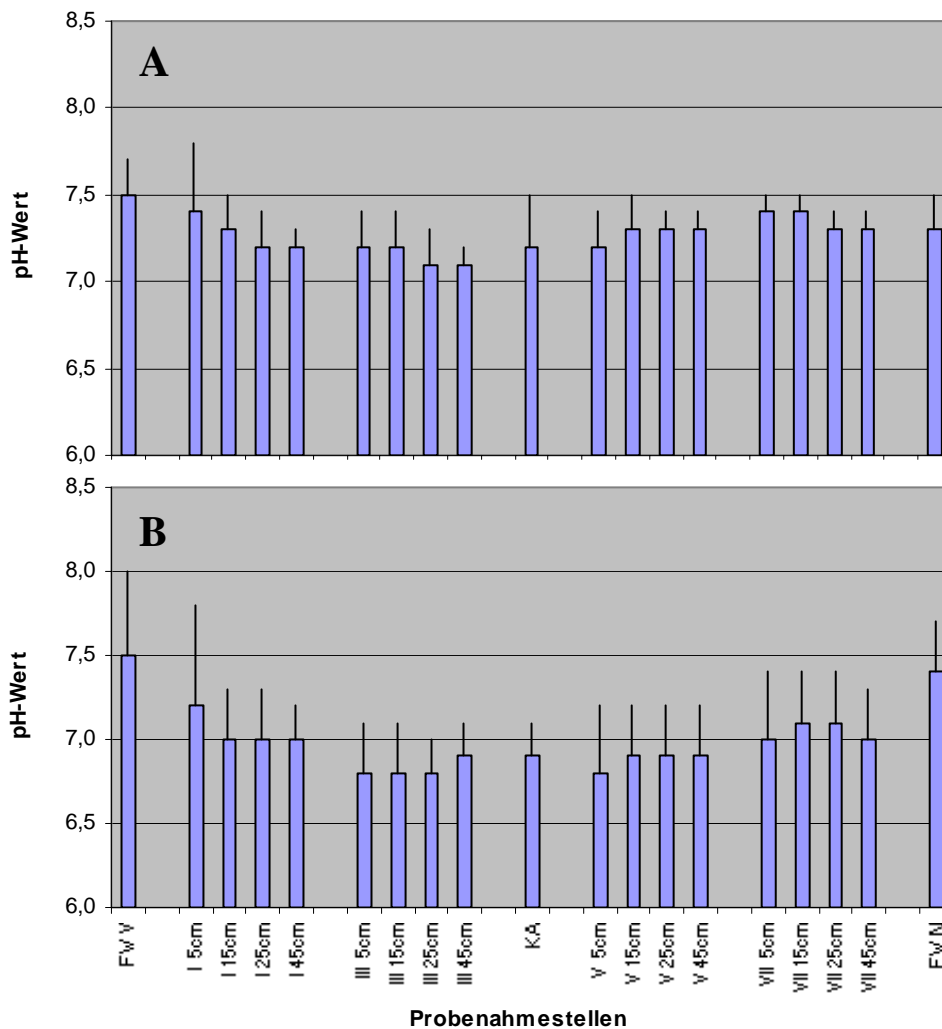


Abb. 16: Graphische Darstellung des pH-Wertes der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und vom Klärwasser (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus fünf Messungen für den pH-Wert der Wasserproben vor den Veränderungen in der Kläranlage (A) und vier Messungen für den pH-Wert nach den Veränderungen in der Kläranlage (B) im Probenahmezeitraum 1999 - 2001.

Der pH-Wert lag im Interstitial um durchschnittlich 0,3 niedriger als in der fließenden Welle, wobei die pH-Wert Differenz der einzelnen Transekte im Vergleich zum Oberflächenwasser 0,08 bis 0,54 betrug. Nur in Transekt V und VII wurden vor den baulichen Veränderungen in der Kläranlage pH-Werte (pH 7,2 - 7,4) gemessen, die auf demselben Niveau (pH 7,3) wie die der fließende Welle flußabwärts der Kläranlagenablaufes lagen. Nach den baulichen Veränderungen in der Kläranlage wies das Interstitialwasser auch in diesen Transekten im Vergleich zum Oberflächenwasser eine entsprechende Differenz des pH-Wertes auf.

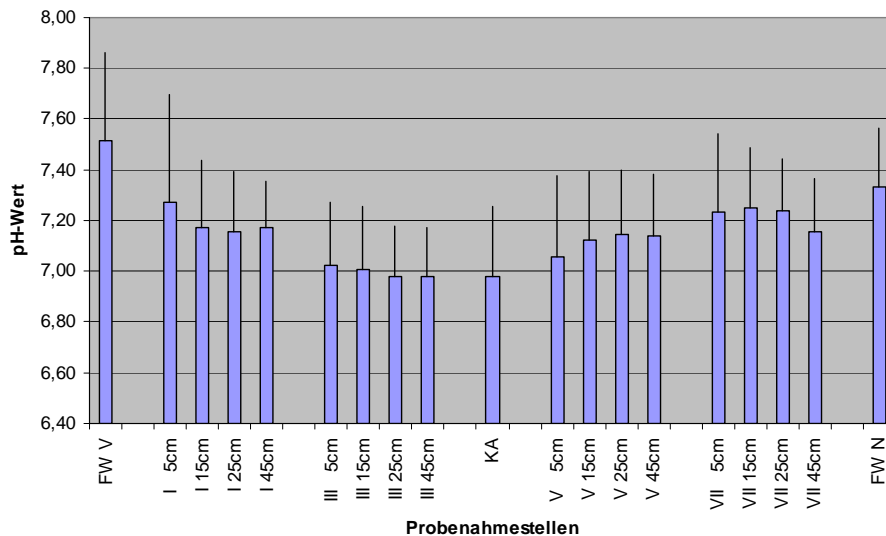


Abb. 17: Graphische Darstellung des pH-Wertes der Interstitialwasserproben der vier Transekts I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flussaufwärts (FW V) und flussabwärts des Kläranlagenabflusses (FW N) und des Klärwassers (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus 12 Messungen im Probenahmezeitraum 1999-2001.

Die durchschnittlichen pH-Werte im Sediment des Transektes III lagen zwar im Vergleich zu den anderen Transekten auf einem niedrigeren Niveau (Abb. 17), allerdings war die Differenz nicht signifikant (Kruskal-Wallis-Test: $p > 0,05$). Im Vergleich zur fließenden Welle sind die durchschnittlichen pH-Werte im Interstitial erniedrigt, es konnte aber keine deutliche Veränderung des pH-Wertes mit zunehmender Sedimenttiefe gemessen werden. Deutlich aber wird der Einstrom des Oberflächenwassers in die obere Sedimentschicht (5 cm) von Transekt I, V und VII, wobei der erniedrigte pH-Wert des Klärwassers in Transekt V im Vergleich zu den Transekten I und VII ein umgekehrtes Tiefenprofil bezüglich des pH-Wertes verursacht.

4.1.7 Elektrische Leitfähigkeit des Interstitial-, Oberflächen- und Klärwassers

Im Durchschnitt wurden im Interstitial elektrische Leitfähigkeiten von 300 bis 420 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ gemessen (Abb. 18). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Transekten und deren Sedimenttiefen bezüglich der elektrischen Leitfähigkeit nachgewiesen werden (Kruskal-Wallis-Test: $p > 0,05$). Zwischen Oberflächen- und Interstitialwasser konnte eine Differenz von $< 28 \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ ermittelt werden. Eine starke temporäre Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit bis auf 603 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ wurde in Transekt III Ende September im Zuge der Erweiterung und Flutung des Schönungsteiches gemessen. Die höchsten Werte für die elektrische Leitfähigkeit wies mit durchschnittlich 721 bis 744 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ das Klärwasser auf.

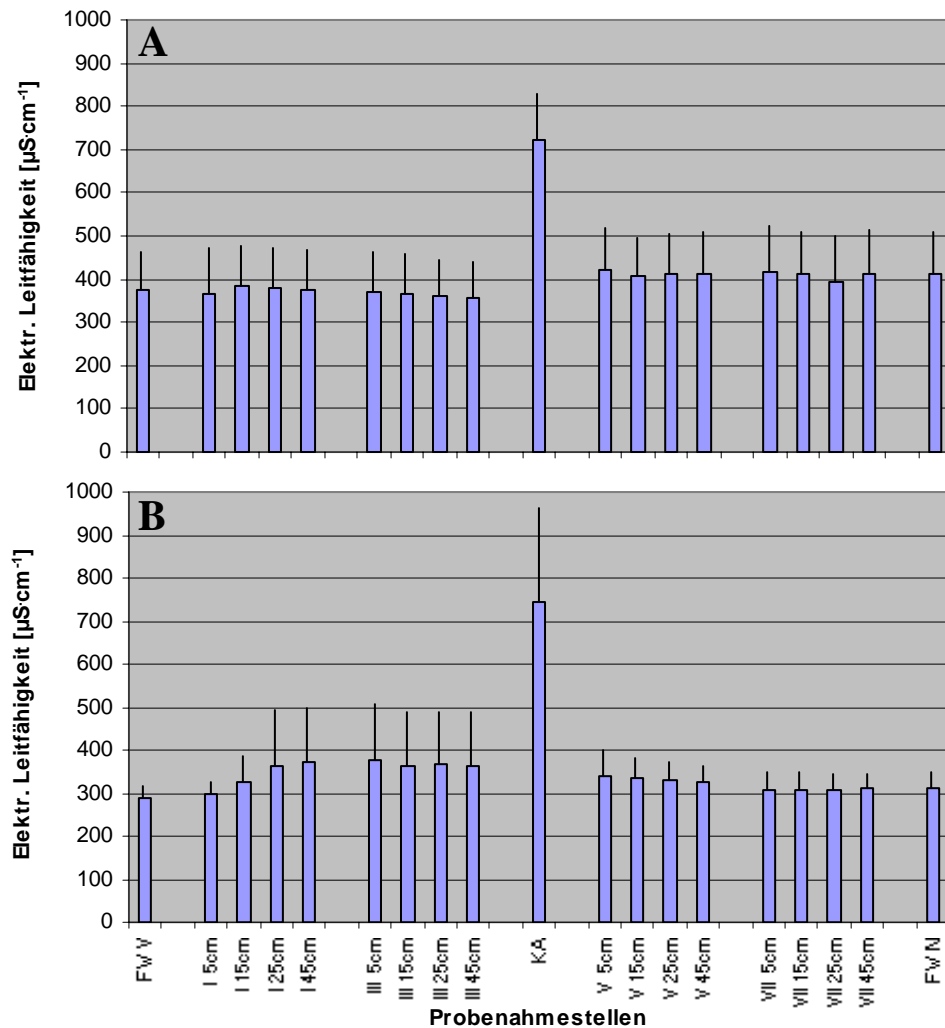


Abb. 18: Graphische Darstellung der elektrische Leitfähigkeit der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und vom Klärwasser (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus fünf Messungen für die elektrische Leitfähigkeit der Wasserproben vor den Veränderungen in der Kläranlage (A) und vier Messungen für die elektrische Leitfähigkeit nach den Veränderungen in der Kläranlage (B) im Probenahmezeitraum 1999 - 2001.

Über den gesamten Probenahmezeitraum wurden im Abwasser der Kläranlage hohe Werte für die elektrische Leitfähigkeit gemessen (Abb. 19). Es konnte aber keine deutliche Zunahme der elektrischen Leitfähigkeit weder im Oberflächenwasser noch in den Interstitialwasserproben festgestellt werden. Nur in Transekt I erhöhte sich die elektrische Leitfähigkeit mit zunehmender Sedimenttiefe.

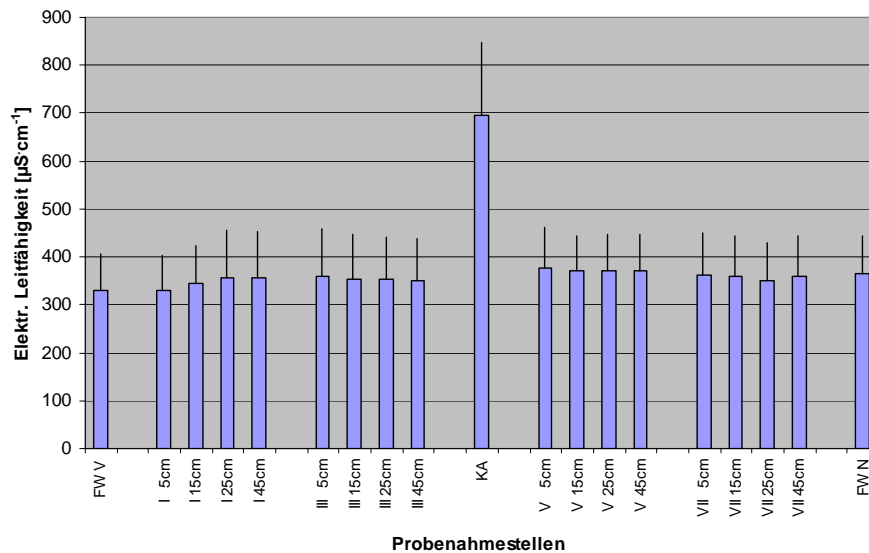


Abb. 19: Graphische Darstellung der elektrischen Leitfähigkeit der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenabflusses und vom Klärwasser (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus 13 Messungen im Probenahmezeitraum 1999-2001.

4.2 Einfluß des Klärwassers auf die chemisch-physikalischen Parameter des Oberflächen- und Interstitialwassers der Lahn

Um den Einfluß des Klärwassers auf die chemisch-physikalischen Parameter des Oberflächen- und Interstitialwasser zu messen, fungierten die Probenahmestellen flußaufwärts des Kläranlagenablaufes als vom Klärwasser unbeeinflusste Referenz. Im Zuge der Ausbaumaßnahmen in der Kläranlage Sarnau wurden im Klärwasser starke Veränderungen in der Stickstoffkonzentration gemessen. Im Vergleich zu den vom Klärwasser unbeeinflussten Probenahmestellen ließen sich auftretende Unterschiede in den chemisch-physikalischen Parametern nicht nur auf das Klärwasser an sich zurückführen, sondern auch auf die veränderten Stickstoffkonzentrationen im Klärwasser (Tab. 4 und Tab. 5).

Vor den Umbaumaßnahmen in der Kläranlage Sarnau wurden hohe Ammoniumkonzentrationen im Klärwasser gemessen. Die Inbetriebnahme der Nitrifikationsstufe im März 2000 führte zu einer sinkenden Ammoniumkonzentration und einer steigenden Nitratkonzentration im Klärwasser, wobei letztere bis Anfang des Jahres 2001 wieder stark absank. Vor der Inbetriebnahme der Nitrifikationsstufe wurden in Transekt VII im Vergleich zu den Transekten I, III und V erhöhte Ammoniumkonzentrationen gemessen. In diesem Zeitraum wurden in Transekt V trotz erhöhter Ammoniumkonzentration in der fließenden Welle keine deutlich erhöhten $\text{NH}_4\text{-N}$ -Konzentrationen ermittelt. Nach Inbetriebnahme der Nitrifikations- und Denitrifikationsstufe wurden im Klärwasser nur noch geringe Ammoniumkonzentrationen gemessen und im Interstitialwasser der Transekte V und VII ähnliche Konzentrationen wie in dem der Transekte I und III.

Eine erhöhte Nitratkonzentration im Klärwasser im Jahr 2000 - aufgrund der Inbetriebnahme der Nitrifikationsstufe - führte nicht zu einer erhöhten Nitratkonzentration im Interstitial der flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Transekte V und VII. Die Vergrößerung und Flutung des Schönungsteiches unmittelbar in der Nähe des Transektes III im September 2000 führte nur temporär zu einer deutlichen Nitraterhöhung in diesem Transekt.

Höchst signifikant erhöhte Nitritkonzentrationen wurden in dem flußabwärts des Kläranlagenabflusses gelegenen Transekt V gemessen sowie noch signifikant erhöhte Nitritkonzentrationen in Transekt VII. Diese erhöhten Nitritkonzentrationen in den Transekten V und VII konnten in den Probenahmejahren 1999 und 2001 gemessen werden, aber nicht im Jahr 2000, in dem die Nitrifikations- und Denitrifikationsstufe in Betrieb genommen wurde.

Im Vergleich zu den anderen Transekten bzw. Transektiefen wurden signifikant erniedrigte Sauerstoffkonzentrationen in allen untersuchten Sedimenttiefen des Transektes III und in 40 cm Sedimenttiefe des Transektes VII gemessen. Ein direkter Einfluß des Klärwassers auf die Sauerstoffkonzentration im Interstitial wurde nicht festgestellt.

Bezüglich des pH-Wertes war keine signifikante Beeinflussung der Oberflächen- und Interstitialwasserproben durch das Klärwasser meßbar.

Die Werte für die elektrische Leitfähigkeit waren im Abwasser während des gesamten Probenahmezeitraumes im Vergleich zu allen anderen Wasserproben höchst signifikant erhöht, doch führte dies nicht zu einer Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit in den stromabwärts gelegenen Interstitialwasserproben der Transekte V und VII im Vergleich zu denen der Transekte I und III (Tab. 4 und Tab. 5).

Temporär wurden in Transekt III Ende September 2000 aufgrund der Erweiterung und Flutung des dort in Ufernähe gelegenen Schönungsteiches stark erhöhte Werte für Nitratkonzentration und elektrische Leitfähigkeit gemessen.

Tab. 4: Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der elektrischen Leitfähigkeit, des pH-Wertes, der Sauerstoff-, Ammonium-, Nitrat- und Nitritkonzentrationen aus den Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII jeweils mit den vier Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der fließenden Welle flußaufwärts und flußabwärts des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers. Die Wasserproben wurden vor den baulichen Veränderungen in der Kläranlage entnommen (n = 5). Signifikante Mittelwerte wurden zur besseren Übersicht unterstrichen.

Probeentnahmestelle	Sauerstoffkonzentration [mg l ⁻¹]	St.-Abw.	Elektr. Leitfähigkeit [µS cm ⁻¹]	St.-Abw.	pH-Wert	St.-Abw.	NH ₄ -N [mg l ⁻¹]	St.-Abw.	NO ₃ -N [mg l ⁻¹]	St.-Abw.	NO ₂ -N [mg l ⁻¹]	St.-Abw.	
Fließende Welle flußaufwärts des Kläranlagenabflusses	9,8	1,6	375	90	7,5	0,2	0,19	0,17	3,3	1,1	0,1	0,08	
Transekt I	5 cm	8,3	1,6	368	102	7,4	0,4	0,12	3,4	2,3	0,05	0,05	
	15 cm	6,5	1,5	382	96	7,3	0,2	0,09	4,4	2,1	0,04	0,03	
	25 cm	5,9	1,8	380	94	7,2	0,2	0,07	3,3	0,5	0,04	0,03	
	45 cm	6,4	2,3	375	92	7,2	0,1	0,06	2,8	1,1	0,04	0,03	
Transekt III	5 cm	<u>4,8</u>	2,1	371	94	7,2	0,2	0,06	3,3	0,9	0,02	0,02	
	15 cm	<u>4,8</u>	1,8	368	92	7,2	0,2	0,06	3,0	0,8	0,03	0,03	
	25 cm	<u>4,7</u>	1,6	360	86	7,1	0,2	0,06	3,1	1,1	0,03	0,01	
	45 cm	<u>4,7</u>	1,9	355	83	7,1	0,1	0,06	2,5	0,5	0,01	0,01	
Klärwasser	5,6	1,0	<u>721</u>	110	7,2	0,3	<u>6,11</u>	3,69	1,7	0,7	0,12	0,10	
Transekt V	5 cm	6,8	0,5	420	98	7,2	0,2	0,16	2,8	0,8	<u>0,06</u>	0,06	
	15 cm	6,0	1,0	406	90	7,3	0,2	0,13	2,1	1,4	<u>0,19</u>	0,12	
	25 cm	5,9	0,9	411	95	7,3	0,1	0,12	2,1	0,6	<u>0,15</u>	0,11	
	45 cm	5,7	1,1	412	95	7,3	0,1	0,14	2,1	0,8	<u>0,16</u>	0,13	
Transekt VII	5 cm	7,5	1,0	417	106	7,4	0,1	<u>0,63</u>	0,52	3,6	0,8	<u>0,11</u>	0,08
	15 cm	5,7	1,4	410	99	7,4	0,1	<u>0,28</u>	0,24	3,9	1,0	<u>0,07</u>	0,01
	25 cm	6,5	0,5	392	106	7,3	0,1	<u>0,44</u>	0,43	5,1	1,6	<u>0,11</u>	0,09
	45 cm	<u>5,0</u>	1,0	410	102	7,3	0,1	<u>0,20</u>	0,19	3,5	0,5	<u>0,03</u>	0,01
Fließende Welle flußabwärts der Kläranlagenabflusses	8,5	2,1	414	94	7,3	0,2	0,85	0,53	2,8	0,6	0,1	0,08	

Tab. 5: Tabellarische Darstellung der Mittelwerte und Standardabweichung der elektrischen Leitfähigkeit, des pH-Wertes, der Sauerstoff-, Ammonium-, Nitrat- und Nitritkonzentrationen aus den Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII jeweils mit den vier Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der fließenden Welle flußaufwärts und flußabwärts des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers. Die Wasserproben wurden nach den baulichen Veränderungen in der Kläranlage entnommen (n = 4). Signifikante Mittelwerte wurden zur besseren Übersicht unterstrichen.

Probeentnahmestelle	Sauerstoffkonzentration [mg l ⁻¹]	St.-Abw.	Elektr. Leitfähigkeit [µS cm ⁻¹]	St.-Abw.	pH-Wert	St.-Abw.	NH ₄ -N [mg l ⁻¹]	St.-Abw.	NO ₃ -N [mg l ⁻¹]	St.-Abw.	NO ₂ -N [mg l ⁻¹]	St.-Abw.	
Fließende Welle oberhalb des Kläranlagenabflusses	11,4	2,3	287	31	7,5	0,5	0,1	0,14	1,6	0,9	0,08	0,04	
Transekt I	5 cm	7,1	1,8	300	26	7,2	0,6	0,06	0,12	1,6	0,9	0,04	0,01
	15 cm	6,0	1,7	327	59	7,0	0,3	0,06	0,09	1,7	0,7	0,04	0,02
	25 cm	5,7	1,6	364	127	7,0	0,3	0,06	0,11	2,7	2,3	0,03	0,02
	45 cm	6,3	2,4	371	128	7,0	0,2	0,05	0,08	2,6	2,9	0,09	0,08
Transekt III	5 cm	<u>4,7</u>	1,6	375	134	6,8	0,3	0,07	0,08	2,4	2,7	0,04	0,03
	15 cm	<u>5,1</u>	1,9	365	124	6,8	0,3	0,06	0,11	2,3	2,8	0,04	0,02
	25 cm	<u>4,5</u>	1,6	366	122	6,8	0,2	0,04	0,06	1,4	0,6	0,02	0,00
	45 cm	<u>5,1</u>	1,5	363	124	6,9	0,2	0,07	0,09	2,4	2,9	0,01	0,00
Klärwasser	9,6	3,3	<u>744</u>	218	6,9	0,2	0,72	0,23	4,8	4,7	0,09	0,03	
Transekt V	5 cm	5,5	2,2	338	64	6,8	0,4	0,16	0,22	2,4	1,1	<u>0,05</u>	0,03
	15 cm	5,3	1,6	333	48	6,9	0,3	0,05	0,06	2,2	1,3	<u>0,13</u>	0,04
	25 cm	5,4	1,2	329	44	6,9	0,3	0,04	0,08	2,3	1,2	<u>0,15</u>	0,04
	45 cm	5,4	1,8	325	40	6,9	0,3	0,05	0,08	2,1	1,3	<u>0,08</u>	0,07
Transekt VII	5 cm	6,3	2,2	307	40	7,0	0,4	0,06	0,08	2,4	1,1	<u>0,09</u>	0,02
	15 cm	5,7	2,0	308	40	7,1	0,3	0,14	0,19	2,4	1,0	<u>0,06</u>	0,00
	25 cm	5,7	1,9	306	39	7,1	0,3	0,08	0,10	2,6	0,7	<u>0,10</u>	0,01
	45 cm	<u>4,3</u>	1,6	311	33	7,0	0,3	0,01	0,01	2,5	0,5	<u>0,03</u>	0,00
Fließende Welle unterhalb der Kläranlagenabflusses	10,4	3,1	311	39	7,4	0,3	0,18	0,10	2,4	2,0	0,09	0,01	

4.3 Einordnung der Lahn in die chemische Güteklassifizierung

Um eine Einordnung der Belastung der Lahn vornehmen zu können, kann das von der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA) entworfene Verfahren für die chemische Gewässergüteklassifizierung der Fließgewässer angewendet werden (Tab. 6). Hierbei wurden nur die gemessenen Stickstoffparameter Ammonium-N, Nitrat-N, Nitrit-N und die Sauerstoffkonzentration miteinbezogen.

Tab. 6: Tabellarische Darstellung der chemischen Güteklassifizierung von Fließgewässern für Stickstoffparameter und Sauerstoffhaushalt (verändert, nach Daten der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser [LAWA]).

Stoffname	Einheit	Stoffbezogene chemische Gewässergüteklasse						
		I	I - II	II	II - III	III	III - IV	IV
Nitrat-N	mg l ⁻¹	≤ 1	≤ 1,5	≤ 2,5	≤ 5	≤ 10	≤ 20	> 20
Nitrit-N	mg l ⁻¹	≤ 0,01	≤ 0,05	≤ 0,1	≤ 0,2	≤ 0,4	≤ 0,8	> 0,8
Ammonium-N	mg l ⁻¹	≤ 0,04	≤ 0,1	≤ 0,3	≤ 0,6	≤ 1,2	≤ 2,4	> 2,4
Sauerstoffgehalt	mg l ⁻¹	> 8	> 8	> 6	> 5	> 4	> 2	≤ 2

Der Ausbau der Kläranlage Sarnau durch die Nitrifikations- und Denitrifikationsstufe führte zu einer Verbesserung der chemischen Gewässergüte der Lahn (Tab. 7): Konnten bezüglich der Nitritkonzentration (chemische Gewässergüteklasse II – Mäßig belastet) und der Sauerstoffkonzentration (chemische Gewässergüteklasse I – Keine Belastung) keine oder nur geringe Veränderungen im Oberflächenwasser der Lahn festgestellt werden, so sanken die Nitrat- und Ammoniumkonzentrationen. Letzteres führte zu einer Verbesserung der chemischen Gewässergüteklasse der Lahn von Güteklasse II-III (Deutlich belastet) zu Gewässergüteklasse II (Mäßig belastet).

Tab. 7: Tabellarische Darstellung der Einordnung der Wasserqualität der Lahn in das Schema der chemischen Güteklassifizierung für Stickstoffparameter und Sauerstoffhaushalt (nach Daten der Länderarbeitsgemeinschaft Wasser (LAWA)).

	Vor den baulichen Veränderung in der Kläranlage		Nach den baulichen Veränderung in der Kläranlage	
Parameter	Werte	Stoffbezogene chemische Gewässergüteklasse	Werte	Stoffbezogene chemische Gewässergüteklasse
NO ₃ -N [mg·l ⁻¹]	2,8	II-III	2,4	II
NO ₂ -N [mg·l ⁻¹]	0,1	II	0,09	II
NH ₄ -N [mg·l ⁻¹]	0,85	II-III	0,18	II
O ₂ [mg·l ⁻¹]	9,2	I	10,9	I

4.4 Denitrationspotenzen der Oberflächen- Interstitial- und Klärwasserproben

Die Denitrationspotenz definiert sich über die Umsatzrate von Nitrat-N zu Nitrit-N pro Tag in mg·l⁻¹·Tag⁻¹ (RHEINHEIMER 1965). Die Denitrationspotenz stellt ein relatives Maß für die im Flußwasser vorhandenen Mikroorganismen dar, die in der Lage sind, Nitrat zu reduzieren. Da neben Denitrifikanten noch andere nitratreduzierende Bakterien z.B. *Escherichia coli* zu diesem physiologischen Prozeß fähig sind, läßt die Denitrationspotenz zwar Rückschlüsse auf die Anwesenheit und Aktivität von Nitratreduzierern und Denitrifikanten zu, sie kann aber nicht als tatsächliche Denitrifikationsleistung unter den gegebenen Bedingungen (Denitrifikationspotenz) verstanden werden.

Die Wasserproben, die während der Wintermonate entnommen wurden (November 1999, November 2000 und Oktober 2001) wiesen vergleichsweise sehr geringe Denitrationspotenzen auf, wobei mit 5,3 mg·l⁻¹·Tag⁻¹ in einer Sedimenttiefe von 15 cm des Transektes III im Oktober 2001 die höchsten Werte gemessen wurden (Abb. 20).

Die Denitrationspotenzen der Klärwasserproben, die im Juli und September 1999 entnommen wurden, lagen mit $17,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ im Juli 1999 und $14,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ im September 1999 sehr hoch. Im März 2000 und Juli 2000 konnten dagegen im Klärwasser mit $0,64 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ und $1,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ stark erniedrigte Denitrationspotenzen festgestellt werden. Die Denitrationspotenzen im Klärwasser lagen mit $10,0 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ im Mai 2001 und mit $17,7 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ im Juli 2001 auf einem ähnlichen Niveau wie die Denitrationspotenzen des Klärwassers im Juli und September 1999.

In der fließenden Welle konnte im Juli 1999 keine Erhöhung der Denitrationspotenzen durch den Einfluß der Kläranlage ($17 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$) gemessen werden; der Wert sank von $9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ flußaufwärts auf $6,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ flußabwärts der Kläranlage. Im September 1999 wurde eine Erhöhung der Denitrationspotenz der fließenden Welle (Denitrationspotenz des Klärwassers: $10,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$) von $2,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ auf $8,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ gemessen. An den Probenahmeterminen in den Jahren 2000 und 2001 wurden in den Wasserproben der fließenden Welle mit $0,5$ - $2,3 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ vergleichsweise niedrige Denitrationspotenzen gemessen.

Im Vergleich zu den Transekten I und III erreichten die Denitrationspotenzen im Juli 1999 in allen Sedimenttiefen des Transektes VII hohe Werte von $2,3$ bis $10,9 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$ und im September 1999 in den Sedimenttiefen 5 cm und 25 cm von $6,6$ - $8,5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$.

Die Denitrationspotenzen des Transektes V ($0,0$ - $1,1 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$) waren 1999 auf einem ähnlichem Niveau wie die entsprechenden Werte von Transekt I und III ($0,0$ - $1,4 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{Tag}^{-1}$).

Im Juli und September 1999 unterschieden sich die Denitrationspotenzen des Transektes VII von allen anderen Transekten (Mann-Whitney-U-Test: $p = 0,03$ - $0,01$). In den später untersuchten Interstitialwasserproben wurden keine signifikanten Unterschiede zu den anderen Transekten ermittelt (Kruskal-Wallis-Test $p > 0,05$). Es konnten auch keine signifikanten Unterschiede in den Denitrationspotenzen im Vergleich der einzelnen Tiefen innerhalb der vier Transekte gemessen werden (Kruskal-Wallis-Test: $p > 0,05$).

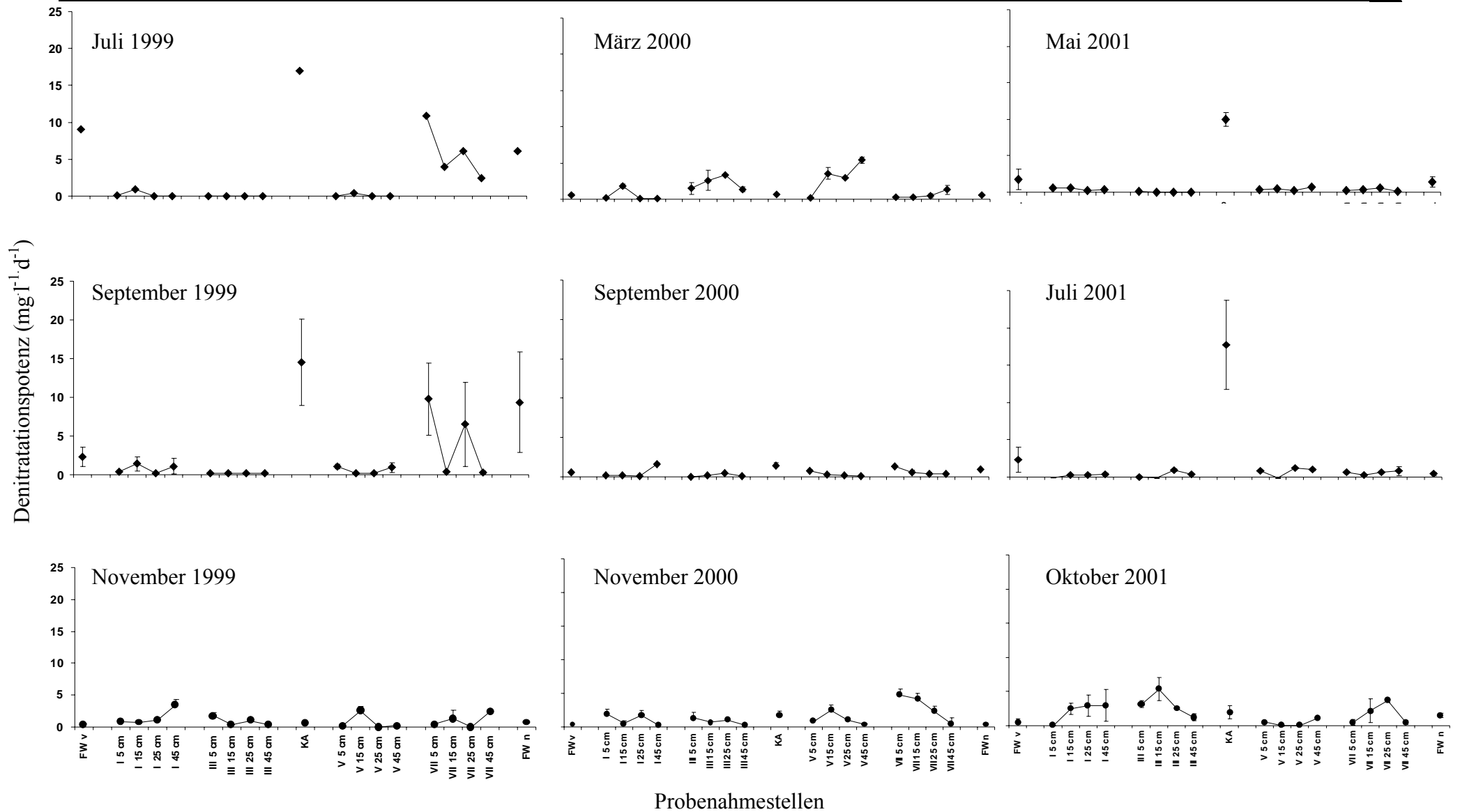


Abb. 20: Graphische Darstellung der Denitrationspotenzen der Wasserproben, gemessen an jeweils drei Probenahmeterminen in den Probenahmejahren 1999-2001. Die Wasserproben wurden aus dem Klärwasser (KA), aus der fließenden Welle flüßaufwärts (FW V) und flüßabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und aus den Sedimenttiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm der Transekte I, III, V und VII entnommen. Mittelwerte und Standardabweichung aus 2 Messungen pro Wasserprobe.

Zwischen den untersuchten chemisch-physikalischen Parametern $\text{NO}_3\text{-N}$, $\text{NO}_2\text{-N}$, Sauerstoffkonzentration, pH-Wert und elektrische Leitfähigkeit und den Werten der Denitrationspotenz konnte kein direkter Bezug hergestellt werden. Die hohe Nitratkonzentration im Klärwasser im Untersuchungsjahr 2000 hatte auf die Denitrationspotenzen in den Transekten V und VII keinen deutlichen Einfluß: Trotz erhöhter Nitritkonzentration während des gesamten Probenahmezeitraumes in Transekt V wurden dort keine erhöhten Denitrationspotenzen gemessen. Auch temporär stark erhöhte Nitratwerte im Zuge der Erweiterung und Flutung des Schönungsteiches Ende September 2000 und deutlich erniedrigten Sauerstoffkonzentrationen in Transekt III führten zum Zeitpunkt der Probenahme in diesem Bereich des Interstitials zu keiner erhöhten Denitrationspotenz.

Dagegen hatte die Ammoniumkonzentration einen Einfluß auf die Höhe der Denitrationspotenzen: Im Juli und September 1999 wurden hohe Werte für Ammoniumkonzentration und Denitrationspotenz im Klärwasser und in der fließenden Welle flußabwärts des Kläranlagenabflusses gemessen. Gleichzeitig wurden in den Interstitialwasserproben des Transektes VII hohe Ammoniumkonzentrationen und hohe Denitrationspotenzen gemessen.

Im darauffolgenden Untersuchungsjahr lagen im März und September 2000 niedrige Ammoniumkonzentrationen und Denitrationspotenzen im Klärwasser und in der fließenden Welle flußabwärts der Kläranlagenabflusses vor. Auch die Werte von Ammoniumkonzentration und Denitrationspotenz waren im Interstitial des Transektes VII erniedrigt.

Im Mai und Juli 2001 waren die Ammoniumkonzentrationen im Klärwasser und in der fließenden Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes auf einem niedrigen Niveau, während im Klärwasser hohe Denitrationspotenzen ermittelt wurden. In den Interstitialwasserproben des Transektes VII konnten an diesen Probenahmeterminen nur niedrige Ammoniumkonzentrationen und Denitrationspotenzen gemessen werden.

4.5 Isolierung und Verbreitung der denitrifizierenden Bakterien

Von Juli 1999 bis Oktober 2001 konnten aus der fließenden Welle, dem Klärwasser und den Interstitialwasserproben 79 denitrifizierende Bakterien isoliert werden. Zur Verifizierung der Fähigkeit zur Denitrifikation wurden die Reinkulturen erneut in Medien mit Durhamröhrchen inkubiert und nur positiv auf Gasproduktion und Nitrat- bzw. Nitritreduktion getestete Isolate mit in die Analyse einbezogen (vgl. Kapitel 3.4). Als Isolatbezeichnung wurde gewählt: 1. Monat – 2. Jahr – 3. laufende Nummer – 4. Probenahmestelle. Die Transekte tragen dabei die römischen Ziffern I, III, V und VII und die vier verschiedenen Entnahmehorizonte die Buchstaben A = 5 cm, B = 15 cm, C = 25 cm und D = 45 cm (Tab. 8).

Tab. 8: Tabellarische Auflistung der von Juli 1999 bis 2001 aus Wasserproben der fließenden Welle, der Sedimenttiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm der Transekte I, III, V und VII und des Klärwassers isolierten denitrifizierenden Bakterien mit Isolat-ID und Angaben über Probenahmetermin und -stelle.

Probenahmetermin	Probenahmestelle	Isolat-ID
September 1999	Fließende Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes	S99-57FWV
November 1999	Transekt I 25 cm	N99-3IC
	Transekt III 15 cm	N99-25IIIB
	Transekt III 45 cm	N99-89IIID
	Kläranlagenablauf	N99-35KA
	Transekt V 25 cm	N99-63VC
	Transekt V 25 cm	N99-61VC
	Transekt VII 45 cm	N99-52VIID
März 2000	Transekt I 15 cm	M00-10IB
	Transekt III 5 cm	M00-4IIIA
	Transekt III 5 cm	M00-14IIIA
	Transekt III 5 cm	M00-15IIIA
Mai 2000	Fließende Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes	M00-25FWV
	Fließende Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes	M00-66FWV
	Fließende Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes	M00-85FWV
	Kläranlagenablauf	M00-2KA
	Kläranlagenablauf	M00-4KA
	Kläranlagenablauf	M00-54KA
	Kläranlagenablauf	M00-71KA
	Transekt VII 25 cm	M00-29VIIC
	Transekt VII 45 cm	M00-76VIID
	Transekt VII 45 cm	M00-77VIID
	Fließende Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes	M00-13FWN
	Fließende Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes	M00-44FWN
Juli 2000	Transekt I 15 cm	A00-91IB
	Transekt I 45 cm	A00-100ID
	Transekt I 45 cm	A00-101ID
	Transekt I 45 cm	A00-124ID
	Transekt III 15 cm	A00-112IIIB
	Transekt III 15 cm	A00-113IIIB
	Transekt III 15 cm	A00-114IIIB
	Transekt III 45 cm	A00-115IIID
	Transekt III 45 cm	A00-119IIID
	Transekt III 45 cm	A00-133IIID
	Transekt III 45 cm	A00-174IIID
	Transekt III 45 cm	A00-175IIID
	Transekt III 45 cm	A00-181IIID
	Transekt III 45 cm	A00-198IIID
	Transekt V 5 cm	A00-95VA
	Transekt V 5 cm	A00-105VA
	Transekt V 5 cm	A00-106VA
	Transekt V 5 cm	A00-135VA
	Transekt V 15 cm	A00-107VB
	Transekt V 15 cm	A00-142VB

Probenahmetermin	Probenahmestelle	Isolat-ID
Juli 2000	Transekt V 15 cm	A00-155VB
September 2000	Transekt V 15 cm	S00-X4VB
	Transekt V 15 cm	S00-X5VB
	Transekt V 25 cm	S00-X3VC
	Transekt V 25 cm	S00-X7VC
	Fließende Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes	S00-X1FWN
	Fließende Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes	S00-X2FWN
November 2000	Kläranlagenablauf	N00-1KA
	Kläranlagenablauf	N00-3KA
	Kläranlagenablauf	N00-6KA
Juli 2001	Fließende Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes	J01-9FWV
	Fließende Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes	J01-10FWV
	Transekt III 5 cm	J01-6IIIA
	Transekt V 15 cm	J01-1VB
	Transekt V 15 cm	J01-2VB
	Kläranlagenablauf	J01-4KA
	Transekt VII 15 cm	J01-3VIIb
	Transekt VII 25 cm	J01-7VIIC
	Transekt VII 25 cm	J01-8VIIC
Fließende Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes	J01-5FWN	
Oktober 2001	Transekt I 25 cm	N01-5IC
	Transekt I 45 cm	N01-6ID
	Transekt I 45 cm	N01-11ID
	Transekt III 5 cm	N01-1IIIA
	Transekt III 5 cm	N01-3IIIA
	Transekt III 5 cm	N01-12IIIA
	Transekt III 5 cm	N01-14IIIA
	Transekt III 15 cm	N01-4IIIB
	Transekt III 25 cm	N01-16IIIC
	Kläranlagenablauf	N01-7KA
	Kläranlagenablauf	N01-10KA
	Transekt VII 5 cm	N01-9VIIA
	Transekt VII 15 cm	N01-8VIIb
	Transekt VII 45 cm	N01-13VIID
	Fließende Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes	N01-2FWN

In die Untersuchung der denitrifizierenden Bakterien der Lahn wurden für die ARDRA-Analyse und für die Ermittlung der zeitlichen und räumlichen Verbreitung 16 denitrifizierende Isolate miteinbezogen, die im Jahr 1997 von Frau Dr. Christina Bolanös an der gleichen Untersuchungsstrecke aus dem Interstitial der Lahn isoliert wurden (Tab. 9).

Tab. 9: Tabellarische Auflistung der im Juni 1997 aus Wasserproben der Sedimenttiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm der Transekte I und V isolierten denitrifizierenden Bakterien mit Isolat-ID und Angaben über Probenahmetermin und -stelle.

Probenahmetermin	Probenahmestelle	Isolat-ID
Juni 1997	Transekt I 5 cm	C97-11A
	Transekt I 5 cm	C97-3IA3
	Transekt I 15 cm	C97-4IB
	Transekt I 45 cm	C97-5ID2
	Transekt I 15 cm	C97-6IB2
	Transekt I 45 cm	C97-7ID
	Transekt V 5 cm	C97-8IVA
	Transekt V 5 cm	C97-9IVA
	Transekt V 5 cm	C97-10 VA
	Transekt V 15 cm	C97-11VB
	Transekt V 15 cm	C97-12VB2
	Transekt V 25 cm	C97-13VC
	Transekt V 25 cm	C97-14VC2
	Transekt V 45 cm	C97-15VD
	Transekt V 45 cm	C97-16VD2
	Transekt V 45 cm	C97-17VD2

Insgesamt wurden somit 95 denitrifizierende Isolate aus den Untersuchungsjahren 1997 und 1999-2001 für die ARDRA-Analyse und die Untersuchungen zur räumlichen sowie zeitlichen Verbreitung und Variabilität kultivierbarer denitrifizierenden Bakterien verwendet (Tab. 10).

Tab. 10: Tabellarische Übersicht über die Anzahl der isolierten denitrifizierenden Bakterien, die im Zeitraum von Juni 1997 bis Oktober 2001 aus dem Klärwasser (KA), aus der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und aus den Interstitialwasserproben der Transekte I, III, V und VII mit den vier verschiedenen Sedimenttiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm isoliert wurden. Für alle Probenahmestellen und -termine ist die Summe der isolierten Bakterien angegeben.

	Oberhalb des Kläranlagenablaufes										Unterhalb des Kläranlagenablaufes								Σ	
	FW v	Transekt I				Transekt III				KA	Transekt V				Transekt VII					FW n
		5cm	15cm	25cm	45cm	5cm	15cm	25cm	45cm		5cm	15cm	25cm	45cm	5cm	15cm	25cm	45cm		
Jun 97		2	2		2						3	2	2	3						
Sep 99	1																		1	
Nov 99				1			1		1	1			2					1	7	
Mrz 00			1				3												4	
Mai 00	3									4							1	2	12	
Jul 00			1		3			3		7	4	3							21	
Sep 00												2	2						6	
Nov 00										3									3	
Jul 01	2					1				1		2			1	2			10	
Okt 01				1	2	4	1	1		2					1	1		1	15	
Σ	6	2	4	2	7	8	5	1	8	11	7	9	6	3	1	2	3	4	6	95

Denitrifizierende Bakterien wurden aus allen Probenahmestellen und Sedimenttiefen isoliert. Die meisten denitrifizierenden Isolate stammen aus dem Klärwasser. Es konnte weder eine Korrelation zwischen Isolierungstermin und Isolierungshäufigkeit noch ein tiefenabhängiges Verteilungsmuster oder eine Bevorzugung bestimmter Transekte festgestellt werden (Tab. 11).

Tab. 11: Tabellarische Darstellung der räumlichen Verbreitung der 95 denitrifizierenden Bakterienstämme, isoliert aus dem Klärwasser (KA), aus der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und aus den Interstitialwasserproben der Transekte I, III, V und VII mit den vier verschiedenen Sedimenttiefen 5, 15, 25 und 45 cm. Für alle Probenahmestellen ist die Summe der an dieser Stelle isolierten Bakterien an allen Probenahmeterminen angegeben.

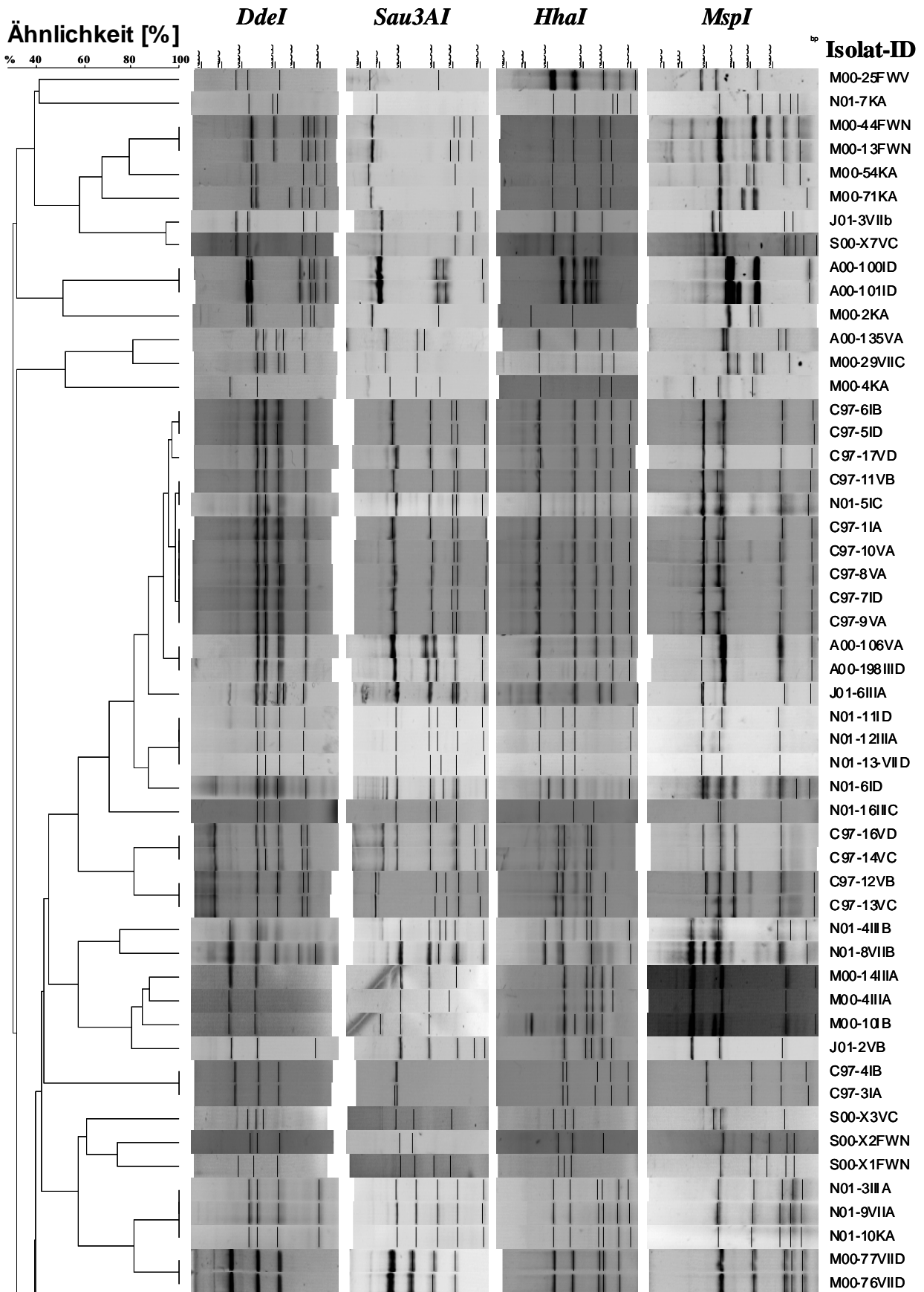
Probenahmestelle Sedimenttiefe	Flußaufwärts des Kläranlagenablaufes				Flußabwärts des Kläranlagenablaufes			Σ
	FW V	I	III	KA	V	VII	FW N	
5 cm	6	2	8	11	7	1	6	23
15 cm		4	5		9	2		18
25 cm		2	1		6	3		20
45 cm		7	8		3	4		12
Σ	6	15	22	11	25	10	6	22

Es konnten zwar in den Transekten I und VII in einer Sedimenttiefe von 45 cm mehr Isolate gewonnen werden, als in den Sedimenttiefen 5, 15 und 25 cm, es wurde aber keine deutliche Tiefenpräferenz nachgewiesen. Ein Vergleich der flußaufwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Transekte I und III zu den flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Transekten V und VII wies nur geringfügige Unterschiede bezüglich der Isolatanzahl auf. Ein Einfluß der Kläranlage auf die Verteilung der isolierten Bakterien ist nicht festzustellen. Auffällig ist die vergleichsweise geringe Anzahl isolierter denitrifizierender Bakterien aus den Transekten I und VII im Vergleich zu den Transekten III und V.

4.6 Molekulargenetische Charakterisierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien

4.6.1 Phylogenetische Analyse der denitrifizierenden Bakterien mittels ARDRA

Damit Aussagen über zeitliche und räumliche Veränderungen in Bezug auf die Zusammensetzung der denitrifizierenden Bakterienpopulation getroffen werden können, wurden mit Hilfe der ARDRA-Methode die denitrifizierenden Isolate phylogenetisch differenziert und gruppiert. Anhand der unterschiedlichen Restriktionsfragmentlängen der geschnittenen 16S rDNA wurden die 95 denitrifizierenden Isolate mit Hilfe des Computerprogramms GelCompareII (Applied Maths, Kortrijk, Belgien) einer Clusteranalyse unterzogen. So konnten aus den ursprünglich 95 denitrifizierenden Isolaten - basierend auf der Ähnlichkeit der Restriktionsfragmentlängen der 16S rDNA bei den vier verschiedenen Enzymen - 63 verschiedene Genotypen identifiziert werden (Abb. 21).



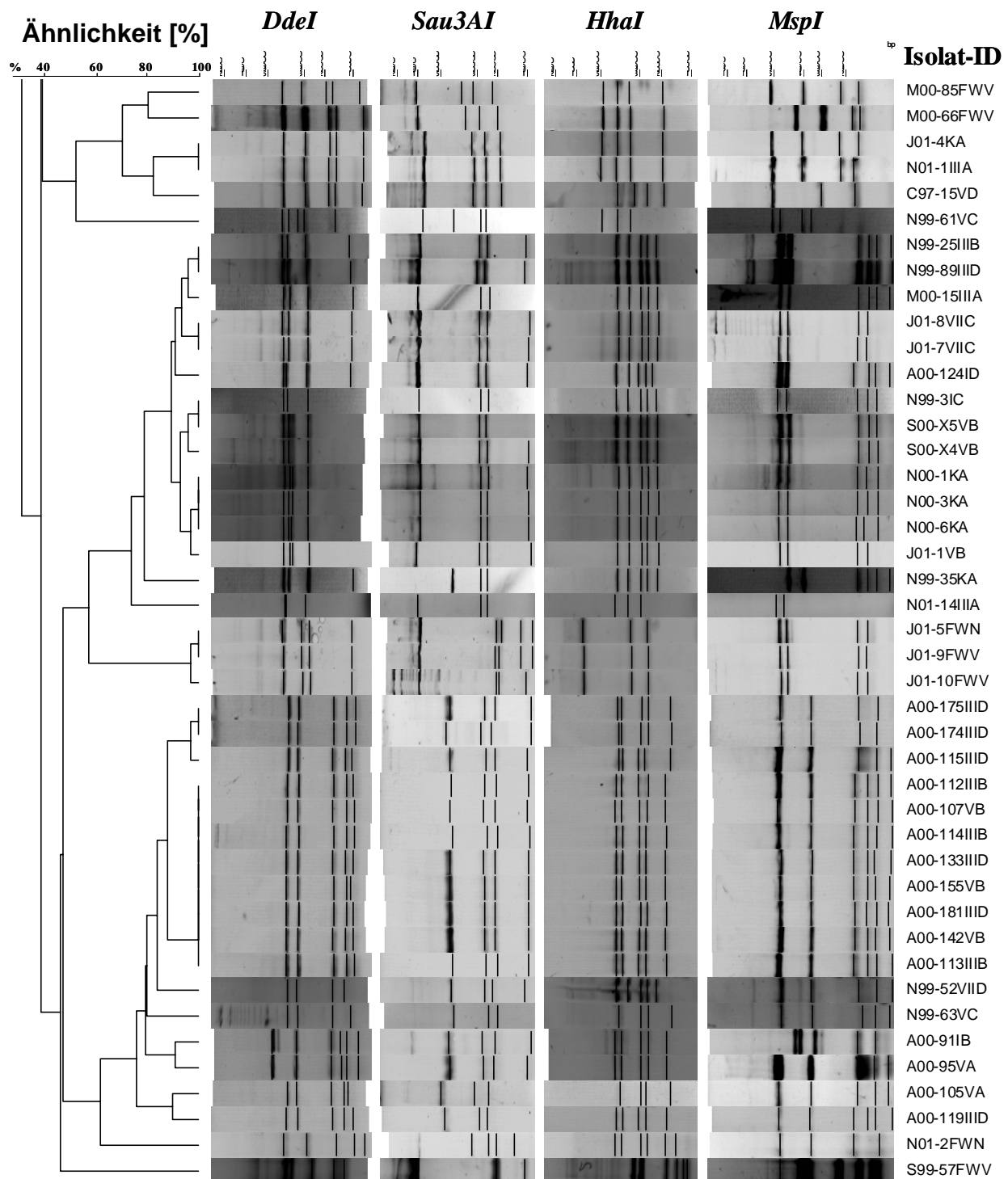


Abb. 21: Dice/UPGMA Clusteranalyse anhand der unterschiedlichen Restriktionsfragmentlängen der durch vier verschiedene Endonukleasen geschnittenen 16S rDNA der 95 isolierten denitrifizierenden Bakterien. Die unterschiedlichen Restriktionsfragmentlängen sind als Banden definiert.

Die Genotypen, deren Restriktionsfragmentlängen eine Ähnlichkeit von $> 70\%$ aufwiesen, wurden zu ARDRA-Gruppen zusammengefasst. Insgesamt konnten 24 unterschiedliche ARDRA-Gruppen identifiziert werden (Abb. 22). Die Anzahl von Isolaten, die in eine ARDRA-Gruppe gruppiert wurden, variiert sehr stark. So enthalten die ARDRA-Gruppen 9, 19 und 22 mehr als 14 Isolate, wogegen die ARDRA-Gruppen 1, 2, 5, 6, 8, 14, 18, 20, 23 und 24 nur mit jeweils einem

Isolat vertreten sind. 2 – 5 Isolate sind in den ARDRA-Gruppen 3, 4, 7, 10 - 13, 15, 17 und 21 vorhanden.

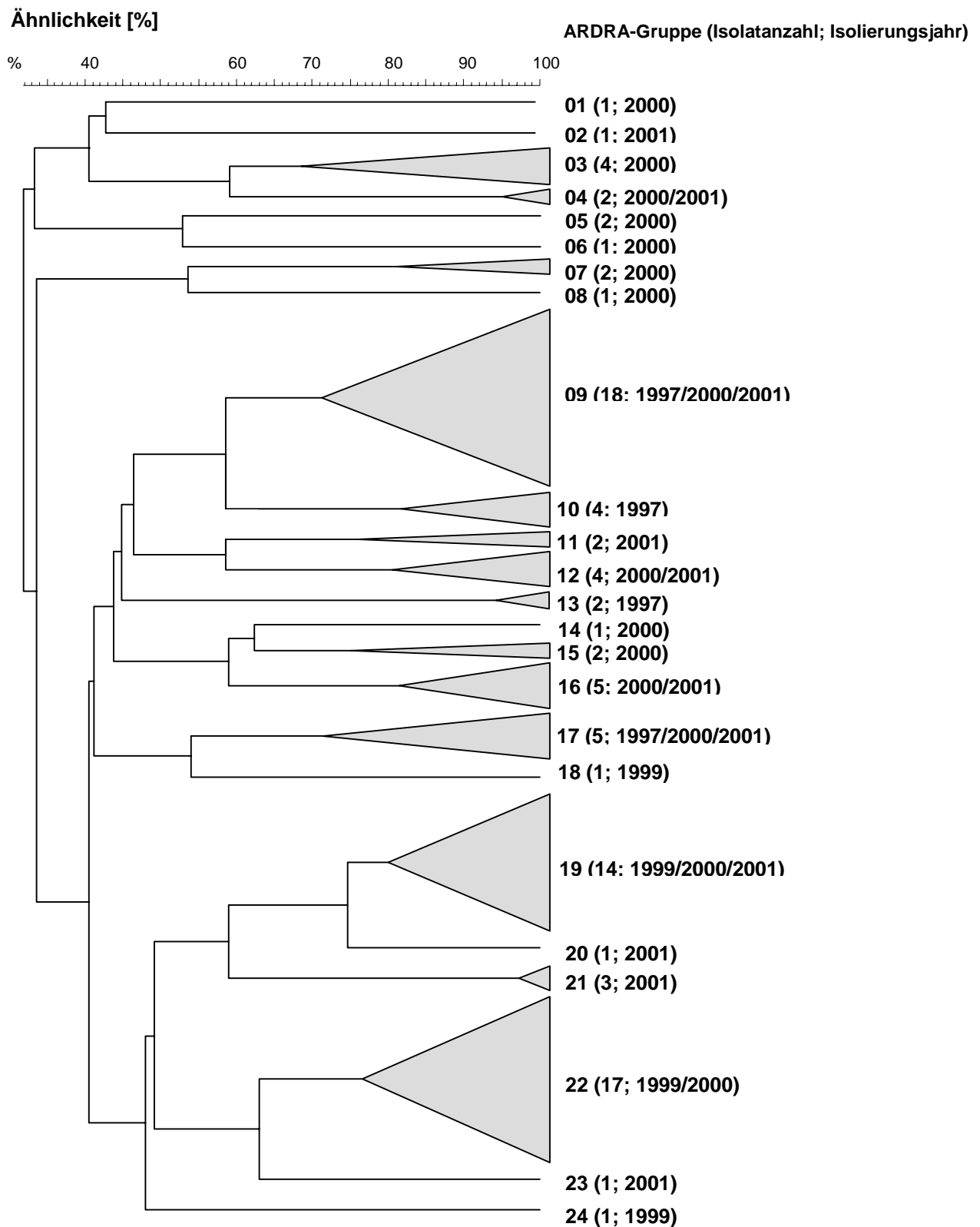


Abb. 22: Graphische Darstellung der kondensierten Dice/UPGMA Clusteranalyse anhand der unterschiedlichen Restriktionsfragmentlängen der durch vier Endonukleasen geschnittenen 16S rDNA der 95 denitrifizierenden Isolate. Mit dem Computerprogramm GelcompareII wurden die einzelnen ARDRA-Gruppen kondensiert. Die Nummern bezeichnen die ARDRA-Gruppen. In den Klammern werden mit den Zahlen die Anzahl der Isolate in dieser ARDRA-Gruppe angegeben sowie die Jahre, in denen die Bakterien dieser Gruppe isoliert wurden.

Betrachtet man die phylogenetische Auftrennung der verschiedenen Isolate durch die ARDRA-Analyse, unterscheiden sich die ARDRA-Gruppen 1 - 6 mit einer geringen Ähnlichkeit (33 %) von den ARDRA-Gruppen 7 - 24. Die ARDRA-Gruppen 7 und 8 wiederum bilden ein separates Cluster, das sich mit einer Ähnlichkeit von 34 % klar von den ARDRA-Gruppen 9 - 24 unterscheidet. Innerhalb dieses großen Clusters werden die ARDRA-Gruppen 19 - 24 mit einer Ähnlichkeit von 40 % von den ARDRA-Gruppen 9 - 18 separiert. Mit ca. 70 % Ähnlichkeit der Restriktionsfragmentlängen der 16S rDNA liegt die höchste Diversität innerhalb der ARDRA-Gruppen 3, 9 und 17 vor, wogegen in den ARDRA-Gruppen 4, 13 und 21 mit ca. 95 % Übereinstimmung die größte Ähnlichkeit nachweisbar ist.

Zeitliche Stabilität:

Betrachtet man die unterschiedlichen Isolierungszeiträume, so konnten die Isolate der ARDRA-Gruppen 9, 17 und 19 in drei verschiedenen Probenahmejahren isoliert werden (Tab. 12). In zwei verschiedenen Untersuchungsjahren konnten Bakterien der ARDRA-Gruppen 4, 12, 16 und 22 detektiert werden. Eine Isolierung in nur jeweils einem Untersuchungsjahr erfolgte bei den ARDRA-Gruppen 1 – 3, 5 – 11, 13 – 15, 18, 20, 21, 23 und 24.

Tab. 12: Tabellarische Auftrennung der ARDRA-Gruppen in Bezug auf den Probenahmezeitraum, in dem die Isolate der jeweiligen ARDRA-Gruppe isoliert werden konnten.

Isolierungszeitraum	1997	1999	2000	2001
ARDRA-Gruppen				
10, 13	x			
18, 24		x		
1, 3, 5 – 8, 14, 15			x	
2, 11, 20, 21, 23				x
22		x	x	
4, 12, 16			x	x
9, 17	x		x	x
19	x		x	x

Großgruppe A: Die Großgruppe A umfaßt die ARDRA-Gruppen 1, 5, 13, 20 und 24. Ihre Isolate stammen aus Wasserproben von flußaufwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Entnahmestellen. Sie wurden nicht im Klärwasser oder in Wasserproben von flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Entnahmestellen gefunden (Tab. 13).

Mit insgesamt nur sieben denitrifizierenden Bakterien wurden in dieser Großgruppe vergleichsweise wenige Isolate eingruppiert. Die verschiedenen ARDRA-Gruppen dieser Großgruppe enthalten nur höchstens zwei Isolate pro Gruppe und konnten jeweils nur an einem Probenahmetermin isoliert werden. Die ARDRA-Gruppen 1 und 24 enthalten jeweils einen aus der fließenden Welle isolierten denitrifizierenden Stamm. In den ARDRA-Gruppen 5 und 13 sind jeweils zwei denitrifizierende Isolate zusammengefaßt, die aus Wasserproben des Transektes I stammen, während die ARDRA-Gruppe 20 nur von einem Isolat gebildet wird, das aus dem Transekt III isoliert werden konnte.

In der ARDRA-Analyse weisen die Isolate der Großgruppe A starke Unterschiede bezüglich ihrer Restriktionsfragmentlängen der 16S rDNA Region auf (Abb. 22).

Großgruppe B: Im Gegensatz zu den Isolaten der Großgruppe A umfaßt die Großgruppe B mit den ARDRA-Gruppen 2 - 4, 6 - 8, 10, 14, 15, 18 und 23 Isolate, die aus Wasserproben von flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Entnahmestellen und/oder aus dem Klärwasser selbst, aber nicht aus Wasserproben der flußaufwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Entnahmestellen isoliert werden konnten (Tab. 13).

In dieser Großgruppe sind insgesamt 20 denitrifizierende Stämme enthalten, wobei die verschiedenen ARDRA-Gruppen mit bis zu vier Isolaten vertreten sind.

Die ARDRA-Gruppen 2, 6 und 8 sind jeweils mit einem Isolat vertreten, das ausschließlich in Wasserproben des Klärwassers detektiert wurde, während die Isolate der ARDRA-Gruppe 3 neben dem Klärwasser auch aus der fließenden Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes isoliert werden konnten. Jeweils ein Isolat aus Transekt V und VII wird in der ARDRA-Gruppe 4 und 7 zusammengefaßt. In der ARDRA-Gruppe 10 sind vier Isolate der tieferen Sedimentschichten 15 - 45 cm des Transektes V zusammengefaßt. Die denitrifizierenden Bakterien der ARDRA-Gruppen 14 und 18 konnten jeweils aus einer Sedimenttiefe von 25 cm des Transektes V isoliert werden. Ausschließlich aus Wasserproben der fließenden Welle flußabwärts der Kläranlagenablaufes stammen die Bakterien der ARDRA-Gruppen 15 und 23.

Großgruppe C: In dieser Großgruppe wurden die ARDRA-Gruppen 9, 11, 16, 17, 19, 21 und 22 zusammengefaßt. Diese Isolate stammen aus Wasserproben sowohl flußaufwärts als auch flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Entnahmestellen und aus dem Klärwasser (Tab. 13). Mit insgesamt 68 Denitrifikanten gehören dieser Großgruppe die meisten Isolate an.

Die drei denitrifizierenden Bakterien der ARDRA-Gruppe 21 konnten ausschließlich aus der fließenden Welle isoliert werden. Die fünf Isolate, die der ARDRA-Gruppe 16 angehören, wurden aus Wasserproben des Klärwassers und des Interstitials von Transekt III und VII isoliert. In der ARDRA-Gruppe 17 wurden insgesamt fünf Isolate zusammengefaßt, die aus der fließenden Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes, aus dem Klärwasser und aus den Interstitialwasserproben des Transektes III und V stammen. In den ARDRA-Gruppen 9, 19 und 22 wurden mit 14 – 18 Isolaten die meisten Isolate zusammengefaßt. Die Isolate der ARDRA-Gruppen 9 und 22 wurden in allen vier Transekten detektiert, während in der ARDRA-Gruppe 22 auch Isolate aus dem Klärwasser enthalten sind. Die Isolate der ARDRA-Gruppe 11 und 12 konnten nur aus Interstitialwasserproben isoliert werden.

Tab. 13: Tabellarische Darstellung der Anzahl der denitrifizierenden Isolate pro Probenahmestelle. Gruppert mit dem Isolierungsjahr in ARDRA-Gruppen und in drei Großgruppen in Abhängigkeit von der Lage der Entnahmestelle der Wasserproben: Großgruppe A: ARDRA-Gruppen mit Isolaten, die aus Wasserproben von flußaufwärts des Kläranlagenablaufes (KA) gelegenen Entnahmestellen stammen (FW V und Transekte I und III); Großgruppe B: ARDRA-Gruppen mit Isolaten, die aus Wasserproben von flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Entnahmestellen (FW N und Transekte V und VII) und/oder aus dem Klärwasser (KA) selbst stammen; Großgruppe C: ARDRA-Gruppen mit Isolaten, die aus Wasserproben von sowohl flußaufwärts als auch flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Entnahmestellen und/oder aus dem Klärwasser stammen.

Großgruppe	ARDRA-Gruppe	Probenahmestellen flußaufwärts des Kläranlagenablaufes				Probenahmestellen flußabwärts des Kläranlagenablaufes			Isolationsjahr
		FW V	Transekt I	Transekt III	KA	Transekt V	Transekt VII	FW N	
A	1	1							2000
	5		2						2000
	13		2						1997
	20			1					2001
	24	1							1999
B	2				1				2001
	3				2			2	2000
	4					1	1		2000/01
	6				1				2000
	7					1	1		2000
	8				1				2000
	10					4			1997
	14					1			2000
	15							2	2000
	18					1			1999
23							1	2001	
C	9		7	4		6	1		1997/2000/01
	11			1			1		2001
	12		1	2		1			2000/01
	16			1	1		3		2000/01
	17	2		1	1	1			1997/2000/01
	19		2	3	4	3	2		1999/2000/01
	21	2						1	2001
	22		1	9		6	1		1999/2000

Für die weiteren Untersuchungen wurde aus jeder ARDRA-Gruppe mindestens ein Bakterienstamm in die Analysen miteinbezogen.

4.6.2 Detektierung des Nitritreduktasetyps mittels PCR

Die Amplifizierung von Teilfragmenten des Nitritreduktasegens wurde als zusätzliche Informationsquelle über die Diversität und Struktur der denitrifizierenden Bakterienpopulation und zur weiteren Verifizierung der Fähigkeit zur Denitrifikation genutzt (HALLIN & LINDGREN 1999, BRAKER et al. 2000, BRAKER et al. 2001). Die Nitritreduktase liegt in denitrifizierenden Bakterien entweder als cytochrom-*cd*₁-haltiges oder als kupferhaltiges Enzym vor. Eine Koexistenz der beiden strukturell unterschiedlichen Enzyme in einem Bakterium ist bisher nicht nachgewiesen worden. Mit Hilfe des von BRAKER et al. (1998) entwickelten Primerpaares *nirS*1F/*nirS*6R wurde ein 890 bp langes internes Fragment des Gens der cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktase (*nirS*) und mit dem Primerpaar *nirK*1F/*nirK*5R ein 514 bp langes internes Fragment des Gens der kupferhaltigen Nitritreduktase (*nirK*) amplifiziert (Abb. 24).

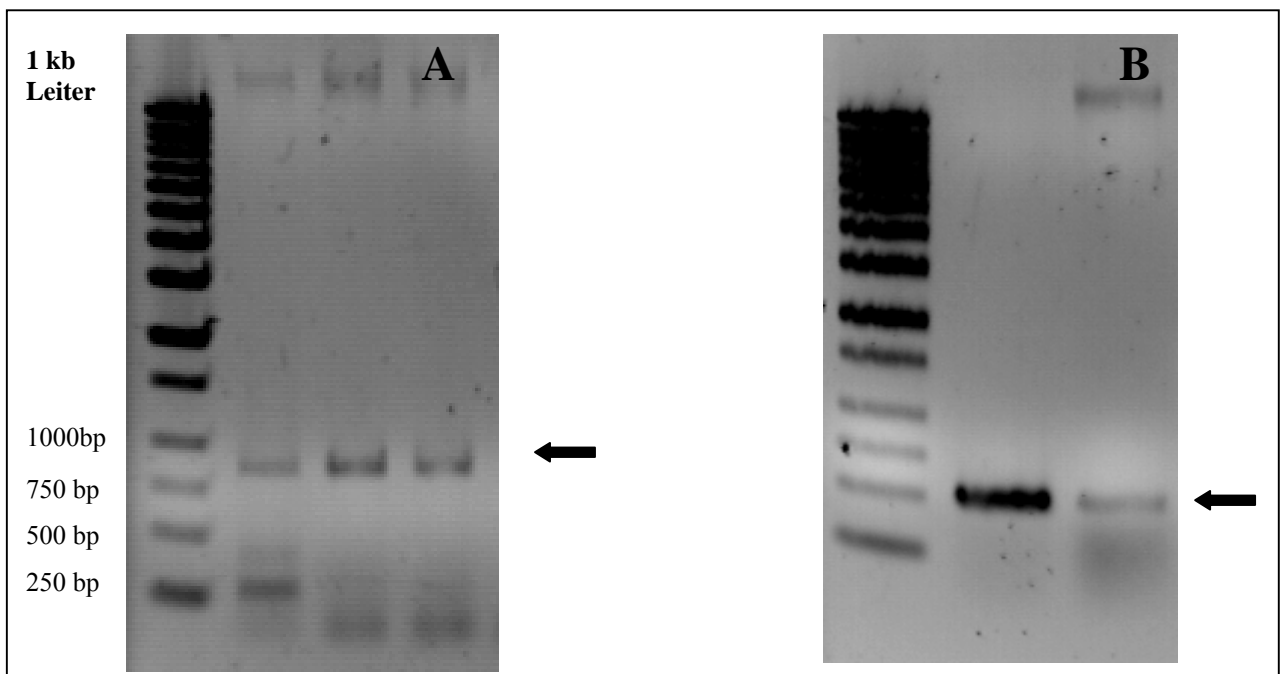


Abb. 24: Photographische Dokumentation der gelelektrophoretischen Auftrennung des Amplifizierungsproduktes des Nitritreduktasegens aus der genomischen Gesamt-DNA von denitrifizierenden Isolatzen zur Detektierung des Nitritreduktasetyps. Gel A: 890 bp langes Fragment (Pfeil) der cytochrom-*cd*₁-haltigen Nitritreduktase (*NirS*). Gel B: 514 bp langes Fragment (Pfeil) der kupferhaltigen Nitritreduktase (*NirK*).

Bei insgesamt 39 Isolatzen wurden mit Hilfe des Primersystems von BRAKER et al. (1998) DNA-Fragmente des Gens der Nitritreduktase amplifiziert (Tab. 14): Es konnte bei 35 der untersuchten denitrifizierenden Bakterien aus der Lahn ein Teilfragment des Gens der cytochrom-*cd*₁-haltigen Nitritreduktase (*NirS*) nachgewiesen werden, während bei nur vier der untersuchten Isolate der Nachweis der kupferhaltigen Nitritreduktase (*NirK*) erbracht werden konnte. Die vier Isolate, bei denen das Gen der kupferhaltigen Nitritreduktase identifiziert werden konnte, stammen aus der

fließenden Welle (M00-25FWV und S99-57FWV) und aus dem Klärwasser (N01-7KA und M00-2KA).

Tab. 14: Tabellarische Darstellung des Nitritreduktasetyps bei 39 aus der Lahn isolierten denitrifizierenden Bakterienstämmen.

Großgruppe	ARDRA-Gruppe	Isolat-ID	Typ der Nitritreduktase
A	1	M00-25FWV	NirK
	5	A00-100ID	NirS
	5	A00-101ID	NirS
	20	N01-14IIIA	NirS
	24	S99-57FWV	NirK
B	2	N01-7KA	NirK
	3	M00-13FWN	NirS
	3	M00-54KA	NirS
	4	S00-X7VC	NirS
	6	M00-2KA	NirK
	7	M00-29VIIC	NirS
	8	M00-4KA	NirS
	14	S00-X3VC	NirS
	15	S00-X2FWN	NirS
	18	N99-61VC	NirS
	23	N01-2FWN	NirS
	C	9	N01-5IC
9		N01-12IIIA	NirS
9		A00-106VA	NirS
9		A00-198IIID	NirS
12		N01-3IIIA	NirS
12		M00-4IIIA	NirS
12		M00-10IB	NirS
12		M00-14IIIA	NirS
16		M00-76VIID	NirS
17		M00-85FWV	NirS
17		N01-1IIIA	NirS
19		N99-3IC	NirS
19		S00-X5VB	NirS
19		M00-15IIIA	NirS
19		N99-25IIIB	NirS
19		N99-35KA	NirS
19		N99-89IIID	NirS
19		A00-124ID	NirS
22		N99-52VIID	NirS
22		N99-63VC	NirS
22	A00-91IB	NirS	
22	A00-114IIIB	NirS	
22	A00-155VB	NirS	

4.7 Physiologische Charakterisierung und Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien

4.7.1 Physiologische Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien mittels des MicroLog-Systems

Die Identifizierungsmethode des MicroLog-Systems basiert auf der charakteristischen Verwertung von unterschiedlichen Kohlenstoffquellen durch die zu bestimmenden Bakterien. Für eine eindeutige Identifizierung der denitrifizierenden Isolate durch das MicroLog-System sind zwei vom Testsystem vorgeschriebene Bedingungen entscheidend: Die Ähnlichkeitswerte müssen bei einer Inkubationszeit von 24 h über 50 % und die Aktivität der Testbakterien mußte in einem Bereich von ca. 20 – 85 % liegen. Liegt bei den untersuchten denitrifizierenden Bakterien eine Nicht-Differenzierbarkeit der taxonomischen Einheit bzw. der verschiedenen Stämme einer entsprechenden Gruppe vor, so sind im MicroLog-System Gruppen- oder Stammidentifikationen in den Datenbanken enthalten (z.B. Gruppenidentifikation für *Pseudomonas* oder Unterscheidung von *Pseudomonas fluorescens* Biotyp C und F). Es ist bei der Identifizierung durch das MicroLog-System zu beachten, daß in Abhängigkeit von der taxonomischen Gruppe eine unterschiedliche Differenzierung bezüglich der taxonomischen Tiefe vorliegt. Dabei sind auch Unterschiede bezüglich der Definition der Taxa zu berücksichtigen. Alle Isolate wurden jeweils auf für Gram positive und negative Bakterien entwickelte MicroLog-Platten getestet, da eine falsche Einordnung der Isolate zu falsch-positiver Identifizierung führen kann (HOCH 1999). Eine eindeutige Identifizierung der Isolate mit dem MicroLog-System ist nur möglich, wenn die Testbakterien einen ausreichenden und keinen übermäßigen Wuchs auf den MicroLog-Platten aufweisen. Trotz des Versuches, den Bakterientiter im Inokulum anzupassen, konnte bei einigen Isolaten keine eindeutige Identifizierung durch das MicroLog-System innerhalb der Inkubationszeit von bis zu 24 Stunden erreicht werden. Aus jeder ARDRA-Gruppe wurde mindestens ein Stamm für die Identifizierung mittels des MicroLog-Systems eingesetzt.

Drei Isolate der **Großgruppe A** konnten mit Hilfe des MicroLog-Systems identifiziert werden. Das Isolat A00-101ID, der ARDRA Gruppe 5 zugeordnet, wurde mit 57 %iger Ähnlichkeit bezüglich der physiologischen Eigenschaften als *Pseudomonas fluorescens* Biotyp F identifiziert; bei dem Isolat A00-100ID derselben ARDRA-Gruppe konnte die Zugehörigkeit dieses Bakteriums zum Genus *Pseudomonas* (41 %) ermittelt werden (Tab. 15). Das Isolat N01-14IIIA aus der ARDRA-Gruppe 20 wurde mit 70 %iger Ähnlichkeit als *Klebsiella pneumoniae* identifiziert. In der Großgruppe A wiesen zwei weitere Isolate der ARDRA-Gruppen 1 (M00-25FWN) und 24 (S99-57FWV) aufgrund ihrer physiologischen Eigenschaften keine eindeutige Übereinstimmung mit den Datenbanken des MicroLog-Systems auf.

Tab. 15: Tabellarische Darstellung der physiologischen Identifizierungsergebnisse von den isolierten denitrifizierenden Bakterienstämmen mittels des MicroLog-Systems gruppiert nach Groß- und ARDRA-Gruppen. Hinter den identifizierten Stämmen ist in Klammern die Ähnlichkeit mit dem in der Datenbank enthaltenen Kohlenstoffverwertungsmuster in Prozent angegeben. Bei einigen Isolaten war eine eindeutige Identifizierung der untersuchten Bakterien anhand ihrer physiologischen Eigenschaften nicht möglich (n b).

Großgruppe	ARDRA-Gruppe	Isolat-ID	Identifizierung
A	1	M00-25FWV	n b (<i>Serratia ficaria</i> 35%)
	5	A00-100ID	Genus-ID: <i>Pseudomonas</i> (41 %)
	5	A00-101ID	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotyp F(57%)
	20	N01-14IIIA	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (70%)
	24	S99-57FWV	n b
B	2	N01-07KA	n b
	3	M00-13FWN	<i>Comamonas terrigena</i> (56%)
	3	M00-54KA	<i>Delftia acidovorans</i> (50%)
	4	S00-X7VC	n b
	6	M00-02KA	<i>Alcaligenes faecalis</i> (64%)
	7	M00-29VA	Genus ID: <i>Pseudomonas</i> (42 %)
	8	M00-04KA	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> (80 %)
	14	S00-X3VC	n b
	15	S00-X1FWN	n b
	18	N99-61VC	n b
	23	N01-02FWN	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (61%)
C	9	N01-05IC	n b
	9	J01-06IIIA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (61%)
	9	N01-16IIIC	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (57%)
	11	N01-04IIIB	Genus ID: <i>Aeromonas</i> (29 %)
	11	N01-08VIIB	n b
	12	M00-04IIIA	Genus ID <i>Pseudomonas</i> (45 %)
	12	M00-10IB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotyp C (77%)
	12	M00-14IIIA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotyp C (64%)
	16	N01-10KA	Genus ID: <i>Enterobacter</i> (37 %)
	16	M00-76VIID	<i>Escherichia coli</i> (80%)
	17	M00-66FWV	n b
	17	M00-85FWV	n b
	17	N01-01IIIA	n b
	19	N99-03IC	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotyp C (77%)
	19	S00-X5VB	Genus ID <i>Pseudomonas</i> (35 %)
	19	M00-15IIIA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotyp C (65 %)
	19	N99-25IIIB	<i>Pseudomonas nitroreducens/azelaica</i> (62%)
	19	N99-35KA	Genus ID <i>Pseudomonas</i> (42 %)
	19	N99-89IIID	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotyp C (64 %)
	19	A00-124ID	<i>Pseudomonas asplenii</i> (77%)
	21	J01-05FWN	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotyp C (67%)
	22	N99-52VIID	Genus ID <i>Pseudomonas</i> (33 %)
	22	N99-63VC	Genus ID <i>Pseudomonas</i> (41 %)
	22	A00-91IB	n b
22	A00-114IIIB	<i>Pseudomonas fluorescens</i> Biotyp C (69%)	
22	A00-142VB	<i>Shewanella putrefaciens</i> (69%)	
22	A00-155VB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (81%)	

In der **Großgruppe B** wurden in der ARDRA-Gruppe 3 mit 56 %iger Ähnlichkeit *Comamonas terrigena* (M00-13FWN) und mit 50 %iger Ähnlichkeit *Delftia acidovorans* (M00-54KA) identifiziert, die beide der Familie der Comamonadaceae angehören. Des weiteren wurden die

Isolate M00-2KA mit 64 %iger Ähnlichkeit als *Alcaligenes faecalis* (ARDRA-Gruppe 6), M00-4KA mit 80 %iger Ähnlichkeit als *Pseudomonas pseudoalcaligenes* (ARDRA-Gruppe 8) und N01-2FWN mit 61 %iger Ähnlichkeit als *Klebsiella pneumoniae* (ARDRA-Gruppe 23) identifiziert. In ARDRA-Gruppe 7 wurde das Isolat M00-29VA als *Pseudomonas* Spezies (42 %) identifiziert. Bei den Isolaten der ARDRA-Gruppen 2, 4, 14, 15 und 18 war keine eindeutige Identifizierung anhand der physiologischen Eigenschaften möglich.

Bei der Identifizierung von Stämmen der Familie der *Comamonadaceae* (*Comamonas* und *Delftia* Spezies) ist darauf hinzuweisen, daß in der Datenbank des MicroLog-Systems nur die Stämme *Comamonas terrigena* und *Delftia acidovorans* enthalten sind. Eine Identifizierung als *Comamonas terrigena* oder *Delftia acidovorans* ist demnach eher als Zugehörigkeit des untersuchten Bakteriums zur Familie der *Comamonadaceae* zu verstehen. *Delftia acidovorans* (früher *Comamonas acidovorans*) wurde von WEN et al. (1999) von den Stämmen der Gattung *Comamonas* abgegrenzt und bildet mit der 2003 neu beschriebenen Art *Delftia tsuruhatensis* die Gattung *Delftia* (SHIGEMATSU et al. 2003). Im folgenden werden Stämme der Gattungen *Comamonas* und *Delftia* unter dem Familiennamen *Comamonadaceae* zusammengefaßt.

In der **Großgruppe C** wurden neben unterschiedlichen *Pseudomonas* Stämmen auch Stämme anderer Gattungen gefunden. In der ARDRA-Gruppe 9 konnten neben einem nicht durch das MicroLog-System identifizierbaren Isolat (N01-05IC) zwei Isolate (J01-06ID und J01-16IIC) mit 61 %iger Ähnlichkeit als *Stenotrophomonas maltophilia* und ein Isolat (A00-198IIID) mit 61 %iger Ähnlichkeit als *Enterobacter cloacae* identifiziert werden. Eines der beiden Isolate (N01-04IIB) der ARDRA-Gruppe 11 konnte als *Aeromonas* Spezies identifiziert werden, wogegen bei dem anderen Isolat (N01-08VIIB) eine eindeutige Identifizierung nicht möglich war. Zwei Isolate (M00-10IB und M0014IIIA) der ARDRA-Gruppe 12 wurden mit 64 %iger und 77 %iger Ähnlichkeit als *Pseudomonas fluorescens* Biotyp C und ein Isolat (M00-04IIIA) als *Pseudomonas* Spezies (45 %) identifiziert. In der ARDRA-Gruppe 16 wurde ein Isolat (M00-76VIID) mit 80 %iger Ähnlichkeit als *Escherichia coli* identifiziert, während ein Isolat (N01-10KA) dieser ARDRA-Gruppe nur eine geringe physiologisch begründete Ähnlichkeit von 37 % zu *Enterobacter* Spezies aufwies. In der ARDRA-Gruppe 17 konnte keines der drei untersuchten Isolate (M00-66FWV, M00-85FWN und N01-01IIIA) mit Hilfe des MicroLog-Systems eindeutig identifiziert werden. In der ARDRA-Gruppe 19 wurden drei Isolate (N99-03IC, N99-89IIID und M00-15IIIA) als *Pseudomonas fluorescens* Biotyp C (64 %ige, 65%ige und 77 %ige Ähnlichkeit), zwei Isolate (S00-X5VB und N99-35KA) als *Pseudomonas* Spezies (35 %ige und 42 %ige Ähnlichkeit), ein Isolat (N99-25IIB) als *Pseudomonas nitroreducens* (62 %ige Ähnlichkeit) und ein Isolat (A00-124ID) als *Pseudomonas asplenii* (77 %) identifiziert. Für ein Isolat der ARDRA-

Gruppe 19 konnte keine eindeutige Übereinstimmung mit den Datenbanken des Microlog-Systems erreicht werden. In der ARDRA-Gruppe 21 wurde das Isolat J01-05FWN als *Pseudomonas fluorescens* Biotyp C (Ähnlichkeit von 67 %) identifiziert. In der ARDRA-Gruppe 22 wurden neben drei nicht eindeutig identifizierbaren Isolaten (N99-52VIID, N99-63VC und A00-91IB) die untersuchten denitrifizierenden Bakterien als *Pseudomonas fluorescens* Biotyp C (A00-114IIIB; 69 %ige Ähnlichkeit), *Pseudomonas aeruginosa* (A00-155VB; 81 %ige Ähnlichkeit) und *Shewanella putrefaciens* (A00-142VB, 69 %ige Ähnlichkeit) identifiziert. Mit den physiologischen Testplatten für Gram positive Bakterien (GP2) konnten keines der Isolate eindeutig identifiziert werden.

4.7.2 Produktion von Fluorescein durch die isolierten denitrifizierenden Bakterien

Einige Pseudomonaden sind in der Lage, Fluorescein zu produzieren (PALLERONI 1992). Beim Wachstum auf KingB-Agar kann diese Fluoreszenz unter UV-Licht beobachtet werden. Aus jeder ARDRA-Gruppe wurde mindestens ein Stamm für den Test auf Fluoreszenz eingesetzt. Insgesamt wurden 47 der 95 Isolate mit Hilfe dieses KingB-Agar-Testes unter UV-Licht auf Fluoreszenz untersucht. Bei insgesamt 16 der untersuchten Isolate konnte damit indirekt eine Produktion von Fluorescein nachgewiesen werden (Tab. 16).

Die Isolate A00-100ID und A00-101ID (ARDRA-Gruppe 5) der **Großgruppe A** zeigten positive Ergebnisse beim Test auf Fluoreszenz, während alle anderen untersuchten Isolate der Großgruppe A im Test nicht fluoreszierten.

Aus **Großgruppe B** konnte nur beim Isolat M00-29VA (ARDRA-Gruppe 7) eine Fluoreszenz beim Wachstum auf KingB-Agar detektiert werden.

Vier Isolate der ARDRA-Gruppen 12 (N01-3IIIA, M00-4IIIA, M00-10IB und M00-14IIIA), drei Isolate der ARDRA-Gruppe 19 (N99-3IC, N99-3IC und M00-15IIIA), ein Isolat der ARDRA-Gruppe 21 (J01-5FWN) und fünf Isolate der ARDRA-Gruppe 22 (N99-52VIID, N99-63VC, A00-91IB, A00-114IIIB und A00-155VB) aus der **Großgruppe C** wurden positiv auf Fluoreszenz getestet.

Tab. 16: Tabellarische Darstellung der Testergebnisse bezüglich der Fluoresceinproduktion bei isolierten denitrifizierenden Bakterien während des Wachstums auf KingB-Agar, geordnet nach Großgruppen- und ARDRA-Gruppen-Zugehörigkeit. + = Fluoreszenz unter UV-Licht; - = keine Fluoreszenz unter UV-Licht.

Großgruppe	ARDRA-Gruppe	Isolat-ID	Fluoreszenz unter UV-Licht auf KingB-Agar
A	1	M00-25FWV	-
	5	A00-100ID	+
	5	A00-101ID	+
	20	N01-14IIIA	-
	24	S99-57FWV	-
B	2	N01-7KA	-
	3	M00-13FWN	-
	3	M00-44FWN	-
	3	M00-54KA	-
	3	M00-71KA	-
	4	S00-X7VA	-
	6	M00-2KA	-
	7	M00-29VA	+
	8	M00-4KA	-
	14	S00-X3VC	-
	15	S00-X1FWN	-
	18	N99-61VC	-
	23	N01-2FWN	-
C	9	N01-5IC	-
	9	N01-6ID	-
	9	A00-198IIID	-
	11	N01-4IIIB	-
	11	N01-8VIIB	-
	12	N01-3IIIA	+
	12	M00-4IIIA	+
	12	M00-10IB	+
	12	M00-14IIIA	+
	16	N01-10KA	-
	16	M00-76VIID	-
	16	M00-77VIID	-
	17	M00-66FWV	-
	17	M00-85FWV	-
	19	N99-3IC	+
	19	S00-X4VB	-
	19	S00-X5VB	-
	19	M00-15IIIA	+
	19	N99-25IIIB	-
	19	N99-35KA	-
	19	N99-89IIID	+
	19	A00-124ID	-
	21	J01-5FWN	+
22	N99-52VIID	+	
22	N99-63VC	+	
22	A00-91IB	+	
22	A00-114IIIB	+	
22	A00-142VB	-	
22	A00-155VB	+	

4.7.3 Wachstumshemmung bei Referenzbakterien verursacht durch fluoreszierende Pseudomonaden

Von vielen fluoreszierenden Pseudomonaden ist seit längerem bekannt, daß sie Sekundärmetabolite produzieren und sezernieren können, die sich auf andere Bakterien wachstumshemmend auswirken (vgl. z.B. LEISINGER & MARGRAFF 1979, KEEL et al. 1996). In Kooperation mit Dr. Suresh Babu Selvaraju (Department of Environmental Health, University of Cincinnati, USA) wurde überprüft, ob die isolierten denitrifizierenden Bakterienstämme in der Lage sind, das Wachstum von ausgewählten Referenzbakterien zu hemmen (Abb. 25). Bei dieser Versuchsreihe wurden nur diejenigen Isolate eingesetzt, die positiv auf Fluoreszenz bei Wachstum auf KingB-Agar getestet wurden (vgl. Tab. 16).

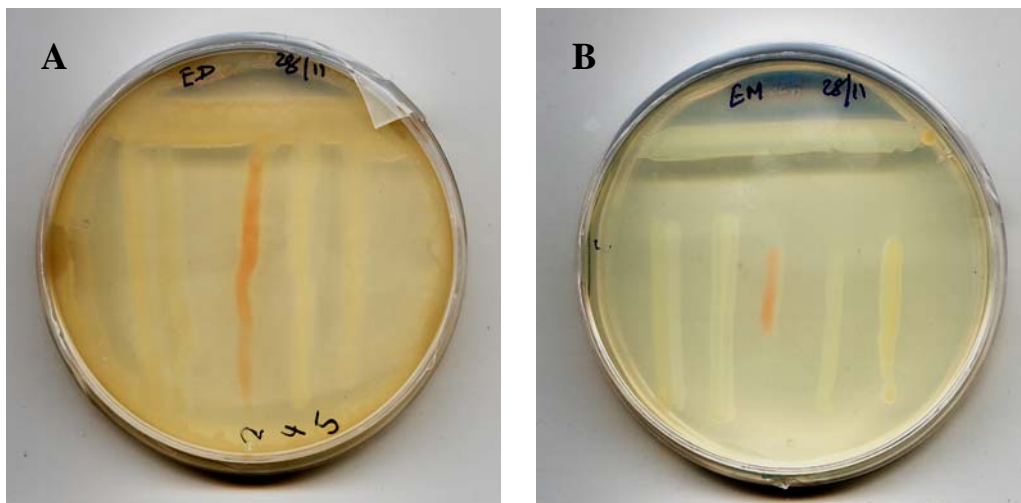


Abb. 25: Photographische Darstellung des Wachstums von fünf Referenzstämmen (senkrechte Strichkolonien, von links nach rechts: *Agrobacterium tumefaciens* 30150 DSM, *Azospirillum* spec., *Escherichia coli* K12, *Rhizobium tropici* CIAT 899 und *Rhizobium etli* Cli 80) in Gegenwart eines fluoreszierenden Pseudomonaden (waagerechte Strichkolonie) auf LB-Medium. Die Inkubationszeit betrug 24 Stunden bei 28 °C. A = Keine Ausbildung von Hemmhöfen durch das Isolat N99-25IIIB; B = Ausbildung von Hemmhöfen durch das Isolat M00-15IIIA.

Bis auf ein Isolat hemmten alle untersuchten fluoreszierenden *Pseudomonas* Stämme das Wachstum von mindestens einem Referenzstamm, wobei *Escherichia coli* von keinem Stamm im Wachstum beeinträchtigt wurde (Tab. 17).

Tab. 17: Tabellarische Darstellung des Testes einer (hemmenden) Wirkung von fluoreszierenden *Pseudomonas* auf das Wachstum der fünf Referenzstämme *Agrobacterium tumefaciens* 30150 DSM, *Azospirillum spec.*, *Escherichia coli* K12, *Rhizobium tropici* CIAT 899 und *Rhizobium etli* Cli 80. + = Ausbildung von Hemmhöfen, - = keine Ausbildung von Hemmhöfen.

Räumliche und phylogenetische Einordnung	Isolat-ID	Referenzbakterien				
		<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	<i>Azospirillum spec.</i>	<i>E. coli</i>	<i>Rhizobium tropici</i>	<i>Rhizobium etli</i>
Großgruppe A						
ARDRA-Gruppe 5	A00-100ID	-	+	-	+	+
	A00-101ID	-	+	-	+	+
Großgruppe B						
ARDRA-Gruppe 7	M00-29VIIC	+	+	-	-	-
Großgruppe C						
ARDRA-Gruppe 12	M00-3IIIA	+	-	-	+	+
	M00-4IIIA	+	-	-	+	+
	M00-10IB	-	-	-	-	-
	M00-14IIIA	+	+	-	-	+
ARDRA-Gruppe 19	N01-5IC	+	+	-	+	-
	M00-15IIIA	+	+	-	+	+
ARDRA-Gruppe 21	J01-5FWN	+	+	-	+	+
ARDRA-Gruppe 22	N99-52VIID	-	-	-	+	+
	N99-63VC	-	-	-	+	+
	A00-91IB	-	-	-	+	+
	A00-114IIIB	+	-	-	+	+
	A00-155VB	-	-	-	+	+
Großgruppe C						
ARDRA-Gruppe 19	N99-25IIIB*	-	-	-	-	-
Kontrollstämme						
	<i>Ps. fl.</i> W24	-	-	-	-	+
	<i>Ps. fl.</i> W34	-	-	-	-	+

* Dieser nicht fluoreszierende *Pseudomonas* Stamm wurde als Vergleichsstamm ohne hemmende Wirkung auf die Referenzbakterien mit in die Untersuchung einbezogen.

Die beiden fluoreszierenden *Pseudomonas* Stämme A00-100ID und A00-101ID der ARDRA-Gruppe 5 (**Großgruppe A**) unterschieden sich bezüglich ihrer Hemmwirkung auf die Referenzbakterien von allen anderen getesteten *Pseudomonas*. Sie wirkten sich hemmend auf das Wachstum von *Azospirillum*, *Rhizobium tropici* und *Rhizobium etli* aus.

Der fluoreszierende *Pseudomonas* M00-29VIIC der ARDRA-Gruppe 7 (**Großgruppe B**) hemmte das Wachstum der Referenzbakterien *Agrobacterium* und *Azospirillum* und wies damit eine charakteristische Hemmwirkung im Vergleich zu anderen getesteten fluoreszierenden *Pseudomonas* auf.

In der ARDRA-Gruppe 12 (**Großgruppe C**) zeigten die fluoreszierenden *Pseudomonas* Stämme eine uneinheitliche Hemmwirkung auf das Wachstum der Referenzbakterien: Der fluoreszierende

Pseudomonade M00-14IIIA inhibierte das Wachstum von *Agrobacterium*, *Azospirillum* und *Rhizobium etli*, während bei den Isolaten M00-3IIIA und M00-4IIIA zusätzlich noch *Rhizobium tropici* gehemmt wurde. Unter den untersuchten fluoreszierenden Pseudomonas Stämmen konnte lediglich beim Isolat M00-10IB keine Hemmung des Wachstums der Referenzbakterien nachgewiesen werden. Die fluoreszierenden *Pseudomonas* Stämme M00-15IIIA der ARDRA-Gruppe 19 und J01-5FWN der ARDRA-Gruppe 21 wiesen eine ähnliche Hemmwirkung auf *Agrobacter*, *Azospirillum*, *Rhizobium tropici* und *Rhizobium etli* auf, wobei *Rhizobium etli* durch das Isolat N01-5IC nicht gehemmt wurde. Auch die fluoreszierenden *Pseudomonas* Stämme der ARDRA-Gruppe 22 (N99-52VIID, N99-63VC, A00-91IB, A00-144IIIB und A00-155VB) wiesen mit einer Hemmung des Wachstums der Referenzbakterien *Rhizobium tropici* und *Rhizobium etli* eine ähnliche Hemmwirkung auf, wobei das Isolat A00-114IIIB darüber hinaus auch das Wachstum von *Agrobacterium* hemmte.

Der nicht fluoreszierende *Pseudomonas* Stamm N99-25IIIB (ARDRA-Gruppe 19) bewirkte bei keinem der Referenzbakterien eine Wachstumshemmung. Die Kontrollstämme *Pseudomonas fluorescens* Wildtyp 24 und 34 hemmten nur das Wachstum von *Rhizobium etli* (Tab. 17).

4.8 Weiterführende molekulargenetische Charakterisierung und Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien

4.8.1 Sequenzierung der 16S rDNA

Die Sequenzanalyse der 16S rDNA wird aufgrund des konservativen Charakters der 16S rDNA für taxonomische und phylogenetische Untersuchungen verwendet (STAHL et al. 1988, AMANN et al. 1995). Allgemein gilt eine Übereinstimmung von 90 – 97 % der kompletten 16S rDNA als typisch für die Arten einer Gattung, ab 98 % Ähnlichkeit kann eine Identifizierung der Art angenommen werden (LUDWIG & SCHLEIFER 1994). Im Gegensatz dazu vermerken STACKEBRANDT & GOEBEL (1994) für die Identifizierung einer Art eine Sequenzähnlichkeit von > 97 % und für die Identifizierung einer Gattung eine Sequenzähnlichkeit von > 93 %. In dieser Untersuchung wurde den Angaben von LUDWIG & SCHLEIFER (1994) gefolgt, und die Artbestimmung ab einer 98 %igen Sequenzähnlichkeit festgelegt. Aus jeder ARDRA-Gruppe wurde die 16S rDNA mindestens eines Stammes sequenziert.

In der **Großgruppe A** - mit denitrifizierenden Isolaten, die ausschließlich aus Wasserproben von Entnahmestellen flußaufwärts des Kläranlagenablaufes stammten - konnte mit Hilfe der Sequenzanalyse der 16S rDNA Region das Isolat M00-25FWV der ARDRA-Gruppe 1 nicht eindeutig identifiziert werden, es konnte aber eine Ähnlichkeit bezüglich der 16S rDNA mit der Gattung *Serratia* ermittelt werden (90 % Übereinstimmung; Tab. 18). Für die 16S rDNA der Isolate A00-100ID und A00-101ID der ARDRA-Gruppe 5 wurde eine Ähnlichkeit von 97 % mit der von *Pseudomonas fluorescens* festgestellt. Die 16S rDNA des Isolates S99-57FWV der ARDRA-Gruppe 24 wies eine hohe Ähnlichkeit (98 % Übereinstimmung) mit der entsprechenden DNA-Region von *Ochrobactrum anthropi* auf.

Auch in der **Großgruppe B** - mit denitrifizierenden Isolaten aus Wasserproben von Entnahmestellen flußabwärts des Kläranlagenablaufes oder aus dem Klärwasser - wurde bei dem untersuchten Isolat N01-2FWN (ARDRA-Gruppe 23) keine eindeutige Identifizierung erreicht. Als *Comamonadaceae* konnten in dieser Großgruppe die Isolate M00-13FWN und M00-54KA (ARDRA-Gruppe 3), S00-X7VC (ARDRA-Gruppe 4), S00-X3VC (ARDRA-Gruppe 14) und S00-X2FWN (ARDRA-Gruppe 15) identifiziert werden, wobei die 16S rDNA von Isolat M00-13FWN eine hohe Ähnlichkeit (98 % Übereinstimmung) zu *Comamonas denitrificans* aufwies. Die 16S rDNA der Isolate M00-54KA, S00-X7VC und S00-X3VC wies eine 97 %ige Ähnlichkeit mit der von *Delftia acidovorans* auf. Bei dem Isolat S00-X2FWN konnte zwar die Zugehörigkeit zur Familie der *Comamonadaceae* verifiziert werden (95 – 96 % Übereinstimmung), aber eine eindeutige Zuordnung zu einer bestimmten Art war nicht möglich. Neben den *Comamonadaceae* konnten in dieser Großgruppe noch *Alcaligenes spec.* (97 % Übereinstimmung), *Alcaligenes*

faecalis (99 % Übereinstimmung mit M00-2KA, ARDRA-Gruppe 6), *Pseudomonas fluorescens* (97 % Übereinstimmung mit M00-29VIIC, ARDRA-Gruppe 7), eine *Acinetobacter* Spezies (97 % Übereinstimmung mit M00-4KA, ARDRA-Gruppe 8) und *Bacillus cereus* (99 % Übereinstimmung mit N99-61VC, ARDRA-Gruppe 18) identifiziert werden.

Die aus Wasserproben der Entnahmestellen flußaufwärts wie auch flußabwärts des Kläranlagenablaufes und/oder aus dem Klärwasser isolierten denitrifizierenden Bakterien der **Großgruppe C** konnten überwiegend als fluoreszierende Pseudomonaden identifiziert werden. Die 16S rDNA von drei Isolaten der ARDRA-Gruppe 12 (N01-3IIIA, M00-4IIIA und M00-14IIIA), drei Isolaten der ARDRA-Gruppe 19 (N99-3IC, M00-15IIIA und N99-89IIID) und einem Isolat der ARDRA-Gruppe 21 (J01-25IIIB) wiesen eine hohe Ähnlichkeit (97 - 98 % Übereinstimmung) mit der von *Pseudomonas fluorescens* auf. Fünf der untersuchten Isolate der ARDRA-Gruppe 22 (N99-52VIID, N99-63VC, A00-91IB, A00-114IIIB und A00-155VB) konnten als *Pseudomonas aeruginosa* (97 - 99 % Übereinstimmung) identifiziert werden. Drei Isolate der ARDRA-Gruppe 19 (S00-X5VB, N99-25IIIB und N99-35KA) und zwei Isolate der ARDRA-Gruppe 9 (N01-5IC und M00-198IIID) wurden als Pseudomonaden identifiziert. Als *Stenotrophomonas maltophilia* (Übereinstimmung 98 – 99 %) wurden zwei Isolate der ARDRA-Gruppe 9 (J01-6IIIA und N01-16IIIC) identifiziert. In der ARDRA-Gruppe 16 wies die 16S rDNA Region des Isolates M00-76VIID eine Ähnlichkeit von 97 % Übereinstimmung zu der einer *Escherichia* Spezies auf. Alle untersuchten Isolate der ARDRA-Gruppe 17 (M00-66FWV, M00-85FWV und N01-1IIIA) wurden als *Bacillus cereus* identifiziert (95 % Übereinstimmung). Keine eindeutige Identifizierung war beim Isolat N01-4IIIB der ARDRA-Gruppe 11 möglich.

Tab. 18: Tabellarische Darstellung der Ergebnisse der Sequenzanalyse der 16S rDNA-Region der isolierten denitrifizierenden Bakterien gruppiert nach Groß- und ARDRA-Gruppen. Hinter den identifizierten Stämmen ist in Klammern die Ähnlichkeit der 16S rDNA mit denen in den verwendeten Datenbanken (vgl. Kapitel 3.14.3) in Prozent angegeben. Bei einigen Isolaten war eine eindeutige Identifizierung der untersuchten Bakterien mittels der Sequenzanalyse nicht möglich (n b).

Großgruppe	ARDRA-Gruppe	Isolat-ID	Sequenzerggebnisse (Ähnlichkeit in %)	Proteobacteria-Gruppe
A	1	M00-25FWV	<i>Serratia</i> spec. (90 %)	γ-Proteobakterium
	5	A00-100ID	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (97 %)	γ-Proteobakterium
	5	A00-101ID	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (97 %)	γ-Proteobakterium
	20	N01-14IIIA	n b	
	24	S99-57FWV	<i>Ochrobactrum anthropi</i> (98 %)	α-Proteobakterium
B	2	N01-7KA	<i>Alcaligenes</i> spec. (97%)	β-Proteobakterium
	3	M00-13FWN	<i>Comamonas denitrificans</i> (98 %)	β-Proteobakterium
	3	M00-54KA	<i>Comamonadaceae</i> (97 %)	β-Proteobakterium
	4	S00-X7VC	<i>Comamonadaceae</i> . (97 %)	β-Proteobakterium
	6	M00-2KA	<i>Alcaligenes faecalis</i> (99 %)	β-Proteobakterium
	7	M00-29VIIC	<i>Pseudomonas (fluorescens)</i> (97 %)	γ-Proteobakterium
	8	M00-4KA	<i>Acinetobacter</i> spec. (97%)	γ-Proteobakterium
	14	S00-X3VC	<i>Comamonadaceae</i> (97%)	β-Proteobakterium

Großgruppe	ARDRA-Gruppe	Isolat-ID	Sequenzerggebnisse (Ähnlichkeit in %)	Proteobacteria-Gruppe
B	15	S00-X2FWN	<i>Comamonadaceae</i> (95 – 96 %)	β-Proteobakterium
	18	N99-61VC	<i>Bacillus cereus</i> (99 %)	Gram positiv
	23	N01-2FWN	n b	
C	9	N01-5IC	<i>Pseudomonas spec.</i> (95 – 97 %)	γ-Proteobakterium
	9	A00-198IIID	<i>Pseudomonas spec.</i> (95 - 97 %)	γ-Proteobakterium
	9	J01-6IIIA	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (99 %)	γ-Proteobakterium
	9	N01-16IIIC	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i> (98 %)	γ-Proteobakterium
	11	N01-4IIIB	n b	
	12	M00-4IIIA	<i>Pseudomonas (fluorescens)</i> (97%)	γ-Proteobakterium
	12	M00-10IB	<i>Pseudomonas (fluorescens)</i> (97 %)	γ-Proteobakterium
	12	M00-14IIIA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (98 %)	γ-Proteobakterium
	16	M00-76VIID	<i>Escherichia spec.</i> (97 %)	γ-Proteobakterium
	17	M00-66FWV	<i>Bacillus cereus</i> (98 %)	Gram positiv
	17	M00-85FWV	<i>Bacillus cereus</i> (98 %)	Gram positiv
	17	N01-1IIIA	<i>Bacillus cereus</i> (98 %)	Gram positiv
	19	N99-3IC	<i>Pseudomonas (fluorescens)</i> (97 %)	γ-Proteobakterium
	19	S00-X5VB	<i>Pseudomonas spec.</i> (95 – 97 %)	γ-Proteobakterium
	19	M00-15IIIA	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (98 %)	γ-Proteobakterium
	19	N99-25IIIB	<i>Pseudomonas spec.</i> (95 – 97 %)	γ-Proteobakterium
	19	N99-35KA	<i>Pseudomonas spec.</i> (95 – 97 %)	γ-Proteobakterium
	19	N99-89IIID	<i>Pseudomonas fluorescens</i> (98 %)	γ-Proteobakterium
	21	J01-5FWN	<i>Pseudomonas (fluorescens)</i> (97 %)	γ-Proteobakterium
	22	N99-52VIID	<i>Pseudomonas (aeruginosa)</i> (97 %)	γ-Proteobakterium
	22	N99-63VC	<i>Pseudomonas (aeruginosa)</i> (97 %)	γ-Proteobakterium
	22	A00-91IB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (99 %)	γ-Proteobakterium
22	A00-114IIIB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (98 %)	γ-Proteobakterium	
22	A00-155VB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (98 %)	γ-Proteobakterium	

4.8.2 Nachweis von *hsdA*, ein für den Steroidabbau essentielles Gen von *Comamonas testosteroni*

Steroide in Kläranlagen und in den als Vorfluter von Kläranlagen genutzten Fließgewässern rücken zunehmend in den Vordergrund des wissenschaftlichen Interesses (z.B. SPRENGLER 2001).

Um der Frage nachzugehen, warum denitrifizierende Stämme der Familie *Comamonadaceae* ausschließlich aus Klärwasser sowie aus Interstitial- und Oberflächenwasserproben flußabwärts des Kläranlagenablaufes isoliert werden konnten, wurden diese Isolate auf das Vorkommen von *hsdA* im Genom getestet. Für den Steroidabbau von *Comamonas testosteroni* ist *hsdA* ein essentielles Gen (MASER et al. 2001). Die Fähigkeit von Bakterien, Steroide abzubauen, kann zu einem Wachstumsvorteil gegenüber anderen Bakterien führen und damit ein Faktor für ein restriktives Vorkommen von bestimmten Bakterien sein.

Mit Hilfe eines Primerpaares - zur Verfügung gestellt von Dr. Xiong - sollte ein Teilfragment von ca. 460 bp aus *hsdA* amplifiziert werden, um festzustellen, ob die isolierten *Comamonadaceae*

diese Genregion im Genom tragen (XIONG & MASER 2001). Aus dem Genom der Positivkontrolle *Comamonas testosteroni* wurde das entsprechende Fragment von *hsdA* amplifiziert (Abb. 26). Bei keinem der als *Comamonadaceae* identifizierten Isolate wurde diese Genregion detektiert.

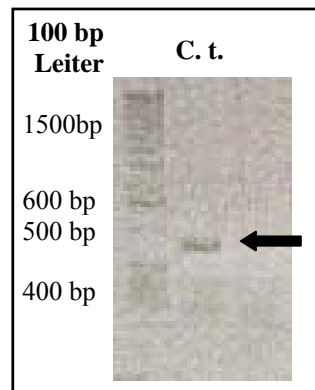


Abb. 26: Photographische Darstellung der gelelektrophoretischen Auftrennung des Amplifizierungsproduktes des *hsdA*-Gens aus der Gesamt-DNA von *Comamonas testosteroni* (*C. t.*) Der Pfeil markiert das amplifizierte ca. 460 bp lange Fragment des *hsdA*-Gens.

4.9 Gesamtergebnis der physiologischen und molekulargenetischen Identifizierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien

Durch die Kombination aller erhobenen Daten zur Identifizierung der denitrifizierenden Isolate (vgl. Kapitel 3.15) ergibt sich ein klares Bild über die kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien der Lahn (Tab. 19).

Großgruppe A:

In der ARDRA-Gruppe 1 wurde mittels Sequenzierung der 16S rDNA eine Identifizierung der Gattung *Serratia* erreicht. Das Verwertungsmuster der unterschiedlichen Kohlenhydrate des MicroLog-Systems weist auf die Art *Serratia ficaria* hin, erreichte jedoch keine eindeutige Identifizierung (Ähnlichkeit < 50 %), so daß dieses Isolat nur als *Serratia spec.* identifiziert wird. Die ARDRA-Gruppe 5 wird von Pseudomonaden gebildet: Die Identifizierung der beiden Isolate der ARDRA-Gruppe 5 als *Pseudomonas fluorescens* war zwar mit 97 % Ähnlichkeit der 16S rDNA nicht eindeutig, konnte aber mit Hilfe des MicroLog-Systems sowie der Tests auf Fluoresceinproduktion und Wachstumshemmung von Referenzbakterien bestätigt werden. In der ARDRA-Gruppe 20 konnte mit Hilfe des MicroLog-System eine klare Identifizierung von *Klebsiella pneumoniae* erfolgen. Die Identifizierung von *Ochrobactrum anthropi* wurde eindeutig durch die Sequenzanalyse bestätigt, wogegen das MicroLog-System keine zusätzliche Aussage lieferte.

Großgruppe B:

Die Sequenzanalyse der 16S rDNA des Isolates N01-7KA der ARDRA-Gruppe 2 ergab eine Zugehörigkeit zu der Gattung *Alcaligenes*. Die Isolate der ARDRA-Gruppen 3, 4, 14 und 15 wurden überwiegend durch die Sequenzanalyse als *Comamonadaceae* eingeordnet, wobei das Isolat M00-13FWN eindeutig als *Comamonas denitrificans* identifiziert werden konnte. Dieses Isolat wurde vom MicroLog-System als *Comamonas terrigena* und das Isolat M00-54KA als *Delftia acidovorans* identifiziert. Bei den als *Alcaligenes faecalis* (ARDRA-Gruppe 6) und *Pseudomonas fluorescens* (ARDRA-Gruppe 7) identifizierten Isolaten stimmten die Ergebnisse von Sequenzanalyse und MicroLog-System überein. Bei dem Isolat M00-4KA der ARDRA-Gruppe 8 dagegen handelte es sich laut 16S rDNA Sequenzanalyse um eine *Acinetobacter* Spezies, laut MicroLog-System allerdings um *Pseudomonas pseudoalcaligenes*.

Als *Bacillus cereus* konnte das Isolat N99-61VC der ARDRA-Gruppe 18 durch die Sequenzanalyse eindeutig identifiziert werden. In der ARDRA-Gruppe 23 wurde das Isolat N01-2FWN als *Klebsiella pneumoniae* durch das MicroLog-System identifiziert.

Großgruppe C:

Die ARDRA-Gruppe 9 erwies sich als heterogenes Cluster mit unterschiedlichen Bakteriengattungen. Die beiden Isolate N01-05IC und A00-198IIID wurden der Gattung *Pseudomonas* zugeordnet und zeigten keine Fluoreszenz im KingB-Agar Test. Die beiden Isolate J01-6IIIA und N01-16IIIC konnten als *Stenotrophomonas maltophilia* Stämme identifiziert werden. Bei dem Isolat N01-4IIIB der ARDRA-Gruppe 11 wurde mittels des MicroLog-Systems eine Gattungsbestimmung als *Aeromonas* Spezies durchgeführt. Die untersuchten denitrifizierenden Isolate der ARDRA-Gruppe 12 und 21 und drei Isolate der ARDRA-Gruppe 19 (N99-3IC, M00-15IIIA und N99-89IIID) wurden übereinstimmend als *Pseudomonas fluorescens* identifiziert. In der ARDRA-Gruppe 22 wurden durch die Sequenzanalyse, mit Hilfe des MicroLog-Systems sowie der Tests auf Fluoresceinproduktion und Wachstumshemmung von Referenzbakterien vier ebenfalls fluoreszierende Pseudomonaden als *Pseudomonas aeruginosa* (N99-52VIID, N99-63VC, M00-91IB und A00-155VB) bestimmt. In dieser ARDRA-Gruppe wurde darüberhinaus durch das MicroLog-System *Shewanella putrefaciens* (A00-142VB) identifiziert. In der ARDRA-Gruppe 16 wurde das Isolat M00-76VIID durch Sequenzanalyse als *Escherichia coli* identifiziert, bei dem Isolat N01-10KA handelt es sich laut Microlog-System um eine *Enterobacter* Spezies. Alle untersuchten Isolate der ARDRA-Gruppe 17 wurden als *Bacillus cereus* Stämme identifiziert. Neben den fluoreszierenden Pseudomonaden wurden in der ARDRA-Gruppe 19 die Pseudomonaden, die nicht fluoreszierten, mittels der Sequenzanalyse als *Pseudomonas* Spezies und durch das Microlog-System als *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas apleonii* und eine weitere nicht näher definierbare *Pseudomonas* Spezies bestimmt.

Tab. 19: Tabellarische Darstellung des Gesamtergebnisses, daß sich aus der Kombination von molekulargenetischer (Sequenzanalyse der 16S rDNA, Nitritreduktase-Test) und physiologischer Identifizierungen (MicroLog-System, KingB-Agar-Test) für die isolierten denitrifizierenden Bakterien ergibt.

Großgruppe	ARDRA-		Identifizierungsergebnisse (MicroLog, 16S rDNA)	Typ der		
	Gruppe	Isolat-ID		Nitritreduktase	KingB	
A	1	M00-25FWV	<i>Serratia spec.</i>	NirK	-	
	5	A00-100ID	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
	5	A00-101ID	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
	20	N01-14IIIA	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NirS	-	
	24	S99-57FWV	<i>Ochrobactrum anthropi</i>	NirK	-	
B	2	N01-7KA	<i>Alcaligenes spec.</i>	NirK	-	
	3	M00-13FWN	<i>Comamonas denitrificans</i>	NirS	-	
	3	M00-54KA	<i>Comamonadaceae</i>	NirS	-	
	4	S00-X7VC	<i>Comamonadaceae</i>	NirS	-	
	6	M00-2KA	<i>Alcaligenes faecalis</i>	NirK	-	
	7	M00-29VIIC	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
	8	M00-4KA	<i>Acinetobacter spec.</i>	NirS	-	
	14	S00-X3VC	<i>Comamonadaceae</i>	NirS	-	
	15	S00-X2FWN	<i>Comamonas spec.</i>	NirS	-	
	18	N99-61VC	<i>Bacillus cereus</i>	NirS	-	
	23	N01-2FWN	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	NirS	-	
	C	9	N01-5IC	<i>Pseudomonas spec.</i>	NirS	-
		9	A00-198IID	<i>Pseudomonas spec.</i>	NirS	-
9		J01-6IIIA	<i>Stenotrophosomonas maltophilia</i>	n d	-	
9		N01-16IIIC	<i>Stenotrophosomonas maltophilia</i>	n d	-	
11		N01-4IIIB	<i>Aeromonas spec.</i>	-	-	
12		M00-4IIIA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
12		M00-10IB	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
12		M00-14IIIA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
16		N01-10KA	<i>Enterobacter spec.</i>	-	-	
16		M00-76VIID	<i>Escherichia coli</i>	-	-	
17		M00-66FWV	<i>Bacillus cereus</i>	NirS	-	
17		M00-85FWV	<i>Bacillus cereus</i>	NirS	-	
17		N01-1IIIA	<i>Bacillus cereus</i>	NirS	-	
19		N99-3IC	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
19		S00-X5VB	<i>Pseudomonas spec.</i>	NirS	-	
19		M00-15IIIA	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
19		N99-25IIIB	<i>Pseudomonas spec. (nitroreducens/azelaica)</i>	NirK	-	
19		N99-35KA	<i>Pseudomonas spec.</i>	NirK	-	
19		N99-89IIID	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
19		A00-124ID	<i>Pseudomonas spec. (asplenii)</i>	NirS	-	
21		J01-5FWN	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	NirS	+	
22		N99-52VIID	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (97%)	NirS	+	
22		N99-63VC	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (97 %)	NirS	+	
22		A00-91IB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (99 %)	NirS	+	
22		A00-95VA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (99 %)	NirS	n d	
22		A00-114IIIB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (98 %)	NirS	+	
22		A00-142VB	<i>Shewanella putrefaciens</i>	-	-	
22		A00-155VB	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (98 %)	NirS	+	

Basierend auf der Identifizierung der exemplarisch untersuchten denitrifizierenden Stämme können sämtliche Isolate der jeweiligen ARDRA-Gruppe phylogenetisch zugeordnet werden (Abb. 27). Diese Ergebnisse dienen im Folgenden der räumlichen Einordnung der Isolate.

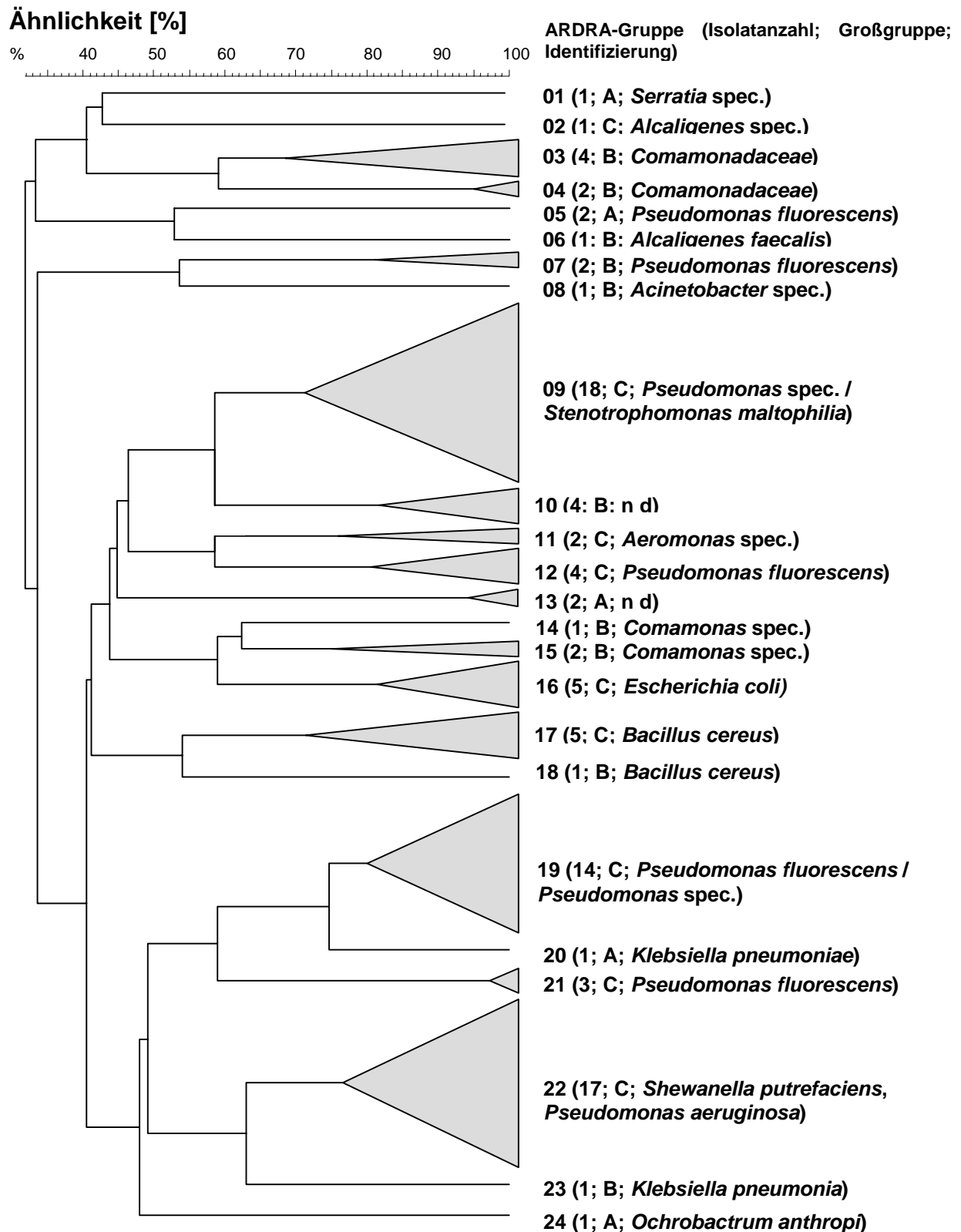


Abb. 27: Graphische Darstellung der kondensierten Dice/UPGMA Clusteranalyse der ARDRA-Restriktionsfragmentlängen der 95 denitrifizierenden Isolate. Die Nummern bezeichnen die ARDRA-Gruppen. Die Zahlen in den Klammern geben die Anzahl der Isolate in dieser ARDRA-Gruppe, die Buchstaben die Großgruppe und die Bakteriennamen das Ergebnis der physiologischen und molekulargenetischen Identifizierung an.

4.10 Verbreitung der identifizierten denitrifizierenden Bakterien im Längsprofil der Untersuchungsstrecke

Das Gesamtergebnis der physiologischen und molekulargenetischen Charakterisierung und Identifizierung weist für die verschiedenen Bakteriengattungen folgende räumliche Verbreitung im Längsprofil der Untersuchungsstrecke auf (Tab. 20):

Tab. 20: Tabellarische Darstellung der Anzahl der denitrifizierenden Bakterienstämme pro Probenahmestelle und Gattung. Gruppirt in Abhängigkeit von der Lage der Probenahmestelle: Flußaufwärts des Kläranlagenablaufes (KA) gelegene Probestellen mit der fließenden Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes (FW V) und den Transekten I und III. Flußabwärts des Kläranlagenablaufes (KA) gelegene Probestellen mit der fließende Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes (FW N) und den Transekten V und VII.

	Probenahmestellen flußaufwärts des Kläranlagenablaufes			KA	Probenahmestellen flußabwärts des Kläranlagenablaufes			Summe
	FW V	Transekt I	Transekt III		Transekt V	Transekt VII	FW N	
<i>Serratia</i>	1							1
<i>Ochrobactrum</i>	1							1
<i>Acinetobacter</i>				1				1
<i>Alcaligenes</i>				2				2
<i>Escherichia</i>						2		2
<i>Comamonadaceae</i>				2	2	1	4	9
<i>Shewanella</i>			1		1			2
<i>Aeromonas</i>			1			1		2
<i>Klebsiella</i>			1				1	2
<i>Enterobacter</i>			1	1		1		3
<i>Stenotrophomonas</i>		2	3			1		6
<i>Bacillus</i>	2		1	1	2			6
<i>Pseudomonas</i>								
- spec		5	1	1	8	1		16
- aeruginosa		1	8		5	1		15
- fluorescens	2	5	5	3	3	2	1	21
Nicht identifiziert		2				4		6

Serratia und *Ochrobactrum* wurden nur in der fließenden Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes detektiert und konnten jeweils nur einmalig nachgewiesen werden.

Bakterien der Gattungen *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Escherichia coli* und die *Comamonadaceae* konnten nur flußabwärts des Kläranlagenablaufes im Interstitial detektiert werden, wobei *Acinetobacter* und *Alcaligenes* nur aus dem Klärwasser und *Escherichia coli* nur aus Interstitialwasserproben des Transektes VII isoliert werden konnten. Demgegenüber sind die *Comamonadaceae* sowohl im Klärwasser als auch in den Interstitialwasserproben nachgewiesen worden. Neben den dominierend isolierten Pseudomonaden (insgesamt 51 Isolate) konnten 9 Stämme der Familie der *Comamonadaceae* isoliert werden. Innerhalb der Pseudomonaden waren die häufigsten Arten *Pseudomonas aeruginosa* (15 Isolate) und dominierend *Pseudomonas fluorescens* (21 Isolate), wobei letzterer in allen untersuchten Habitaten (Klärwasser, Oberflächenwasser, Interstitialwasser) detektiert wurde. Auffällig war, daß *Pseudomonas aeruginosa* nicht aus Klär- und Oberflächenwasser isoliert werden konnte, sondern ausschließlich

in Interstitialwasserproben festgestellt wurde. Gleiches gilt für die sechs Isolate der Gattung *Stenotrophomonas* und die Bakterienstämme der Gattungen *Shewanella* (2 Isolate), *Aeromonas* (2 Isolate) und *Klebsiella* (2 Isolate). Die Stämme der Gattungen *Bacillus* (6 Isolate) und *Enterobacter* (3 Isolate) konnten im Klärwasser und in den Transekten flußaufwärts und -abwärts des Kläranlagenablaufes detektiert werden.

4.11 Einfluß der veränderten Stickstoffkonzentrationen im Klärwasser auf die Verbreitung der identifizierten denitrifizierenden Bakterien

Bis März 2000 wurde die Lahn durch hohe Ammoniumkonzentrationen im Klärwasser belastet (vgl. Kapitel 4.1.1). Im Zuge der Inbetriebnahme der Nitrifikationsstufe wurden von März bis Dezember 2000 erhöhte Nitrat- und sinkende Ammoniumkonzentrationen im Klärwasser gemessen. Die Nitratkonzentration sank mit Inbetriebnahme der Denitrifikationsstufe im Dezember 2000 deutlich ab. Um den Einfluß der veränderten Stickstoffzusammensetzung des Klärwassers zu untersuchen, wurden nur Isolate der Großgruppe B betrachtet, da nur die Stämme der Großgruppe B ausschließlich aus Wasserproben von vom Klärwasser beeinflussten Probenahmestellen stammen.

Tab. 21: Tabellarische Darstellung der identifizierte Isolate der Großgruppe B mit Angaben über das Isolierungsjahr

	1997	1999	2000	2001
<i>Acinetobacter</i>	-	-	x	-
<i>Alcaligenes</i>	-	-	x	x
<i>Comamonadaceae</i>	-	-	x	x
<i>Escherichia</i>	-	-	x	-

Die ebenfalls mittels der ARDRA-Analyse in die Großgruppe B eingruppierten denitrifizierenden Stämme der Gattungen *Pseudomonas* und *Bacillus* konnten auch aus Wasserproben von flußaufwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Probestellen isoliert werden. Dementsprechend wurden sie nicht in die Betrachtung über den Einfluß der veränderten Stickstoffzusammensetzung des Klärwassers miteinbezogen.

Alle hier betrachteten Isolate der Großgruppe B wurden erst nach der Inbetriebnahme der Nitrifikationsstufe im März 2000 und nicht in den Jahren 1997 und 1999 isoliert. Die Stämme der Gattungen *Acinetobacter* und *Escherichia* wurden ausschließlich im Jahr 2000 isoliert, während die *Alcaligenes* und *Comamonadaceae* Spezies auch im darauffolgenden Probenahmejahr detektiert wurden.

5 DISKUSSION

Ziel der Arbeit war es, den Einfluß einer Klärwassereinleitung auf denitrifizierende Bakterien im hyporheischen Interstitial der Lahn zu analysieren. Für diese Untersuchung wurden ausgewählte chemisch-physikalische Parameter gemessen, die Denitrationspotenz ermittelt und kultivierbare denitrifizierende Bakterien mittels molekulargenetischer und physiologischer Methoden charakterisiert und identifiziert.

5.1 Physikalisch-chemische Parameter im hyporheischen Interstitial und im Oberflächenwasser der Lahn sowie im Klärwasser

Die physikalisch-chemischen Parameter des hyporheischen Interstitials werden geprägt von den Austausch- und Transportvorgängen mit dem Oberflächen- und Grundwasser. Der Eintrag von Abwässern in die fließende Welle verändert die Bedingungen für die in der fließenden Welle und im Interstitial lebenden Organismen wie auch deren Stoffwechselprozesse (INGENDAHL et al. 2002, SCHMIDT 2002, HÜBNER 2003).

Im Folgenden werden die Einflüsse der Klärwassereinleitung auf die chemisch-physikalischen Parameter in der fließenden Welle und im hyporheischen Interstitial der Lahn diskutiert.

5.1.1 Stickstoffkonzentration im Kläranlagenablauf

Von Juli 1999 bis März 2000 wurde ein hoher Ammoniumeintrag in die Lahn (bis zu $16,6 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$) durch den Kläranlagenablauf registriert. Mit den baulichen Veränderungen der Kläranlage ab März 2000 folgten die Betreiber der Richtlinie 91/271/EWG über die Behandlung von kommunalem Abwasser der Europäischen Gemeinschaft, die mit diesen Maßnahmen auf die zunehmende Problematik der Gewässereutrophierung reagiert. Die baulichen Veränderungen, die während des Probenahmezeitraumes von 1999 - 2001 in der Kläranlage Sarnau (Abwasserverband Wetschaft) vorgenommen wurden, hatten eine Änderung der Konzentration der Stickstoffverbindungen im Abwasser zur Folge. Nach Inbetriebnahme einer Nitrifikationsstufe als Bestandteil der 3. biologischen Reinigungsstufe zur biologischen Stickstoffeliminierung wurde durch die im Klärvorgang eingesetzten Nitrifikanten das Ammonium unter Sauerstoffverbrauch zu Nitrat oxidiert. Aufgrund dessen sank ab März 2000 die Ammoniumkonzentration im Klärwasser (auf ca. $1 \text{ mg NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$) und gleichzeitig stieg die Nitratfracht des Klärwasser stark an (von ca. 1,5 auf bis zu $21 \text{ mg NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Die Eliminierung von Ammonium zugunsten von Nitrat durch die Nitrifikanten in der Kläranlage ist demzufolge erfolgreich.

Im Dezember 2000 wurde der zweite Teil der 3. Reinigungsstufe - eine Denitrifikationsstufe - in der Kläranlage Sarnau installiert. Durch diese wird unter überwiegend anaeroben Verhältnissen Nitrat zu molekularem Stickstoff reduziert und somit weitestgehend aus dem Abwasser entfernt. Nach Inbetriebnahme der Denitrifikationsstufe in der Kläranlage sanken die hohen Nitrat-N Werte des Abwassers mit zunehmender Effektivität der Denitrifikationsstufe (durchschnittlich auf 4,8 mg $\text{NO}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$). Durch den gesunkenen Nitratwert im Abwasser zeigt sich, daß mit der Inbetriebnahme der Denitrifikationsstufe das Nitrat weitgehend eliminiert wird.

Die Konzentration von Nitrit-N im Klärwasser betrug im Mittel 0,2 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ und lag in der Regel unter 1 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$. Deutliche Änderungen der Nitritkonzentration im Klärwasser konnten während des gesamten Probenahmezeitraumes nicht festgestellt werden.

Die Zielvorgaben zur chemischen Güteklassifizierung von Fließgewässern sehen für die Ammoniumkonzentration die Einhaltung eines Wertes von 0,3 mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ (chemische Gewässergüteklasse II - Mäßig belastet) vor. Dieser Wert wurde festgesetzt, um die Belastung des Sauerstoffhaushaltes von Fließgewässern durch die sauerstoffzehrende Nitrifikation sowie eine Belastung durch das mit zunehmenden Temperaturen und steigendem pH-Wert freigesetzte toxische Ammoniak zu reduzieren (LANDESUMWELTAMT NORDRHEIN-WESTFALEN 2002).

Insgesamt zeigte sich durch die Umbaumaßnahmen in der Kläranlage eine eindeutige Verminderung der Ammoniumkonzentration im Klärwasser. Dies führte auch zu einer Verminderung der Ammoniumkonzentration im Oberflächenwasser, wodurch sich die chemische Gewässergüte der Lahn für diese beiden Parameter von einem deutlich belasteten (Güteklasse II-III) zu einem mäßig belasteten Fließgewässer (Güteklasse II) verbesserte.

5.1.2 Ammonium

Ammonium entsteht bei der Mineralisation stickstoffhaltiger organischer Verbindungen. In unbelasteten Fließgewässern tritt Ammonium nur in geringen Konzentrationen auf ($< 0,05$ mg $\text{NH}_4\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$, REGIERUNGSPRÄSIDIUM GIEßEN 1994). Erhöhte Ammoniumwerte werden im Wesentlichen durch Einträge aus diffusen Quellen - insbesondere von landwirtschaftlich genutzten Flächen - und durch Einleitungen aus Kläranlagen verursacht (RHEINHEIMER 1988). Zu Beginn des Probenahmezeitraumes führte der Eintrag des Klärwassers mit hohem Ammoniumgehalt zur Erhöhung der Ammoniumkonzentration in der fließenden Welle. Nach der Inbetriebnahme des ersten Teils der 3. Reinigungsstufe, der Nitrifikation, im März 2000 sanken die Ammoniumwerte im Klärwasser um ca. eine Zehnerpotenz. Gleichzeitig sanken auch die Ammoniumwerte in der fließenden Welle.

Die hohe Ammoniumkonzentration im Abwasser des Kläranlagenablaufes führte zu einer detektierbaren Erhöhung der Ammoniumkonzentration im Interstitial des Transektes VII. Dieses Transekt befindet sich ca. 250 m flußabwärts des Kläranlagenablaufes am Beginn eines Riffles, einem Infiltrationsbereich, in dem Oberflächenwasser verstärkt in das Interstitial eintritt, was die Aktivität der Bakterien im Gewässersediment erhöhen kann (JONES et al. 1995, SAENGER & LENK 2000 und INGENDAHL et al. 2002). Erst die baulichen Veränderungen in der Kläranlage führten in diesem Transekt zu einem Absinken der Ammoniumkonzentration auf das Niveau der anderen drei untersuchten Transekte.

In der Sedimenttiefe von 5 cm der Transekte I, III und V wurde im Vergleich zu den tieferen Sedimentschichten eine deutlich höhere Ammoniumkonzentration festgestellt. Dies kann durch Adsorption des positiv geladenen Ammoniums durch das Sediment hervorgerufen werden, was für die hyporheische Zone bereits von TRISKA et al. (1989) nachgewiesen wurde. Auch Ammonium verbrauchende Prozesse scheinen auf den ersten Blick für diese Abnahme in den tiefer gelegenen Sedimentschichten des Interstitial verantwortlich zu sein. FISCHER et al. (zur Publikation angenommen) konnten nachweisen, daß in tieferen Sedimentschichten überwiegend Vermischungsphänomene zwischen Oberflächenwasser und ammoniumarmen Interstitialwasser für eine solche Abnahme verantwortlich sind.

Es erstaunt, daß in dem direkt in der Abwasserfahne gelegenen Transekt V im Vergleich zu den vom Klärwasser unbeeinflußten Transekten I und III keine deutlich erhöhten Ammoniumkonzentrationen gemessen wurden. Dies läßt auf eine hohe Nitrifikationsaktivität in diesem Interstitialbereich schließen, bei der verstärkt Ammonium zu Nitrit bzw. Nitrat umgesetzt wird. INGENDAHL et al. (2002) fanden bei Labormessungen von an gleicher Stelle im Interstitial exponierten Sedimentröhren heraus, daß in Transekt V mit $0,043 \text{ mg NO}_3\text{-N dm}^{-3}\text{h}^{-1}$ ohne Ammoniumzusatz eine ungefähr doppelt so hohe Nitratproduktion stattfindet wie in den Transekten I, III und VII (mit $0,015 - 0,022 \text{ mg NO}_3\text{-N dm}^{-3}\text{h}^{-1}$), während sich die Nitratproduktion mit Ammoniumzusatz sogar auf das fünffache ($0,210 \text{ mg NO}_3\text{-N dm}^{-3}\text{h}^{-1}$) erhöhte. Unter den Bedingungen im Freiland wird in diesem Transekt das Ammonium verstärkt zu Nitrit umgesetzt, aber nicht weiter zu Nitrat oxidiert oder zu molekularem Stickstoff reduziert. Dies wird durch die vergleichsweise hohen Nitritwerte in diesem Transekt belegt (siehe Kapitel 5.1.4).

Ammonium wird unter großem Sauerstoffverbrauch durch nitrifizierende Bakterien über Nitrit zu Nitrat umgesetzt. Dabei werden pro Milligramm Ammonium-N 3,6 mg Sauerstoff verbraucht (RHEINHEIMER 1988). Sauerstoffdefizite durch die Nitrifikation treten erst ab einer Ammoniumkonzentration von über $1 \text{ mg NH}_4\text{-N l}^{-1}$ auf (REGIERUNGSPRÄSIDIUM GIEßEN 1994). Eine deutliche Belastung des Sauerstoffhaushaltes der Lahn durch den stark

sauerstoffverbrauchenden Prozeß der Nitrifikation ist in dieser Untersuchung nicht festgestellt worden.

Mikrobielle Nitrifikation und heterotropher Stoffwechsel konkurrieren um Ammonium, wobei heterotrophen Bakterien bei einer hohen Konzentration von löslichem organischen Kohlenstoff erfolgreicher konkurrieren als nitrifizierende Bakterien. BUTTURINI et al. (2000) wiesen unter diesen Bedingungen eine stark erniedrigte Nitrifikationsrate und letztlich eine organische Bindung des Ammoniums nach. Häufig wird das Ammonium bevorzugt aufgenommen (im Vergleich zu Nitrat und Aminosäuren), da es direkt zur Synthese von Aminosäuren verwendet werden kann (RHEINHEIMER 1988). Aufgrund des hohen Ammoniumgehaltes des Klärwassers kann während der Vegetationsperiode durch das Periphyton das Ammonium verstärkt in produzierter Biomasse festgelegt werden (FISCHER et al. zur Publikation angenommen). In dieser Untersuchung wurde in den Interstitialbereichen flußabwärts des Kläranlagenablaufes im Vergleich zu den vom Klärwasser unbeeinflußten Probenahmestellen keine deutlich verstärkte Abnahme der Ammoniumkonzentration festgestellt. An derselben Untersuchungsstelle konnten auch keine deutlichen Unterschiede zwischen vom Klärwasser beeinflußten und unbeeinflußten Probenahmestellen bezüglich der Algendichte auf der Sedimentoberfläche nachgewiesen werden (IBISCH, pers. Mitteilung).

5.1.3 Nitrat

Mit Inbetriebnahme der Nitrifikation im März 2000 wurde vorerst eine erhöhte Nitratlast durch das Klärwasser in die Lahn eingetragen, bis im Dezember 2000 die zweite Stufe der dritten Reinigungsstufe, die Denitrifikation, gestartet wurde. Der erhöhte Eintrag von Nitrat durch das Klärwasser in die Lahn von März bis Dezember 2000 trug weder in der fließenden Welle noch im Interstitial zu einer deutlichen Erhöhung der Nitratkonzentration bei.

Auch die Unterschiede zwischen den untersuchten Sedimenttiefen und Transekten in Bezug auf die Nitratkonzentration waren nicht signifikant. Konnten in anderen Untersuchungen deutliche Unterschiede in der Nitratkonzentration zwischen Infiltrations- und Exfiltrationsbereich gemessen werden (Franken et al. 2001), so traf dies in dieser Untersuchung nicht zu. Im Durchschnitt war die Nitratkonzentration im Exfiltrationsbereich (Transekt III) ähnlich der der Infiltrationsbereiche (Transekte I, V und VII). Es wurden allerdings temporär im September 2000 stark erhöhte Nitratwerte in allen untersuchten Sedimenttiefen des Transektes III und in den tieferen Sedimentschichten des Transektes I gemessen. Diese hohen Nitratkonzentrationen sind nicht auf Stoffwechselprozesse in diesen Interstitialbereichen zurückzuführen, sondern hängen mit der Auffüllung eines Schönungsteiches zu diesem Zeitpunkt zusammen, der direkt an der Wasserfront dieser Transekte liegt. Diese Auffüllung verursachte eine Erhöhung des Grundwasserspiegels

(SEYDELL, pers. Mitteilung), wodurch nitratreiches Wasser aus dem Schönungsteich bzw. Grundwasser in diesem Interstitialbereich ins Oberflächenwasser der Lahn einströmte. Das Grundwasser ist in Deutschland durch hohe Überschüsse in der Stickstoffflächenbilanz stark mit Nitrat belastet. Jährlich werden ca. 80 bis 100 kg Stickstoff pro Hektar landwirtschaftlicher Nutzfläche ungenutzt in die Umwelt entlassen. Trotz der im Rahmen der EG-Trinkwasserrichtlinie (80/77/EEC) und der EG-Richtlinie zum Schutz der Gewässer vor Verunreinigung durch Nitrat aus landwirtschaftlichen Quellen (91/676/EEC) umgesetzten Vorschriften hat sich der Nitratgehalt im Grundwasser noch nicht ausreichend reduziert (FLAIG et al. 2002).

Anhand der erhöhten Nitratwerte in diesem Bereich wird deutlich, daß durch die Erweiterung und Flutung des Schönungsteiches nur temporär eine Erhöhung des Grundwasserspiegels verursacht wurde. Die damit verbundene Erhöhung der Nitratkonzentration hatte keinen Einfluß auf die Denitrationspotenzen in diesem Bereich. Eine temporäre Erhöhung der Nitratkonzentration von durchschnittlich $2,4 \text{ mg NO}_3\text{-NI}^{-1}$ auf bis zu $8,7 \text{ mg NO}_3\text{-NI}^{-1}$ führt damit nicht zu einer erhöhten Anzahl von denitrifizierenden Bakterien.

Des weiteren beweist die temporär erhöhte Nitratkonzentration, daß die untersuchten Sedimenttiefen der Transekte I und III an den anderen Probenahmeterminen nicht vom Grundwasser beeinflusst waren. Die signifikant niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen, die in Transekt III gemessen wurden, sind demnach nicht durch den Einstrom von Grundwasser in die untersuchten Sedimentschichten hervorgerufen worden, sondern durch ausströmendes Interstitialwasser, das wegen der vergleichsweise längeren Verweildauer im Interstitial durch respiratorische Prozesse eine niedrigere Sauerstoffkonzentration aufweist. Zudem ist die Einmischung von Oberflächenwasser ins Interstitial in diesem Exfiltrationsbereich im Vergleich zu den Infiltrationsbereichen der Transekte I, V und VII verringert (SAENGER 2000).

Dies zeigen auch die gemessenen, temporär erhöhten Nitratkonzentrationen der untersuchten Sedimenttiefen des Transektes III (Exfiltrationsbereich) im Vergleich zum Transekt I (Infiltrationsbereich) während der Erweiterung und Flutung des Schönungsteiches im September 2000: Durch eine Erhöhung des Grundwasserspiegels in diesem Zeitraum wurden in allen Sedimenttiefen des Exfiltrationsbereiches erhöhte Nitratkonzentrationen gemessen. Im Infiltrationsbereich dagegen wurden diese nur in den unteren Sedimentschichten festgestellt, was auf den Einstrom von nitratärmeren Oberflächenwasser und einer damit verbundenen Erniedrigung der Nitratkonzentration in den oberen Sedimentschichten zurückzuführen ist.

5.1.4 Nitrit

Unter natürlichen Bedingungen sind Nitritanreicherungen in terrestrischen wie auch in aquatischen Ökosystemen sehr selten (SMITH et al. 1997). So benennen VAN BENNEKOM et al. (1978) als typische Konzentration für unbelastete Flüsse einen Bereich von 1 - 3 $\mu\text{g NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$. Nach Untersuchungen von SMITH et al. (1995) stammen in dem von ihnen untersuchten Flußsystem Lough Neagh 40 % des Nitrits aus allochthonen Quellen (diffuse Quellen) und 60 % aus autochthonen Quellen durch Umsetzungen am Grenzbereich von Sedimentoberfläche und Wasserkörper. Laut der EG-Richtlinie 78/695/EEC zum Schutz und zur Verbesserung der Qualität von Süßgewässern für den Fischbestand liegen die Richtwerte für Salmonidengewässer bei 3 – 9 $\mu\text{g NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$. Für Trinkwasser liegen die Maximalwerte der EG-Richtlinie 80/77/EEC zur Trinkwasserqualität bei einer Konzentration von 30 $\mu\text{g NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$.

Mit bis zu 470 $\mu\text{g NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ wurden stark erhöhte Nitritkonzentrationen im Transekt V gemessen. Alle Tiefen dieses Transektes unterschieden sich diesbezüglich deutlich von denen der Transekte I, III und VII. Auch konnte deutlich der Einfluß des Klärwassers nachgewiesen werden, da signifikant höhere Nitritkonzentrationen in den Interstitialwasserproben flußabwärts des Kläranlagenablaufes im Vergleich zu den Interstitialwasserproben der Transekte flußaufwärts des Kläranlagenablaufes gemessen wurden. Aber dieser Anstieg wurde nicht durch den direkten Eintrag von Nitrit durch das Klärwasser verursacht, sondern beruht auf Stoffumsetzungen im Interstitial.

Auch wenn die durchschnittliche Nitritkonzentration der untersuchten Transekte unter 0,2 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ lag, konnten in den tieferen Sedimentschichten des Transektes V temporäre Maximalwerte von bis zu 0,47 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ gemessen werden, was den kritischen Grenzwert bezüglich der ökologischen Toxizität überschreitet ($\geq 0,3 \text{ mg NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$, HAMM 1991). Bei einer früheren Untersuchung wurden an derselben Untersuchungsstelle in der fließenden Welle Nitritwerte von bis zu 0,3 mg $\text{NO}_2\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ festgestellt (VON DER WIESCHE & WETZEL 1998). Die Autoren schreiben diese Nitritakkumulation in der fließenden Welle hauptsächlich einer unvollständigen Nitrifikation zu.

Dieses Ergebnis läßt sich durch unsere Messungen bestätigen: In der oberen Sedimentschicht im Interstitial des Transektes V wurden niedrigere Nitritwerte gemessen als in den tieferen Sedimentschichten. Da aerobe oberflächliche Sedimentschichten eine hohe Kapazität besitzen, Nitrit zu Nitrat zu oxidieren (STIEF et al. 2002), wird davon ausgegangen, daß in der oberen Sedimentschicht dieses Interstitialbereiches ein Teil des Nitrits durch die Nitrifikation umgesetzt wird.

Ein weiterer Hinweis darauf, daß die unvollständige Nitrifikation für die Nitritakkumulation verantwortlich ist, ist die im Vergleich zum Transekt VII niedrigere Ammoniumkonzentration in

Transekt V. Durch den Eintrag des Klärwassers würde eine ähnlich hohe Ammoniumkonzentration in Transekt V zu erwarten sein. Es ist davon auszugehen, daß eine verstärkte unvollständige Nitrifikation die Ammoniumkonzentration in diesem Transekt erniedrigt und zu einer Nitritakkumulation in den unteren Sedimentschichten geführt hat.

In Experimenten von BURNS et al. (1996) konnte durch die ^{15}N -Methode bewiesen werden, daß für eine Anreicherung von Nitrit in Böden simultane Nitrifikations- und Denitrifikationsprozesse verantwortlich sind, wobei der Nitrifikation mit über 60 % des gebildeten Nitrits eine Dominanz bei der Nitritakkumulation zugeschrieben wird. Die nur unter aeroben Bedingungen ablaufende Nitrifikation setzt sich aus zwei Prozessen zusammen: Ammonium wird u.a. durch *Nitrosomonas* Spezies zu Nitrit oxidiert (Nitritation), das anschließend u.a. von *Nitrobacter* Spezies zu Nitrat oxidiert wird (Nitratation).

Die Erhöhung der Nitritkonzentration mit zunehmender Tiefe hängt mit den unterschiedlichen Umsetzungsraten dieser beiden Prozesse der Nitrifikation zusammen. Akkumulationen von Nitrit als Zwischenprodukt in der Nitrifikation treten normalerweise nur sehr selten auf, da bei niedrigen Temperaturen die Oxidation von Ammonium zu Nitrit durch *Nitrosomonas* Spezies der limitierende Schritt der Nitrifikationsrate ist (RHEINHEIMER 1965, SMITH et al. 1995).

Verschiedene Studien zeigen, daß eine hohe Ammoniumkonzentration, ein extremer pH-Wert und ein niedriger Sauerstoffgehalt für temporäre Nitritakkumulationen verantwortlich sein können (ANTHONISEN et al. 1976, SUTHERSAN & GANCZARCZYK 1986, BALMELLE et al. 1992, LONDONG et al. 1994). Mit steigendem pH-Wert bzw. steigender Temperatur verschiebt sich das Ammonium/Ammoniak-Gleichgewicht in Richtung Ammoniak. Hohe Ammoniakkonzentrationen von 1 - 5 mg $\text{NH}_3\text{-N}\cdot\text{l}^{-1}$ inhibieren die Nitratation aber nicht die Nitritation (ABELING & SEYFRIED 1992), so daß bei ausreichender Ammoniumkonzentration im Interstitial eine Nitritanreicherung - wie die beobachtete - durch unvollständige Nitrifikation möglich ist. *Nitrobacter* reagieren deutlich empfindlicher auf freies Ammoniak als *Nitrosomonas* (ALLEMAN 1985), da die membrangebundene Nitritoxidoreduktase von *Nitrobacter* durch Ammoniak inhibiert wird (YANG & ALLEMAN 1992). RHEINHEIMER (1988) erklärt die pH-Hemmung der Nitrifikation bei extremen pH-Werten als eine Substrathemmung durch die Zunahme des Ammoniaks bei hohen pH-Werten bzw. durch eine Zunahme des HNO_2 bei niedrigen pH-Werten. Mit zunehmend anaeroben Bedingungen in tieferen Sedimentschichten läuft der zweite Prozeß der Nitrifikation - die Umwandlung des Nitrits zu Nitrat - in geringerem Maße ab als die Umwandlung des Ammoniums zu Nitrit (RHEINHEIMER 1988). Durch Inhibierung der Nitratation erfolgt eine populationsdynamische Verschiebung des Verhältnisses zwischen *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* in Richtung *Nitrosomonas*, wodurch der Effekt der Nitritakkumulation noch verstärkt wird (SMITH et al. 1997). Neben diesen Faktoren können auch

Diffusionsvorgänge in nitrifizierenden Biofilmen für Nitritakkumulationen verantwortlich sein (NIJHOF & KLAPWIJK 1995).

Eine Inhibierung der Nitratation im Transekt V aufgrund erhöhter Ammoniumkonzentrationen (siehe Kapitel 5.1.2), erniedrigter Sauerstoffkonzentrationen (siehe Kapitel 5.1.5) oder extremer pH-Werte (siehe Kapitel 5.1.6) konnte in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden.

Auch erhöhte Temperaturen hemmen die Aktivität von *Nitrobacter* stärker als die von *Nitrosomonas* (15 - 25 °C: RANDALL & BUTH 1984, 16 - 22 °C: VON DER WIESCHE & WETZEL 1998). In dieser Untersuchung konnten hohe Nitritkonzentrationen im Interstitial insbesondere in den Sommermonaten festgestellt werden, so daß die Akkumulation von Nitrit durch Inhibierung der Nitritoxidation auf erhöhte Wassertemperaturen im Interstitial zurückgeführt werden muß.

Nitrit tritt auch als Endprodukt der Nitratreduktion sowie als Zwischenprodukt der Denitrifikation auf. STIEF & NEUMANN (1998) konnten in mit sandigem bzw. schlammigem Substrat gefüllten Sedimentröhren eine Nitritanreicherung nachweisen, die sich auf die dissimilatorische Nitratreduktion zurückführen ließ. Da diese Sedimentröhren aber von nitratreichem, anoxischem Wasser durchflossen wurden, können diese Ergebnisse nicht ohne weiteres auf die Verhältnisse im hyporheischen Interstitial der Lahn übertragen werden. Eine verstärkte Nitratreduktion zu Nitrit ist für die beobachteten Nitritanreicherungen im Transekt V nicht wahrscheinlich, da die Umsatzraten von Nitrat zu Nitrit (Denitrationspotenzen) für diesen Bereich des Interstitials nur niedrige Werte aufzeigen (vgl. Kapitel 5.2). Auch eine weitere Reduktion des Nitrits durch denitrifizierende Bakterien findet in dem untersuchten Transekt nicht oder nur in geringem Umfang statt. Zwar sind anaerobe Bereiche im Interstitial dieses Transektes anzunehmen (vgl. Kapitel 5.1.5), jedoch weisen wiederum die vergleichsweise niedrigen Denitrationspotenzen daraufhin, daß höchstens ein geringer Teil des vorhandenen Nitrits denitrifiziert wird.

In großen Flüssen mit anaeroben Bedingungen, hoher Konzentration an organischem Kohlenstoff und ausreichender Nitratkonzentration ist überwiegend die anaerobe dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) durch fermentative Bakterien für eine Nitritakkumulation verantwortlich (KELSO et al. 1997). Jedoch zeigte sich in einer späteren Untersuchung, daß durch Zugabe von organischem Kohlenstoff unter anaeroben Bedingungen auch die Denitrifikation begünstigt wird (KELSO et al. 1999). Für die DNRA muß ähnlich der Denitrifikation neben Sauerstoffmangel eine hohe Konzentration an organischem Kohlenstoff, verfügbares Nitrat sowie ein niedriges Redoxpotential vorhanden sein (ZUMFT 1997). In gleicher Weise wird die DNRA in Böden durch hohe pH-Werte, ein großes Angebot an organischem Kohlenstoff und verfügbarem Nitrat begünstigt und bei einem pH-Wert von 8 wurde eine Nitritakkumulation durch die DNRA nachgewiesen (STEVENS et al. 1998). Weder die in Transekt V gemessenen pH-

Werte, Nitrat- bzw. Ammoniumkonzentrationen noch die Denitrationspotenzen weisen auf eine verstärkte DNRA in diesem Interstitialbereich der Lahn hin, so daß eine Nitritanreicherung durch die DNRA auszuschließen ist.

Die hohen Nitritkonzentrationen in Transekt V lassen sich auf eine unvollständige Nitrifikation und nicht auf eine unvollständige Denitrifikation bzw. DNRA zurückführen. Durch die gemessenen niedrigen Denitrationspotenzen in diesem Transekt wird belegt, daß eine Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation, bei der das aus der unvollständigen Nitrifikation resultierende Nitrit durch Bakterien denitrifiziert wird, nur in geringem Maße stattgefunden hat.

5.1.5 Sauerstoff

Die baulichen Veränderungen in der Kläranlage hatten eine Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Klärwasser zur Folge, wobei die Werte im Mittel unter der Sauerstoffsättigungskurve lagen. Der geringe Sauerstoffgehalt im Klärwasser wirkte sich auch auf die Sauerstoffkonzentration in der fließenden Welle aus: Die Sauerstoffkonzentration lag in der fließenden Welle flußaufwärts durchschnittlich höher als in der fließenden Welle flußabwärts des Kläranlagenablaufes.

In allen Sedimenttiefen des Interstitials wurden signifikant niedrigere Sauerstoffkonzentrationen gemessen als in der fließenden Welle, wobei die Differenz zwischen fließender Welle und dem Interstitial durchschnittlich $4,2 \text{ mg O}_2\text{l}^{-1}$ betrug. Die Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in der fließenden Welle sowohl flußaufwärts als auch flußabwärts des Kläranlagenablaufes verursachte keine signifikante Erhöhung der Sauerstoffkonzentration in den Interstitialwasserproben. Es konnten allerdings mit Ausnahme des Transektes III in allen Transekten - hervorgerufen durch den Einstrom von vergleichsweise sauerstoffreichem Oberflächenwasser - signifikant höhere Sauerstoffkonzentrationen in 5 cm Sedimenttiefe im Vergleich zu den tieferen Sedimentschichten gemessen werden, was auf einen hohen Anteil des Oberflächenwasser am Interstitialwasser in dieser Sedimenttiefe hinweist (SAENGER 2000).

Im Interstitial der Transekte I, V und VII wurden deutlich höhere Sauerstoffkonzentrationen gemessen als im Interstitial des Transektes III. Allerdings wurden in einer Sedimenttiefe von 40 cm des Transektes VII mit durchschnittlich $4,1 \text{ mg O}_2\text{l}^{-1}$ ähnliche Sauerstoffkonzentrationen gemessen wie in Transekt III ($3,6 \text{ mg O}_2\text{l}^{-1}$ bis $3,9 \text{ mg O}_2\text{l}^{-1}$). Transekt III, das sich signifikant von allen anderen Transekten unterschied, liegt am Ende eines Riffles. Das mesoskalische Konzept von VAUX (1968), nach dem Oberflächenwasser am Beginn eines Riffles ins Interstitial eintritt, durch den Riffle hindurchfließt und am Ende des Riffles ausströmt, wurde durch Versuche mit dem konservativen Tracer Uranin an dieser Rifflestruktur nicht bestätigt: In Transekt I, das am Beginn einer Rifflestruktur liegt, konnte zwar ein verstärktes Einströmen des Oberflächenwasser (Infiltrationsbereich) ins Interstitial nachgewiesen werden, ein großräumiges

Durchströmen des untersuchten Riffles wurde aber nicht gemessen. Ein verstärktes Ausströmen von Interstitialwasser ins Oberflächenwasser bzw. geringe Austauschprozesse zwischen Oberflächen- und Interstitialwasser wurden für den Bereich von Transekt III beobachtet, der insbesondere durch erniedrigte Sauerstoffwerte gekennzeichnet ist (SAENGER 2000). Zum einen liegt dies an einem niedrigeren Austausch mit der fließenden Welle (LENK & SAENGER 2000), zum anderen an der größeren Verweildauer des Interstitialwassers im Sediment, wodurch das Interstitialwasser den sauerstoffzehrenden Prozessen länger ausgesetzt ist (MERMILLOD-BLONDIN et al. 2000). Im Gegensatz zu den Ergebnissen von FRANKEN et al. (2001) konnte in dieser Untersuchung zwar eine verminderte Sauerstoffkonzentration in einem Exfiltrationsbereich dokumentiert werden, eine Reduktion der Nitratkonzentration in diesem Bereich wurde aber nicht beobachtet (vgl. 5.1.3).

Die Erweiterung und Auffüllung des Schönungsteiches im September 2000 an der direkten Wasserfront des Transektes III führte trotz des erhöhten Grundwasserspiegels zu keiner weiteren Abnahme der Sauerstoffkonzentration in diesem Interstitialbereich.

Generell muß bezüglich der Sauerstoffkonzentration darauf hingewiesen werden, daß es sich um Momentaufnahmen der Sauerstoffverhältnisse am Tage handelt. Die Sauerstoffverhältnisse in der fließenden Welle der Lahn unterliegen starken tagesperiodischen Schwankungen (BORCHARDT & FISCHER 2000). HÜBNER (2003) stellte in seiner Untersuchung bezüglich der Tag-Nachtschwankung der Sauerstoffkonzentration an gleicher Stelle tagesperiodische Schwankungen von durchschnittlich $6,9 \text{ mg O}_2\text{l}^{-1}$ in der fließenden Welle fest. Im Vergleich dazu lassen die im Juni 2001 gemessenen Maximalwerte in der fließenden Welle auf tägliche Perioden mit Sauerstoffkonzentrationen im übersättigten Bereich und auf nächtliche Perioden im untersättigten Bereich schließen. Die tagsüber gemessene Differenz zwischen fließender Welle und Interstitial betrug in dieser Untersuchung durchschnittlich $4,2 \text{ mg O}_2\text{l}^{-1}$. Geht man davon aus, daß sich diese Differenz auch während der Nacht ausbildet, ist aufgrund der tagesperiodischen Sauerstoffschwankungen ein Wechsel von aeroben und anaeroben Bedingungen im hyporheischen Interstitial der Lahn sehr wahrscheinlich (BORCHARDT & FISCHER 2000).

Des weiteren muß darauf hingewiesen werden, daß die gemessenen Sauerstoffkonzentrationen der Interstitialwasserproben aufgrund der Probenahmetechnik (vgl. Kapitel 3.1) einen Mittelwert der Sauerstoffkonzentrationen im gesamten Entnahmehorizont darstellen. Ein Nebeneinander von aeroben und anaeroben Mikronischen wurde in Süßwassersedimenten nachgewiesen (JENSEN et al. 1994, LORENZEN et al. 1998) und kann auch für die Lahn angenommen werden. So steht die Sauerstoffkonzentration im Prinzip für eine Mischung in unbekanntem Verhältnis von Interstitialwasser aus anaeroben und aeroben Bereichen. Daraus läßt sich neben dem Aspekt der

tagesperiodischen Schwankungen schließen, daß besonders in der Nacht anaerobe Bedingungen in Bereichen des hyporheischen Interstitial herrschen, wodurch die Denitrifikation gefördert wird. Schon bei Sauerstoffkonzentrationen von 1 bis 2 mg O₂l⁻¹ findet in Biofilmen eine unbeeinflusste Denitrifikation statt (Christensen et al. 1977 in RHEINHEIMER 1988). OTTE et al. (1996) wiesen nach, daß bei dem denitrifizierenden Bakterium *Alcaligenes faecalis* TUD bei einem Wechsel von niedriger Sauerstoffkonzentration (5 % Luftsättigung) zu anaeroben Verhältnissen die Induzierung der Nitritreduktase nur 2 h dauert. Im Vergleich dazu dauert die Induzierung der Nitritreduktase 20 Stunden, wenn die Sauerstoffverhältnisse von aeroben zu anaeroben Bedingungen wechseln (OTTE et al. 1996). Allerdings wurde eine Aktivität der Nitritreduktase und damit eine Denitrifikation auch unter aeroben Bedingungen bei *Alcaligenes faecalis* TUD beobachtet (ROBERTSON & KUENEN 1984, OTTE et al. 1996). Bei dem denitrifizierenden Bakterium *Pseudomonas fluorescens* dauerte die Induzierung der Nitritreduktase nur eine halbe Stunde (PHILIPPOT et al. 2001). Demnach findet aufgrund der schon unter limitierten Sauerstoffverhältnissen schnellen Induzierung der Nitritreduktase eine zeitliche Verzögerung der Denitrifikation im Interstitial der Lahn nicht statt.

Auch der Prozeß der anaeroben Ammoniumoxidation (Anamox), bei der unter Reduktion von Nitrit bzw. Ammonium zu molekularem Stickstoff oxidiert wird, kann ein Stoffwechselweg der Bakterien im hyporheischen Interstitial von Fließgewässern sein (BOTHE et al. 2000, MCDEVITT et al. 2000, JETTEN et al. 2002, THAMDRUP & DALSGAARD 2002). Die Nitritakkumulationen in Transekt V und die hohen Denitrationspotenzen in Transekt VII weisen jedoch daraufhin, daß dieser Prozeß für den untersuchten Interstitialbereich der Lahn nicht von großer Relevanz ist. Zudem ist dieser Abschnitt der Lahn als mesotrophes einzustufen (BORCHARDT & FISCHER 2000), was zu einer vergleichbar geringen Bedeutung des Anamox-Prozesses im Stickstoffhaushalt im Vergleich zur Denitrifikation führt. Für marine Bereiche mit hohen Konzentrationen an organischem Kohlenstoff ist bereits nachgewiesen worden, daß der produzierte molekulare Stickstoff nur zu 2 % aus dem Anamox-Prozeß und zu 98 % aus der Denitrifikation stammt (DALSGAARD & THAMDRUP 2002, THAMDRUP & DALSGAARD 2002).

Niedrige Sauerstoffpartialdrücke erlauben neben dem Prozeß der Denitrifikation auch die dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA), bei der Nitrat als terminaler Elektronenakzeptor fungiert und Ammonium produziert wird (HENDRIKS et al. 2000). BONIN et al. (1998) konnten diesen Prozeß im Sediment des Mittelmeeres und KELSO et al. (1997) in anaeroben Sedimenten größerer Flüsse nachweisen. Eine Relevanz dieses Prozesses für das Interstitial der Lahn ist nicht zu erwarten, da in den Transekten I, III und V nur vergleichsweise geringe Umsatzraten von Nitrat (Denitrationspotenz) und keine signifikante Abnahme der

Nitratkonzentration gemessen wurden. In Transekt VII konnten im Juli und September 1999 zwar hohe Denitrationspotenzen und hohe Ammoniumkonzentrationen ermittelt werden, jedoch wurde hier keine signifikante Erniedrigung der Nitratkonzentration beobachtet.

5.1.6 pH-Wert

Die durchschnittlichen pH-Werte des Oberflächen- und des Interstitialwassers der Lahn lagen durchgehend im neutralen bis leicht alkalischen Bereich. Es zeigte sich, daß der pH-Wert im Interstitial im Vergleich zur fließenden Welle um durchschnittlich 0,3 erniedrigt war, wogegen die pH-Werte in Transekt V und VII vor den baulichen Veränderungen in der Kläranlage teilweise über den Werten der fließende Welle lagen. In Bereichen mit erhöhter Nitrifikation kann diese durch die Produktion von Hydroniumionen eine Absenkung des pH-Wertes verursachen. In Kläranlagen kann dies zu einer Autoinhibition der Nitrifikanten führen, wodurch die vollständige Umwandlung des Ammoniums verhindert wird (RHEINHEIMER 1988). Allgemein findet die Denitrifikation in einem Bereich von pH 5,8 bis 9,2 statt, wobei das Optimum im neutralen bis leicht alkalischen Milieu liegt (RHEINHEIMER 1988, SIMEK & COOPER 2002). ELLIS et al. (1996) wiesen in Böden sogar noch bei pH 4,5 eine Denitrifikation nach. Erhöhte pH-Werte können oft durch hohe Denitrifikationsraten verursacht werden (HORAN 1991), was wiederum die Produktion von molekularem Stickstoff fördert, da in Böden die Denitrifikation in einem Bereich von pH 6,5 - 8,0 positiv mit dem pH-Wert korreliert (STEVENS et al. 1998).

Im gesamten Probenahmezeitraum wurde eine geringe Abnahme des pH-Wertes im Interstitial im Vergleich zur fließenden Welle festgestellt. Der Einfluß der Denitrifikation auf den pH-Wert ist damit im Vergleich zu den pH-Wert erniedrigenden Prozessen der Nitrifikation und der verstärkten CO₂ Freisetzung durch heterotrophen Stoffabbau (SCHWOERBEL 1961, PUSCH & SCHWOERBEL 1994) als vergleichsweise gering einzuschätzen.

5.1.7 Elektrische Leitfähigkeit

Oft ist das Interstitial durch eine höhere elektrische Leitfähigkeit geprägt als das Oberflächenwasser. Dies ist auf einen geringen Wasseraustausch und eine höhere Konzentration an abgegebenen Stoffwechselprodukten zurückzuführen (SCHÖNBORN 1992). So kann die elektrische Leitfähigkeit als konservativer Tracer dienen, um den Einfluß des Oberflächenwassers auf das Interstitial abzuschätzen (INGENDAHL 1999, LENK 2000).

Die Messung der elektrischen Leitfähigkeit während der Erweiterung und Flutung des Schönungsteiches ergaben temporär erhöhte Werte in Transekt III und in den unteren Sedimentschichten von Transekt I. Die vergleichsweise geringen Unterschiede zwischen

fließender Welle und den verschiedenen untersuchten Sedimenttiefen der Transekte zeigen, daß es einen starken Austausch zwischen Oberflächenwasser und Interstitialwasser bis in 45 cm Tiefe gibt und daß der Einfluß des Grundwassers auf die oberflächennahen Sedimentschichten vergleichsweise gering ist. Diese Einschätzung deckt sich weitgehend mit den Befunden der Tracerversuche zur Charakterisierung der Austauschprozesse von SAENGER (2000).

5.2 Denitrationspotenz nach RHEINHEIMER (1965)

Eine im Juli und September 1999 gemessene Denitrationspotenz wies auf eine große Zahl von nitratreduzierenden Bakterien im Bereich des Transektes VII 250 m flußabwärts der Kläranlage bis in eine Sedimenttiefe von 45 cm hin. Zu diesem Zeitpunkt wurde mittels DAPI-Färbung ein erhöhter Eintrag von Bakterien durch die Kläranlage in die Lahn festgestellt, der zu einem Anstieg der Gesamtbakterienzahl in den Transekten V und VII im Vergleich zu den Transekten I und III beigetragen haben könnte. Eine Erhöhung der Zahl der nitratreduzierenden Bakterien in den untersuchten Sedimenttiefen des Transektes V konnte jedoch nicht beobachtet werden (TER HASEBORG et al. [zur Publikation angenommen]). Die Einleitung des Klärwassers führte zwar zu einer erhöhten Gesamtbakterienzahlen in den Transekten V und VII, aber der beobachtete Eintrag von abwasserbürtigen nitratreduzierenden bzw. denitrifizierenden Bakterien ins Oberflächenwasser der Lahn führte nicht unmittelbar zu einer erhöhten Anzahl dieser Bakterien im flußabwärts gelegenen Interstitial.

Nicht nur der Eintrag von nitratreduzierenden Bakterien, auch eine höhere Ammoniumkonzentration im Klärwasser ist eine mögliche Erklärung für die höheren Denitrationspotenzen in Transekt VII im Juli und September 1999. Denn im Mai und Juli 2001 konnten zwar im Klärwasser hohe Denitrationspotenzen gemessen werden, aber die Denitrationspotenzen in Transekt VII waren nicht erhöht. Im Untersuchungsjahr 2001 war bedingt durch die Umbaumaßnahmen in der Kläranlage die Ammoniumkonzentration im Klärwasser stark erniedrigt. INGENDAHL et al. (2002) konnten eine von 0,015 auf 0,419 mg NO₃-N dm⁻³ h⁻¹ erhöhte Nitratproduktion nach Zugabe von 5 ml Ammonium-N in Sedimentröhren feststellen, die an gleicher Stelle im hyporheischen Interstitial der Lahn exponiert waren. Dies weist auf eine hohe potentielle Nitrifikationsaktivität in Transekt VII hin. Im Gegensatz zu den Bedingungen in Transekt V, in dem aufgrund einer unvollständigen Nitrifikation und geringen Denitrationspotenzen eine Akkumulation von Nitrit-N im Interstitial vorlag, ist in Transekt VII keine Nitritakkumulation zu verzeichnen, was für eine vollständige Oxidation von Ammonium zu Nitrat oder für eine direkte Verwertung des entstandenen Nitrits durch die Denitrifikation spricht. Eine Kopplung der beiden Prozesse Nitrifikation und Denitrifikation, die von verschiedenen Autoren schon beschrieben wurde (NIELSEN et al. 1996, ARTH et al. 1998), kann für die

erhöhten Denitrationspotenzen in Transekt VII verantwortlich sein. In einem solchen Fall wird durch eine unvollständige Nitrifikation anfallendes Nitrit sowie durch eine vollständige Nitrifikation anfallendes Nitrat im Zuge der Denitrifikation zu molekularem Stickstoff reduziert. Durch eine gesteigerte Nitrifikation infolge des hohen Ammoniumeintrages durch das Klärwasser können denitrifizierende Bakterien von den Produkten der Nitrifikation profitieren, was die erhöhten Denitrationspotenzen in diesem Transekt erklärt. Die Verbreitung und die Aktivität von denitrifizierenden Bakterien im hyporheischen Interstitial ist demnach auch von der Aktivität der Nitrifikanten im Sedimentkörper als Nitrat- bzw. Nitrit-Quelle abhängig.

Durch Zugabe von Ammonium zu landwirtschaftlich bewirtschafteten Böden konnten AVRAHAMI et al. (2002) eine Veränderung in der denitrifizierenden nicht aber in der nitrifizierenden Bakterienpopulation feststellen: Eine Kopplung der beiden Prozesse ist demnach für die Denitrifikanten von entscheidender Bedeutung. Allerdings ist die Bedeutung der Nitratproduktion durch die Nitrifikation für die Denitrifikation abhängig von der Nitratkonzentration im umgebenden Wasser (JENSEN et al. 1994). In stickstofflimitierten Flüssen konsumiert die Denitrifikation 5 - 40 % des aus der Nitrifikation entstehenden Nitrates (HOLMES et al. 1996). Im Fall der Lahn, in der die Denitrifikation keiner Nitratlimitierung unterliegt, ist der Prozentsatz des durch die Denitrifikation genutzten Nitrates, das durch die Nitrifikation produziert wird, folglich geringer.

Die Verschiebung der Stickstoffzusammensetzung des Klärwassers von März bis Oktober 2000 von einer hohen Ammoniumkonzentration hin zu einer hohen Nitratkonzentration kann einen positiven Effekt auf die Anzahl der nitratreduzierenden bzw. denitrifizierenden Bakterien im Interstitial der Lahn haben, da ein Anstieg der Nitratkonzentration erhöhte Denitrifikationsraten verursacht (STIEF & NEUMANN 1998). Eine solche einfache Korrelation zwischen hohem Nitratreintrag durch das Klärwasser und hoher Nitratreduzierer- bzw. Denitrifikantenanzahl konnte in dieser Untersuchung nicht bestätigt werden. Auch eine temporär stark erhöhte Nitratkonzentration in Transekt III im September 2000 führte nicht zu einer Erhöhung der Denitrationspotenz. Andere Faktoren wie die Sauerstoffversorgung und die Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen scheinen eine entscheidendere Rolle für die Verbreitung der Nitratreduzierer bzw. Denitrifikanten im Interstitial der Lahn zu spielen.

Durch die Analyse von Sedimentröhren, die in demselben Untersuchungsgebiet im Interstitial exponiert waren, konnten INGENDAHL et al. (2002) im Vergleich zu den Transekten I, III und V einen vergleichsweise hohen Gehalt an losem anheftendem partikulärem organischem Material (LAPOM) im Transekt VII feststellen ($1,76 \text{ g l}^{-1}$ LAPOM versus $0,96 - 1,24 \text{ g l}^{-1}$ LAPOM). Die hohen Denitrationspotenzen in diesem Transekt könnten sich auf den hohen LAPOM-Gehalt zurückführen lassen, da dieser heterotrophe Denitrifikanten begünstigt. Allerdings konnten

INGENDAHL et al. (2002) den relativ hohen LAPOM-Gehalt in diesem Transekt auch im Jahr 2000 nachweisen, währenddessen die gemessenen Denitrationspotenzen stark erniedrigt waren. So kann von einer Determinierung der Verbreitung der Nitratreduzierer bzw. Denitrifikanten im Interstitial der Lahn ausschließlich durch den Gehalt an lose anheftendem partikulärem organischen Material nicht ausgegangen werden.

Die Denitrifikation findet überwiegend unter anoxischen Bedingungen bzw. bei geringen Sauerstoffpartialdrücken statt (ZUMFT 1997). Mit Sauerstoffkonzentrationen über 3 mg l^{-1} werden solche Bedingungen im Oberflächenwasser der Lahn nicht erreicht (BORCHARDT & FISCHER 2000). In dieser Untersuchung lagen die Sauerstoffkonzentrationen im hyporheischen Interstitial der Lahn bis in eine Sedimenttiefe von 45 cm durchschnittlich über $4,3 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$, wobei der niedrigste Wert mit $2,2 \text{ mg O}_2 \text{ l}^{-1}$ immer noch keine idealen Bedingungen für eine Denitrifikation darstellt.

Dennoch kann davon ausgegangen werden, daß trotz dieser Sauerstoffwerte auch anaeroben Areale im Interstitial der Lahn vorliegen: Zum einen stehen die gemessenen Werte aufgrund der Probenahmetechnik nicht für die tatsächliche Sauerstoffkonzentration in den jeweiligen Sedimenttiefen, sondern für die durchschnittliche Sauerstoffkonzentration im gesamten Entnahmehorizont (vgl. Kapitel 3.1). Zum anderen wurde ein Nebeneinander von aeroben und anaeroben Mikronischen bereits in Süßwassersedimenten nachgewiesen (JENSEN et al. 1994, LORENZEN et al. 1998) und kann auch für die Lahn angenommen werden (vgl. Kapitel 5.1.5).

Es ist darauf hinzuweisen, daß es sich bei den gemessenen Sauerstoffkonzentrationen um Tagesmessungen handelt. Auftretende Tagesschwankungen im Sauerstoffgehalt des Oberflächenwasser können eine Verschiebung der aeroben und anaeroben Verhältnisse in bestimmten Bereichen des hyporheischen Interstitials während Perioden hoher Primärproduktion von benthischen Algen verursachen (BORCHARDT & FISCHER 2000). Dieses mosaikförmige Auftreten von aeroben und anaeroben Bereichen im hyporheischen Interstitial bietet ideale Reaktionsräume für eine gekoppelte Nitrifikation/Denitrifikation; Schwankungen im Sauerstoffgehalt können eine Steigerung in Nitrifikations- und Denitrifikationsprozessen im hyporheischen Interstitial verursachen (HILL et al. 1998).

Neben der unter anaeroben Bedingungen ablaufenden Denitrifikation sind aerobe Denitrifikationsprozesse möglich. So ist unter alternierenden Sauerstoffkonzentrationen die Fähigkeit zur Respiration von Nitrat unter aeroben Bedingungen (Aerobe Denitrifikation) bei den heterotrophen Denitrifikanten (ROBERTSON & KUENEN 1984, LLOYD et al. 1987, ROBERTSON et al. 1995) wie auch bei autotrophen Denitrifikanten (HELMER & KUNST 1998, WANG 1998) weit verbreitet. Neben einer anaeroben Denitrifikation sind die in dieser Untersuchung identifizierten Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Shewanella* und

Alcaligenes auch zu einer aeroben Denitrifikation in der Lage: So konnte in aeroben Sedimenten eines Süßwassersees eine Co-Respiration von Sauerstoff und Nitrat, insbesondere bei Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Aeromonas* und *Moraxella* (CARTER et al. 1995) sowie bei *Shewanella putrefaciens* (KRAUSE & NEALSON 1997) detektiert werden. Die Nitratrespiration wird zwar unter aeroben Bedingungen durch Sauerstoff gehemmt, jedoch nicht komplett unterdrückt. Die Nitratrespirationsrate von *Shewanella putrefaciens* ist unter anaeroben Bedingungen drei- bis viermal höher als unter aeroben Bedingungen. Ein ähnliches Verhältnis von anaerober und aerober Denitrifikation wurde auch bei *Paracoccus denitrificans* und *Pseudomonas aeruginosa* nachgewiesen (DAVIES et al. 1989). OTTE et al. (1996) dagegen konnten bei *Alcaligenes faecalis* TUD unter sauerstofflimitierten Verhältnissen im Vergleich zu anaeroben Bedingungen nur 12,5 % der Nitritreduktase-Aktivität messen. Insgesamt ist der Beitrag der aeroben Denitrifikation zum Stickstoffzyklus von untergeordneter Bedeutung (JETTEN et al. 1997). Denkbar ist jedoch, daß die Co-Respiration von Nitrat und Sauerstoff für die denitrifizierenden Bakterien einen Vorteil in Habitaten mit alternierenden Sauerstoffkonzentrationen, wie dem Interstitial von Fließgewässern, darstellt (CARTER et al. 1995).

Aufgrund der Tag-Nachtschwankungen der Sauerstoffkonzentration in der fließenden Welle und der gemessenen Differenz der Sauerstoffkonzentration zwischen der fließenden Welle und dem Interstitialwasser ist von alternierenden Sauerstoffkonzentrationen im Interstitial der Lahn auszugehen, die neben einer aeroben Denitrifikation auch eine anaerobe Denitrifikation ermöglichen. Es ist davon auszugehen, daß die Co-Respiration von Nitrat (Denitrifikation) und Sauerstoff (Atmung) insbesondere die im Interstitial der Lahn dominierend nachgewiesenen denitrifizierenden Bakterien der Gattung *Pseudomonas* gegenüber anderen, nicht denitrifizierenden Bakterien begünstigt.

5.3 Detektierung des Nitritreduktasetyps

Die für die Denitrifikation notwendigen Enzyme sind nicht konstitutiv vorhanden, d. h. sie sind nicht ständig im Enzympool des jeweiligen Bakteriums präsent (TIEDJE 1988). Neben dem physiologischen Nachweis der Nitritreduktion durch die isolierten Bakterien - Reinkubation der Reinkulturen in Durham-Röhrchen (vgl. Kapitel 3.4) - wurde zusätzlich mittels DNA-Amplifizierung der Nitritreduktasetyp zur weiteren Charakterisierung der isolierten denitrifizierenden Bakterien ermittelt. Mit dieser Methode kann - ausgehend von einer direkten DNA-Extraktion - der Anteil der potentiell zur Denitrifikation fähigen Bakterien in einer Probe nachgewiesen werden (HALLIN & LINDGREN 1999, NOGALES et al. 2002). Ob diese Bakterien auch in situ denitrifizieren, ist mit dieser Methode aber nicht feststellbar.

Bei 90 % der untersuchten denitrifizierenden Bakterien aus der Lahn wurde die cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktase (*NirS*) detektiert. Nur bei vier Isolaten konnte der kupferhaltige Typ der Nitritreduktase (*NirK*) nachgewiesen werden. Sie stammen nicht aus Interstitialwasserproben, sondern aus Wasserproben der fließenden Welle flüßaufwärts des Kläranlagenablaufes und aus dem Klärwasser. Diese Bakterien wurden als *Ochrobactrum anthropi*, *Alcaligenes spec.* bzw. *faecalis* und *Serratia spec.* identifiziert. Dieses Ergebnis, daß die kupferhaltige Nitritreduktase unter den isolierten denitrifizierenden Bakterien weniger verbreitet ist, deckt sich mit anderen Untersuchungen: Im Zuge von immunologischen Untersuchungen von COYNE et al. (1989) trat die cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktase (*NirS*) bei 64 - 92% aller untersuchten Isolate auf und TIEDJE (1994) konnte bei 1/3 aller charakterisierten Denitrifikanten den kupferhaltigen Nitritreduktasetyp und bei 2/3 den cytochrom-*cd*₁-haltigen Nitritreduktasetyp feststellen.

5.4 Produktion von antibiotisch wirksamen Stoffen

Bei fast allen untersuchten fluoreszierenden Bakterien der Gattung *Pseudomonas* wurde eine Hemmung des Wachstums von Referenzbakterien beobachtet. Diese Hemmwirkung läßt auf die Produktion und Sezernierung von antibiotisch wirksamen Stoffen durch die fluoreszierenden *Pseudomonas* Stämme schließen, ein Phänomen, das schon seit längerem bekannt ist (LEISINGER & MARGRAFF 1979). Ob allerdings unter den Milieubedingungen des hyporheischen Interstitials ein Wachstumsvorteil durch die Produktion antibiotisch wirksamer Stoffe erzielt werden kann, ist noch nicht bekannt.

Die verschiedenen untersuchten fluoreszierenden Pseudomonaden unterschieden sich in der Hemmwirkung auf Referenzbakterien und damit bezüglich ihrer Antibiotikaproduktion und Sezernierung voneinander: Zwei ausschließlich im Transekt I isolierte *Pseudomonas fluorescens* Stämme zeigen eine deutlich Übereinstimmung in der Wirkungsweise der antibiotisch wirksamen Substanzen. Von anderen als *P. fluorescens* identifizierten Isolaten lassen sie sich nicht nur durch differierende physiologische Eigenschaften unterscheiden, sondern sie werden auch aufgrund der Restriktionsfragmentlängen ihrer 16S rDNA von den anderen *P. fluorescens* Stämmen abgegrenzt. Dies weist auf eine starke Heterogenität innerhalb der Art *Ps. fluorescens* hinsichtlich der physiologischen wie auch der genotypischen Eigenschaften hin, die sich auch in den unterschiedlichen Hemmwirkungen der *Ps. fluorescens* Spezies der ARDRA-Gruppen 7, 12, 19 und 21 zeigte. Die einzelnen Isolate konnten aufgrund ihrer divergierende Wirkungen auf die Referenzbakterien unterschieden werden.

Bei den fluoreszierenden *Pseudomonas aeruginosa* Stämmen der ARDRA-Gruppe 22 traten bezüglich der Produktion antibiotisch wirksamer Stoffe keine starken Divergenzen auf. Diese Homogenität innerhalb der Art *Ps. aeruginosa* konnte anhand physiologischer Merkmale

(MicroLog-System, Antibiotikaproduktion) und genotypischer Charakteristika (ARDRA-Analyse, Sequenzerggebnisse) bestätigt werden.

5.5 Isolierung und räumliche Verteilung der denitrifizierenden Bakterien

Die Untersuchung der denitrifizierenden Bakterien beschränkte sich auf kultivierbare Bakterien. Laut LEFF et al. (1995) sind weniger als 1 % der unter dem Mikroskop noch sichtbaren Bakterien kultivierbar, wobei in Böden generell ca. 0,1 bis 5 % der gesamten kultivierbaren bakteriellen Bodenpopulation Denitrifikanten sind (TIEDJE 1988). Zusätzlich wird durch die Wahl der Medien und Inkubationsbedingungen wiederum eine begrenzte Auswahl der denitrifizierenden Bakterien selektiert und bestimmte Gattungen favorisiert. Durch die gewählte Isolierungsmethode wurden insbesondere sogenannte R-Strategen unter den denitrifizierenden Bakterien bevorzugt, die eine hohe Wachstumsrate bei hoher Nährstoffkonzentration aufweisen, wogegen denitrifizierende K-Strategen mit häufig niedrigen Wachstumsraten mit der gewählten Methode nur unzureichend erfaßt wurden.

Die Anreicherung von denitrifizierenden Bakterien in einer Nitrit- statt in einer Nitratlösung hat nach ALEF (1991) den Vorteil, daß viele der nicht denitrifizierenden Bakterien ab einer Konzentration von 0,1 % $\text{NO}_2\text{-N}$ gehemmt werden, wovon allerdings fermentative Bakterien nicht betroffen sind (COLE & BROWN 1980). So konnte das Wachstum vieler falsch-positiver Bakterien durch eine Inkubation in Nitritlösung verhindert werden. Auf die zusätzliche Zugabe von Zuckern in die Nitrat- bzw. Nitritlösung wurde verzichtet, da diese eine durch Gärprozesse verursachte Gasproduktion zur Folge haben könnte. Die Aminosäuren aus Pepton werden nur zu wenigen C-Körpern abgebaut, die nicht vergoren werden können, demnach auch nicht zur Gasproduktion beitragen.

Generell ist anzumerken, daß die Methode zur Isolierung denitrifizierender Bakterien erstmalig im Juli 1999 angewendet wurde, so daß die vergleichsweise auffällig geringe Anzahl von denitrifizierenden Bakterien bei den ersten beiden Probenahmeterminen im Juli und September 1999 auf methodische Anfangsschwierigkeiten hinweist. Grundsätzlich ist bei der Verbreitung denitrifizierender Bakterien zu beachten, daß diese zumeist einen Bestandteil der aeroben heterotrophen Bakterienpopulationen darstellen. Ob es zu einer Anreicherung bzw. zu einer restriktiven Verbreitung der Denitrifikanten kommt, hängt von den Sauerstoffverhältnissen, dem Angebot an organischen Kohlenstoffverbindungen und der Verfügbarkeit von Nitrat-N ab (SCHMIDER 1985). Eine zunehmende Belastung des Fließgewässers durch kommunale Abwässer mit hohen Stickstoffkonzentrationen muß demzufolge nicht zwangsläufig zu einer bevorzugten Verbreitung von denitrifizierenden Bakterien führen.

5.5.1 Räumliche Verteilung der denitrifizierenden Bakterien

In dieser Untersuchung wurden insgesamt 95 denitrifizierende Bakterienstämme aus dem Interstitial und dem Oberflächenwasser der Lahn sowie aus dem Klärwasser isoliert. Dabei konnten Denitrifikanten sowohl in den oberen (5 und 15 cm) wie auch in den tieferen (25 und 45 cm) Sedimentschichten des hyporheischen Interstitials nachgewiesen werden.

Liegen in Waldböden hohe Nitratkonzentrationen vor, so ist die Verteilung der Denitrifikanten abhängig von der Bodentiefe und wird nicht durch die Nitratkonzentration bestimmt (MERGEL et al. 2001). Dagegen unterliegt die Denitrifikation in stickstoffarmen Flüssen einer Limitierung aufgrund der Verfügbarkeit von Stickstoff (HOLMES et al. 1996). Ebenso stellt in Seesedimenten die Verfügbarkeit des Nitrats den limitierenden Faktor für die Denitrifikation dar (ESTEVEZ et al. 2001). Aufgrund der durchgehend hohen Nitratkonzentration sowohl des Oberflächenwassers (durchschnittlich 1,6 - 3,3 mg $\text{NO}_3\text{-N l}^{-1}$) wie auch des Interstitialwassers (durchschnittlich 1,5 - 5,1 mg $\text{NO}_3\text{-N l}^{-1}$) trat bezüglich der Verfügbarkeit von Nitrat keine starke Variabilität auf, so daß eine Determinierung der Verteilung von denitrifizierenden Bakterien durch die Nitratkonzentration für die Lahn unwahrscheinlich ist.

Während hoher Nitratkonzentrationen im Klärwasser wurden denitrifizierenden Bakterien überwiegend aus Wasserproben von flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Probenahmestellen isoliert, was für eine Einflußnahme der hohen Nitratkonzentration im Klärwasser auf die denitrifizierenden Bakterien spräche. Es wurde jedoch keine signifikante Veränderung in der Nitratkonzentration der flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Probenahmestellen festgestellt. Die Möglichkeit einer erhöhten Umsetzung von Nitrat durch denitrifizierende Bakterien ist für diesen untersuchten Interstitialbereich nicht anzunehmen, da an diesen Probenahmestellen die Denitrationspotenzen keine erhöhten Werte aufwiesen. Gleiches zeigte sich im Zuge der Flutung des Schönungsteiches in unmittelbarer Nähe des Transektes I und III. Die zu diesem Zeitpunkt temporär stark erhöhten Nitratkonzentrationen in diesen Interstitialbereichen schlugen sich weder in erhöhten Denitrationspotenzen noch in einer verstärkten Isolierung denitrifizierender Bakterien nieder, so daß davon ausgegangen werden kann, daß temporär erhöhte Nitratkonzentrationen keinen nachhaltigen Einfluß auf die denitrifizierende Bakterienpopulation in den untersuchten Interstitialbereichen hatten.

Aufgrund dieser Ergebnisse kann nicht von einer Determinierung der Verbreitung der Denitrifikanten im Interstitial der Lahn durch die Nitratkonzentration ausgegangen werden.

5.5.2 Einfluß von Ex- und Infiltrationsbereichen auf die Verbreitung von denitrifizierenden Bakterien

Transekt I, V und VII liegen jeweils am Beginn einer Rifflestruktur, die durch einen Infiltrationsbereich (downwelling) mit einem verstärkten Einstrom von Oberflächenwasser in den Interstitialbereich gekennzeichnet ist. Demgegenüber liegt Transekt III am Ende einer Rifflestruktur, das als Exfiltrationsbereich (upwelling) angesehen werden kann, in dem verstärkt Interstitialwasser aus dem Sediment ins Oberflächenwasser ausströmt (SAENGER & LENK 2000).

Auch wenn die Denitrationspotenz keine erhöhten Werte aufwies, konnten im Vergleich zu dem vom Klärwasser unbeeinflussten Infiltrationsbereich (Transekt I) vergleichsweise viele denitrifizierende Bakterien aus den Wasserproben des Exfiltrationsbereiches (Transekt III) isoliert werden. Die deutlich erniedrigte Sauerstoffkonzentration im Exfiltrationsbereich könnte dieses verstärkte Vorkommen erklären.

Die Verbreitungspräferenz der denitrifizierenden Bakterien in den untersuchten Infiltrationsbereichen liegt in den Transekten I und VII in den tieferen Sedimentschichten, während im Transekt V vergleichsweise viele denitrifizierende Bakterien aus den oberen untersuchten Sedimentschichten isoliert wurden. Dies könnte für eine verstärkte Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation sprechen, da diese neben dem Festsetzen in Biomasse durch periphytische Algen für eine Ammoniumabnahme in der oberen Sedimentschicht verantwortlich gemacht wird (FISCHER et al. zur Publikation angenommen). Jedoch zeigen die hohen gemessenen Nitritwerte, daß in diesem Interstitialbereich eine Kopplung der beiden Prozesse nicht wahrscheinlich ist und die gefundene Verbreitungspräferenz in diesem Transekt nicht damit in Verbindung gebracht werden kann.

Demzufolge hat der Einstrom des Klärwassers zumindest im Infiltrationsbereich des Transektes V einen stärkeren Einfluß auf die Verbreitung der denitrifizierenden Bakterien als die hydraulischen Verhältnisse dieses Infiltrationsbereiches, was allerdings nicht mit der erhöhten Nitratkonzentration im Klärwasser im Untersuchungsjahr 2000 korreliert, sondern durch einen erhöhten Nährstoffeintrag durch das Klärwasser begründet ist.

In Transekt VII konnte trotz des Einstromes von Klärwasser nur eine geringe Anzahl denitrifizierender Bakterien aus den Wasserproben isoliert werden, obwohl in diesem Transekt erhöhte Denitrationspotenzen in Juli und September 1999 gemessen wurden. Demzufolge ist der Anteil der Nitratreduzierer in diesem Transekt vergleichsweise hoch, da in die Bestimmung der Denitrationspotenz auch nitratreduzierende Bakterien, die nur Nitrat zu Nitrit reduzieren, miteinbezogen werden (RHEINHEIMER 1965). Auch das Vorkommen von mit der gewählten Kultivierungsmethode nicht detektierbaren denitrifizierenden Bakterien wird angenommen.

Die Verbreitung von denitrifizierenden Bakterien im Interstitial der Lahn ist nur eingeschränkt auf Ex- und Infiltrationsphänomene zurückzuführen, jedoch zeigte sich, daß für das Transekt V der Einfluß des Klärwassers auf die Verbreitung der denitrifizierenden Bakterien von größerer Relevanz ist.

5.6 Zeitliche Variabilität der denitrifizierenden Bakterien

Die ARDRA-Methode, die zum Screening der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien aus dem hyporheischen Interstitial der Lahn verwendet wurde, läßt eine Einteilung von verschiedensten phylogenetischen Gruppen aufgrund der Restriktionsfragmentlängen ihrer 16S rDNA zu. Damit können Häufigkeit und Ähnlichkeit von verschiedenen phylogenetischen Gruppen analysiert werden (MOYER et al. 1996, LIU et al. 1997). Basierend auf dieser Methode erlaubt die hohe Reproduzierbarkeit von 96 % eindeutige Aussagen über die genetische Variabilität von phylogenetisch unterschiedlichen Bakterien (HEYNDRICKX et al. 1996). Sie wurde erfolgreich zur Untersuchung von Bakteriengemeinschaften im marinen Bereich (ACINAS et al. 1997, EILERS et al. 2000), in Seen (BOSSHARD et al. 2000), in heißem Kompost (DEES & GHIORSE 2001), in Rhizosphären (REDECKER et al. 1999), in Ackerböden (FELSKE et al. 1999, CHENEY et al. 2000) und im Fließbettreaktor (MASSOL-DEYA et al. 1997) angewendet.

Auch wenn die kultivierbaren Denitrifikanten die natürliche denitrifizierende Bakteriengemeinschaft nicht vollständig widerspiegeln kann, wurde mit der ARDRA-Methode eine hohe Diversität von denitrifizierenden Bakterien im hyporheischen Interstitial und dem Oberflächenwasser der Lahn nachgewiesen. Es zeigte sich, daß die Einleitung von stickstoffhaltigem Klärwasser in die Lahn nicht zu einer generellen Verarmung der Diversität der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien führte. Gerade die Abwasserzonen oder polysaprobien Zonen von Gewässern zeichnen sich durch Reichtum an Bakterien und bakterienfressenden Ciliaten und Flagellaten aus (KLEE 1985). Die Detektierung von denitrifizierenden Stämmen der Familie *Comamonadaceae* ausschließlich im Klärwasser und in Wasserproben von flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Probenahmestellen bestätigt eine Erweiterung des Bakterienspektrums bezüglich der denitrifizierenden Bakterien innerhalb der Abwasserzone.

Die durch die ARDRA-Methode ermittelten 24 ARDRA-Gruppen zeigen eine ähnlich hohe Diversität kultivierbarer Denitrifikanten, wie sie mit derselben Methode auch schon für unterschiedliche Böden beschrieben wurde (CHENEY et al. 2000). Eine weite Verbreitung der kultivierbaren Denitrifikanten auf verschiedene Lebensräume (GAMBLE et al. 1977, ZUMFT 1992) wurde mit der Isolierung von denitrifizierenden Bakterien aus der fließenden Welle, dem

Klärwasser und aus den verschiedenen untersuchten Sedimenttiefen des hyporheischen Interstitials der Lahn auch in dieser Untersuchung nachgewiesen.

Ein Vergleich der detektierten ARDRA-Gruppen zeigte einerseits sowohl große Unterschiede innerhalb einer ARDRA-Gruppe, andererseits aber auch große Ähnlichkeiten zwischen verschiedenen ARDRA-Gruppen. Die Einordnung von *Bacillus cereus* Stämmen in unterschiedliche ARDRA-Gruppen weist darauf hin, daß die ARDRA-Analyse in diesem Fall zwischen Stämmen der gleichen Art differenziert, während die Einordnung der verschiedenen *Pseudomonas* Spezies in eine ARDRA-Gruppe verdeutlicht, daß die Differenzierung durch die ARDRA-Methode innerhalb der Gattungsbezeichnung *Pseudomonas* nicht ausreichend ist. Die ARDRA-Methode ermöglicht eine Differenzierung zumindest bis auf Gattungsniveau (FOX et al. 1992), entwickelt jedoch keine ausreichende taxonomische Tiefe, um innerhalb der Gattung *Pseudomonas* zu unterscheiden.

Die Konstanz einer mikrobiellen Biofilmpopulation - unter anderem auch von denitrifizierenden Bakterienstämmen - wurde von MASSOL-DEYA et al. (1997) in einem Fließbettreaktor über mehrere Monate mit Hilfe der ARDRA-Analyse beobachtet. WISE et al. (1996) konnten einen ähnlichen Befund für das Fließgewässerbakterium *Burkholderia cepacia* nachweisen, indem sie an einer Probenahmestelle über einen Zeitraum von einem Monat die genetische Stabilität einer *Burkholderia cepacia* Population untersuchten. Zumindest für den untersuchten Zeitraum wurde eine genetische Stabilität dieser Population nachgewiesen. Im Vergleich zu der vorherigen Studie über die räumliche Variabilität einer *Burkholderia cepacia* Population kommen sie zu dem Schluß, daß die räumliche Variabilität innerhalb dieser Population höher ist als die zeitliche (WISE et al. 1995, WISE et al. 1996).

In dieser Untersuchung wurde eine Persistenz von denitrifizierenden Stämmen über einen langen Zeitraum nachgewiesen. So wurde mit Hilfe der ARDRA-Methode festgestellt, daß bestimmte denitrifizierende Bakterien über einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren im hyporheischen Interstitial der Lahn präsent sind.

Es muß davon ausgegangen werden, daß die Bedingungen im Oberflächenwasser und damit korrespondierend die Bedingungen im hyporheischen Interstitial für denitrifizierende Bakterien in diesem Zeitraum starken Variationen unterliegen. So führen Hochwasserereignisse der Lahn zu einer regelmäßigen Umlagerung der oberen Kiesschicht bis in eine Sedimenttiefen von 20 cm (SAENGER 2000), wodurch feinputikuläres Material ausgeschwemmt wird und Biofilme auf der Sedimentoberfläche (äußere Kolmation) und im Interstitial (innere Kolmation) abgetragen werden. Kolmationsprozesse rufen eine Reduktion des Porenvolumens und eine Verfestigung des Flußsediments hervor, wodurch die Durchflußgeschwindigkeit erniedrigt und damit die

Verweildauer des Interstitialwassers in Sedimentschichten mit sauerstoffzehrenden Prozessen erhöht wird (GUTKNECHT et al. 1998, SENGSCHMITT et al. 1999).

Ein vermehrter Aufwuchs von periphytischen Algen auf könnte in der Lahn während der Wachstumsperiode zu einer biogenen äußeren Kolmation besonders des unmittelbar in der Abwasserfahne gelegenen Transektes V führen, wodurch der Sauerstoffhaushalt in diesem Interstitialbereich stärkeren Tag-Nacht-Schwankungen unterliegen würde (LENK & SAENGER 2000, HÜBNER 2003, FISCHER et al. zur Publikation angenommen). IBISCH et al. (zur Publikation angenommen) konnten zwar äußere und innere Kolmationsphänomene für die Lahn nachweisen, allerdings wurden keine deutlich erhöhte Algendichte auf der Sedimentoberfläche der flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Probenahmestellen im Vergleich zu den flußaufwärts gelegenen Probestellen nachgewiesen (IBISCH, pers. Mitteilung).

Der Einfluß von Dekolmations- und Kolmationsprozessen auf die Entwicklung von Biofilmen im hyporheischen Interstitial ist auch in Hinsicht auf die denitrifizierenden Bakterien von zentraler Bedeutung. Den vorliegenden Daten zufolge werden diese temporären, regelmäßig wiederkehrenden Ereignisse von den weit verbreiteten denitrifizierenden Bakterien im Interstitial der Lahn durch ein hohes Wiederbesiedlung- bzw. Persistenzpotential ausgeglichen.

Ein Beispiel für dieses Potential zeigen die als *Bacillus cereus* identifizierte Isolate der ARDRA-Gruppen 17 (Großgruppe C) und 18 (Großgruppe B). Sie wurden in allen Probenahmejahren aus der Lahn isoliert. *B. cereus* ist ein weit verbreitetes, Gram positives, fakultativ anaerobes Bakterium, das als Sporenbildner eine große Widerstandsfähigkeit gegenüber ungünstigen Umweltbedingungen hat. Sporen sind als Dauer- und Überlebensformen der Bakterienzelle im Vergleich zu der vegetativen Form gegen Austrocknung, Hitze, Chemikalien und Strahlen sehr widerstandsfähig (WEGSCHEIDER 2004). Es verwundert also nicht, daß dieses Bakterium ein hohes Potential zur Wiederbesiedlung von Habitaten mit stark schwankenden Umweltbedingungen hat.

Als weiteres Beispiel für diese Permanenz im Habitat sind die Isolate der ARDRA-Gruppe 19 anzusehen, bei denen es sich überwiegend um Pseudomonaden handelt. Sie konnten in allen Probenahmejahren aus den Oberflächen- und Interstitialwasserproben isoliert werden. Insbesondere die Art *Pseudomonas fluorescens* wurde in dieser Untersuchung als dominierender, kultivierbarer Denitrifikant aus dem Klär-, Oberflächen- und Interstitialwasser der Lahn charakterisiert. Allgemein gelten die Bakterien der Gattung *Pseudomonas* als weit verbreitet und werden aufgrund der Vielseitigkeit bezüglich ihres Metabolismus biotechnologisch - besonders zur Biodegradation - genutzt (HOCH 1999).

Die Isolate der ARDRA-Gruppe 22, die überwiegend als *Pseudomonas aeruginosa* identifiziert wurden, konnten nur in den Wasserproben von 1999 und 2000 detektiert werden, obwohl dieses

Bakterium im Allgemeinen ähnlich wie *Ps. fluorescens* eine weite Verbreitung zeigt. *Ps. aeruginosa* gilt als dominierender human- und tierpathogener Pseudomonade (PALLERONI 1992). Das weit verbreitete Vorkommen dieses Bakteriums im klinischen (fakultativ pathogen) aber auch im aquatischen (meist apathogen) Bereich ist seit langem bekannt. Es wird als Erreger von Hospitalismus-Erkrankungen, Erkrankungen der Haut und des äußeren Gehörganges angesehen und kann bei oraler Aufnahme eine leichte Form der Lebensmittelvergiftung hervorrufen (JORDAN 2004).

In den Probenahmejahren vor den baulichen Veränderungen in der Kläranlage wurden sowohl *Ps. fluorescens* als auch *Ps. aeruginosa* aus den Interstitialwasserproben isoliert. Mit dem Absinken der Ammonium- und Nitratkonzentration im Klärwasser im Jahr 2000 scheint eine Substituierung von *Ps. aeruginosa* durch *Ps. fluorescens* im darauffolgenden Untersuchungsjahr erfolgt zu sein. Dieses Ergebnis stimmt mit MPN-Analysen (most probable number) von denitrifizierenden Bakterien aus belasteten wie unbelasteten Biotopen überein, die besagen, daß mit einer abnehmenden Verschmutzung die Häufigkeit von *Ps. aeruginosa* abnimmt, die Häufigkeit von *Ps. fluorescens* dagegen zunimmt (SCHMIDER 1985). Eine Verschiebung bezüglich der Häufigkeit des Auftretens von *Ps. aeruginosa* zu *Ps. fluorescens* konnte bestätigt werden. Da in dieser Untersuchung *Ps. aeruginosa* im Probenahmejahr 2001 generell nicht mehr detektiert werden konnte, kann dieses Phänomen nicht unmittelbar auf die baulichen Veränderungen in der Kläranlage und die daraus resultierende verminderte Stickstofffracht des Klärwassers zurückgeführt werden. Der ausbleibende Nachweis von *Ps. aeruginosa* könnte ein Hinweis auf den Erfolg der in den vergangenen Jahren unternommenen Anstrengungen zur Verbesserung der Wasserqualität der Lahn sein.

Andere Denitrifikanten wie *Ochrobactrum anthropi* und ein Stamm der Gattung *Serratia* konnten nur temporär im Oberflächenwasser der Lahn detektiert werden. Bei diesen Bakterien ist eigentlich davon auszugehen, daß sie zur permanenten mikrobiellen Denitrifikantenpopulation der Lahn gehören, da beispielsweise *Serratia liquefaciens* als einer der häufigsten aus dem Sediment und der fließenden Welle von Fließgewässern isolierten Denitrifikanten an oligotrophen bis mesotrophen Standorten beschrieben wird (HOCH 1999). Scheinbar sind diese Bakterien gegenüber anderen denitrifizierenden Bakterien nur wenig konkurrenzfähig, so daß sie in Anreicherungskulturen z.B. mit fluoreszierenden Pseudomonaden durch Sekretion antibiotisch wirksamer Stoffe im Wachstum gehemmt werden und nicht detektiert werden können (vgl. Kapitel 5.4).

5.7 Räumliche Verbreitung der denitrifizierenden Bakterien

Anhand der räumlichen Verbreitung der isolierten denitrifizierenden Bakterien konnten die unterschiedlichen Einflüsse der verschiedenen Habitatbedingungen, aber auch der Einfluß des Klärwassers auf die kultivierbaren Denitrifikanten nachgewiesen werden.

Anzumerken ist, daß die Detektierung einer Belastung mit kommunalen Abwässern mit Hilfe verschiedener denitrifizierender Bakterien erfolgen kann, aber nur bedingt auf ihre Fähigkeit zur Denitrifikation zurückzuführen ist. In erster Linie sind Habitatansprüche für ihre Verbreitung entscheidend, wobei aber die Fähigkeit zur Denitrifikation unter alternierenden Sauerstoffkonzentrationen Selektionsvorteile gegenüber anderen nicht denitrifizierenden Bakterien bringt.

Des weiteren muß darauf hingewiesen werden, daß Studien zur genetischen Diversität eines Fließgewässerbakteriums zeigten, daß Populationen von *Burkholderia cepacia* an verschiedenen Probenahmestellen desselben Fließgewässers unterschiedliche Genotypen ausbilden (WISE et al. 1995), während sich der Einfluß der Zeit in geringerem Maße auf die genetische Variabilität dieser Populationen auswirkte (WISE et al. 1996). So ist der Einfluß der räumlichen Distanz und der damit verbundenen Habitatunterschiede auf die untersuchten denitrifizierenden Genotypen stärker zu gewichten als der zeitliche Faktor.

5.7.1 Ausschließlich flußaufwärts des Kläranlagenablaufes isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe A)

Gattung *Serratia* (γ -Proteobakterium; kupferhaltige Nitritreduktase)

Das Ergebnis der Sequenzanalyse zeigte für die 16S rDNA-Region dieses Isolates nur eine 90 %ige Ähnlichkeit mit der Sequenz von *Serratia fonticola*, einem Bakterium, das u.a. von SAKANO et al. (2002) aus einem Klärreaktor zur Trinkwasseraufbereitung isoliert wurde. Mit dem Microlog-System konnte keine eindeutige Identifizierung dieses Isolates erreicht werden, wobei die physiologische Charakterisierung einen Hinweis auf *Serratia ficaria* gab. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von LACKO et al. (2003) konnte der kupferhaltige Nitritreduktasetyp nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Ergebnisse wurde das Isolat der Gattung *Serratia* zugeordnet. Eine eindeutige Bestimmung der Art war mit beiden Identifikationsmethoden nicht möglich. Man muß bei der Bestimmung dieser Gattung mit dem MicroLog-System mit Fehlern rechnen, da einige Stämme der Gattung *Serratia* (wie auch die meisten Stämme der Gattung *Klebsiella* sowie einige Stämme der Gattungen *Enterobacter* und *Salmonella*) eine Polysaccharidkapsel absondern, die als Kohlenstoffquelle wiederverwertet werden und damit zu einer falschen oder zu keiner eindeutigen Identifizierung führen kann (HOCH 1999). *Serratia* Spezies sind in der Lage, unter anoxischen

Bedingungen zu denitrifizieren und gleichzeitig Phosphat zu akkumulieren, wodurch Bakterien der Gattung *Serratia* in Kläranlagen sowohl in Klärbecken zur Phosphatelimination als auch in solchen zur Stickstoffelimination gefunden werden (LACKO et al. 2003). *Serratia liquefaciens* Stämme gelten zusammen mit fluoreszierenden Pseudomonaden und Bakterien der Gattung *Enterobacter* als häufigste Denitrifikanten an oligotrophen bis mesotrophen Standorten, die aus dem Sediment und der fließenden Welle von Fließgewässern isoliert werden können (HOCH 1999). Die Detektierung dieses Bakteriums im flußaufwärts des Kläranlagenablaufes entnommenen Oberflächenwasser der Lahn weist auf den oligotrophen bis mesotrophen Nährstoffzustand der Lahn noch vor der Klärwassereinleitung hin.

***Ochrobactrum anthropi* (α -Proteobakterium; kupferhaltige Nitritreduktase)**

Für das als *Ochrobactrum anthropi* mittels der Sequenzanalyse identifizierte Isolat S99-57FWV wurde in Übereinstimmung mit der Literatur der kupferhaltige Nitritreduktasetyp nachgewiesen (METZ et al. 2003).

O. anthropi konnte nur einmalig im September 1999 aus der fließenden Welle flußaufwärts des Kläranlagenablaufes isoliert werden und trat nicht in den Interstitialwasserproben auf. Von Bedeutung ist diese Spezies besonders im klinischen Bereich, da sie für den Menschen pathogen sein kann. Aber *O. anthropi* wird auch als weit verbreitetes Boden- und Klärschlamm-Bakterium beschrieben, das in der Lage ist, Verunreinigungen abzubauen (SWINGS et al. 1992, SCHLOTTER et al. 2000). So konnte *O. anthropi* mit Hilfe von Xenobiotika-Medien (Anthracen, 4-Chlorsalicylsäure und o-Xylol) aus industriell extrem belasteten Fließgewässern isoliert werden, was aufgrund einer hohen Vielseitigkeit bezüglich der Nährstoffquellen auf ein hohes Potential zur flexiblen Anpassung an nährstoffreiche Bedingungen bzw. an wechselnde Belastungen hinweist (HOCH 1999). Ein aus einer Kläranlage isoliertes, als *O. anthropi* identifiziertes Bakterium, wird als sehr effizient denitrifizierendes Bakterium beschrieben und ist in der Lage, simultan zu denitrifizieren und Phosphat zu akkumulieren (MERZOUKI et al. 1999). Eine Besiedlung des Interstitials der Lahn durch *O. anthropi* wurde trotz des nährstoffreichen Klärwassereintrages nicht nachgewiesen, jedoch scheint eine Einschwemmung dieses Bakteriums aus einer Kläranlage bzw. aus diffusen Quellen (z.B. landwirtschaftliche Nutzflächen) flußaufwärts der Untersuchungsstrecke sehr wahrscheinlich. So werden beispielsweise Ammonium und Methylammonium von einem Dünger abbauendem Stamm der Gattung *Ochrobactrum* aufgenommen (EWEN et al. 2000). AVRAHAMI et al. (2002) konnten feststellen, daß durch Zugabe von Ammonium zu landwirtschaftlich bewirtschafteten Böden eine Verschiebung in der denitrifizierenden Bakterienpopulation u.a. zu Bakterien der Gattung

Ochrobactrum verursacht werden kann, was zu einem gehäuften Auftreten dieser Art in gedüngten Böden führt.

Wie bei der isolierten *Serratia* Spezies weist das Auftreten von *Ochrobactrum anthropi* im Oberflächenwasser der Lahn auf Nährstoffeinträge und Einschwemmungen durch flußaufwärts des Untersuchungsgebietes gelegene Kläranlagen bzw. diffuse Quellen hin, wobei die nächstgelegenen Kläranlage Dauphetal-Elmshausen in ca. 10 km Entfernung flußaufwärts von dem hier untersuchten Lahnabschnitt liegt, so daß kein unmittelbarer Einfluß dieses Klärwassers auf die Transekte I und III besteht.

5.7.2 Ausschließlich aus dem Klärwasser isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe B)

Gattung *Acinetobacter* (γ -Proteobakterien, cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktase)

Für dieses Isolat der Gattung *Acinetobacter* konnte der cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktasetyp nachgewiesen werden. Eine gegensätzliche Identifizierung dieses Isolates zeigten das Ergebnis der Sequenzanalyse (*Acinetobacter* spec.) und das des MicroLog-Systems (*Pseudomonas pseudoalcaligenes*). In einem solchen Fall wurde den Sequenzergebnissen ein höherer Stellenwert eingeräumt, da eine Fehlidentifizierung im MicroLog-System durch eine Anreicherung unterschiedlicher Stämme nicht ausgeschlossen werden kann.

Acinetobacter konnte nur einmalig im Mai 2000 und ausschließlich im Klärwasser nachgewiesen werden. Arten dieser Gattung wurden in erster Linie mit der erhöhten biologischen Phosphateliminierung in Kläranlagen in Verbindung gebracht (MAURER 1996). Jedoch zeigten WAGNER et al. (1994), daß diese für die Phosphateliminierung in Kläranlagen nur eine untergeordnete Rolle spielen. *Acinetobacter calcoaceticus* gilt allgemein als in Böden und Gewässern weit verbreitet, wobei ein gehäuftes Vorkommen in belasteten Habitaten u. a. aufgrund der Fähigkeit zur Veratmung von aliphatischen und aromatischen Kohlenstoffen angenommen wird (LEMKE et al. 1997, LEMKE & LEFF 1999). Eine Bevorzugung von fließendem Wasser ist laut SCHMIDER (1985) für denitrifizierende *Acinetobacter* bzw. *Moraxella* Spezies gegeben, da sie im Zulauf und Vorlaufbecken wie auch im Wasserkörper von Böden neben *Pseudomonas* und *Aeromonas* Arten dominieren, jedoch in Böden nicht dominant vorkommen. Eine Infiltration und Persistenz im Interstitial flußabwärts des Kläranlagenablaufes von Bakterien der Gattung *Acinetobacter* wurde in dieser Untersuchung nicht festgestellt.

Gattung *Alcaligenes* (β -Proteobakterien; kupferhaltige Nitritreduktase)

Zwei weitere Isolate, die ausschließlich aus dem Klärwasser isoliert wurden, konnten als *Alcaligenes* spec. und *Alcaligenes faecalis* identifiziert werden. Mittels des MicroLog-Systems

wurde die Identifizierung von *Alcaligenes faecalis* bestätigt. Für beide Isolate konnte der kupferhaltige Nitritreduktasetyp nachgewiesen werden. *Alcaligenes faecalis* ist ein weitverbreitetes Bakterium in Böden, Gewässern und Kläranlagen (GAMBLE et al. 1977, MANZ et al. 1994) und ein heterotropher Nitrifikant und Denitrifikant (PAPEN et al. 1989, ROBERTSON et al. 1995). Denitrifizierende Arten der Gattung *Alcaligenes* treten häufig bei zunehmender organischer und anorganischer Belastung wie auch in Belebtschlammbecken von Kläranlagen auf (HOCH 1999). Bei *Alcaligenes faecalis* TUD konnte die Fähigkeit zur aeroben Denitrifikation durch den Nachweis einer Nitritreduktase-Aktivität verifiziert werden (ROBERTSON & KUENEN 1984, OTTE et al. 1996).

Die Bakterien der Gattung *Alcaligenes* und *Acinetobacter* wurden ausschließlich im Klärwasser nachgewiesen. Die Bakterien dieser Gattungen werden zwar durch das Klärwasser in die Lahn eingeschwemmt, jedoch sind sie nach den hier vorliegenden Ergebnissen vermutlich nicht in der Lage, im Interstitial der Lahn zu persistieren. Dieses Ergebnis steht in deutlichem Gegensatz zu den Ergebnissen von HALDA-ALIJA & JOHNSTON (1999), die Bakterien der Gattungen *Alcaligenes* und *Acinetobacter* im hyporheischen Interstitial eines unbelasteten Fließgewässers nachwiesen. Allerdings wurden die *Alcaligenes* Spezies nur im Sommer detektiert, während im Winter keine *Alcaligenes* Spezies und nur eine reduzierte Anzahl von *Acinetobacter* Spezies im Interstitial auftraten.

Scheinbar sind die höheren Temperaturen und die stete hohe Nährstoffversorgung im Klärwasser wichtig für die Verbreitung dieser Arten, was erklärt, daß keine Infiltration und Persistenz im Interstitial in der vorliegenden Untersuchung festgestellt werden konnte.

5.7.3 Ausschließlich aus dem Klärwasser und dem Interstitial flußabwärts des Kläranlagenablaufes isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe B)

Familie der *Comamonadaceae* [*Comamonas denitrificans*, *Comamonas* spec., *Delftia acidovorans* (β -Proteobakterien; cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktase)]

Die Bakterien der Familie der *Comamonadaceae* wurden im Klärwasser, wie auch im Oberflächen- und Interstitialwasser der flußabwärts der Kläranlage gelegenen Probenahmestellen nachgewiesen.

Auffällig ist, daß Bakterien dieser Familie überwiegend im Jahr 2000 isoliert werden konnten. Eine Einschwemmung dieser Bakterien durch das Klärwasser wurde nachgewiesen, allerdings ist der Eintrag nitratreduzierender Bakterien in die Lahn durch die Kläranlage im Probenahmejahr 2000 vergleichsweise gering. In diesem Zeitraum bestand für die Stämme dieser Familie eine starke Beeinflussung durch die hohe Nitratkonzentration im Klärwasser. Eine Etablierung dieser

Bakterien im hyporheischen Interstitial der Lahn konnte zumindest für die Periode von einem Jahr bestätigt werden.

Die Gattung *Comamonas* umfaßt die Arten: *C. aquatica*, *C. denitrificans*, *C. nitrativorans*, *C. koreensis*, *C. kerstersii*, *C. terrigena* und *C. testosteroni* (früher *Pseudomonas testosteroni*). Die Art *Comamonas acidovorans* wurde 1999 als *Delftia acidovorans* von den *Comamonas* Arten *C. terrigena* und *C. testosteroni* abgegrenzt (WEN et al. 1999). Die Isolate zeigen eine große Ähnlichkeit in der Sequenz der 16S rDNA-Region mit der von *Comamonas denitrificans* und *Delftia acidovorans*.

Die Fähigkeit von *Comamonas* Spezies unter aeroben wie anaeroben Bedingungen zu denitrifizieren ist schon seit langem bekannt (PATUREAU et al. 1994, PATUREAU et al. 1997). Das von GUMAELIUS et al. (2001) als neue Spezies beschriebene Bakterium *Comamonas denitrificans* wurde aus dem Belebtschlamm einer Kläranlage isoliert und zeichnet sich durch eine sehr effektive Denitrifikation aus. Die als *Comamonas nitrativorans* neu beschriebene Art wurde von ETCHEBEHERE et al. (2001) aus einem denitrifizierenden Klärreaktor isoliert und wird von den Autoren als Indikator von anoxischen Verhältnissen angenommen, da das Bakterium unter aeroben Bedingungen kein Nitrat reduziert (ETCHEBEHERE et al. 2001b). Insbesondere in mit methanolhaltigem Wasser betriebenen Denitrifikationsreaktoren konnte *Delftia acidovorans* nachgewiesen werden (LABBE et al. 2003), wobei LEMMER et al. (1997) Bakterien der Gattung *Comamonas* nicht zur autochthonen denitrifizierenden Bakteriengemeinschaft in mit Methanol gefütterten Biofilmen zählte. Auch die vorliegenden Ergebnisse belegen, daß die denitrifizierenden Bakterien dieser Familie durch die Einleitung des Klärwassers ins Interstitial der Lahn eingeschwemmt wurden und zumindest für ein Jahr im Interstitial persistierten. Eine Persistenz dieser als effizient denitrifizierend beschriebenen Bakterien im Interstitial und im Oberflächenwasser der Lahn kann zu einer erhöhten Stickstoffeliminierung in der Lahn beitragen. Im Gegensatz zu höheren Organismen können Bakterien z.B. *Comamonas testosteroni* Steroide vollständig zu CO₂ und H₂O abbauen und die dabei gewonnene Energie für ihr Wachstum nutzen. Steroide stellen durch die zunehmende Belastung von Abwässern ein immer ernsteres Problem für die Umwelt dar. Ob beispielsweise die beobachteten Störungen im Hormonhaushalt von Fließgewässerorganismen (Feminisierung der Fauna [PURDOM et al. 1994]) mit den Sexualhormonen der Antibabypille zusammenhängen, ist noch offen. Untersuchungen an männlichen Regenbogenforellen in Flüssen, die als Vorfluter von Kläranlagen dienen, ergaben eine Feminisierung und gleichzeitig ein verlangsamtes Hodenwachstum der Tiere in Korrelation mit der Entfernung ihres Lebensraumes zum Kläranlagenablauf (SPRENGLER 2001). Als Ursache für die hormonelle Wirkung des Klärwassers werden synthetische Östrogene und Alkylphenole vermutet. In Flüssen mit guter Wasserqualität sinkt die hormonelle Wirkung bereits

nach wenigen hundert Metern flußabwärts einer Kläranlage deutlich ab, während sie bei stark belasteten Flüssen über mehrere Kilometer erhalten bleibt (SUMPTER 1995).

Das *hsdA* Gen, das essentiell für den Steroidabbau bei *Comamonas testosteroni* ist, konnte bei den isolierten Stämmen der Familie der *Comamonadaceae* nicht nachgewiesen werden, so daß das restriktive Vorkommen dieser Gattung flußabwärts des Kläranlagenablaufes nicht auf die Fähigkeit zurückgeführt werden kann, Steroide abzubauen.

In dieser Untersuchung konnte nachgewiesen werden, daß Spezies der Familie der *Comamonadaceae* und der Gattung *Alcaligenes* offenbar auf die Bedingungen im Klärwasser sowie im vom Klärwasser beeinflussten Interstitial angewiesen sind.

5.7.4 Ausschließlich aus dem Interstitial flußabwärts des Kläranlagenablaufes isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe B)

***Escherichia coli* (γ -Proteobakterien)**

Escherichia coli konnte nur zweimal aus den Interstitialwasserproben des Transektes VII isoliert werden. Bei der Belastung der Lahn durch die Klärwassereinleitung erstaunt dieses Ergebnis, da dieser Organismus als Indikator für fäkale Verunreinigungen gilt und auch in geklärtem Abwasser noch nachgewiesen wird (SCHLEGEL 1981).

E. coli gilt neben anderen *Enterobacteriaceae* eigentlich nicht als denitrifizierendes Bakterium, ist aber zur dissimilatorischen Nitratreduktion zu Ammonium (DNRA) fähig. So kann *E. coli* unter anaeroben Bedingungen Nitrat und Nitrit zu Ammonium zu reduzieren. Dabei wird zwischen respiratorischer und dissimilatorischer Nitritreduktion unterschieden. Für diese unterschiedlichen Stoffwechselwege besitzen die Bakterien der *Enterobacteriaceae* - damit auch *E. coli* - zwei unterschiedliche Nitritreduktasetypen, die cytochrom-c-haltige Nitritreduktase (*nrfA*) und die sirohäm-haltige Nitritreduktase (*nirB*) (STOLZ & BASU 2002). Der Nitritreduktasetyp von *E. coli* konnte in dieser Untersuchung mit den verwendeten Primern nicht bestimmt werden, da diese nur an Regionen der Gene der kupferhaltigen (*NirK*) bzw. der cytochrom-*cd*₁-haltigen Nitritreduktase (*NirS*) binden (BRAKER et al. 1998), jedoch nicht an die der periplasmatischen cytochrom-c-haltigen Nitritreduktase (*nrfA*) und die der sirohäm-haltigen Nitritreduktase (*nirB*).

An der anaeroben respiratorischen Nitritreduktion, die zur Energiegewinnung dient, ist die cytochrom-c-haltige Nitritreduktase (*nrfA*) beteiligt. In der für *E. coli* bedeutenderen anaeroben dissimilatorischen Nitritreduktion wird die sirohäm-haltige Nitritreduktase (*nirB*) verwendet. Sie dient der Detoxifikation des Nitrits, das bei der Nitratrespiration akkumuliert wird. Beide Nitritreduktasen werden in *E. coli* unter anaeroben Bedingungen in Anwesenheit von Nitrat und/oder Nitrit exprimiert (WANG & GUNSALUS 2000). Gegenüber der Denitrifikation hat die DNRA den Vorteil, daß die Nitratreduktase im Enzymool der Bakterien konstitutiv vorhanden

ist, während die verschiedenen Gene der an der Denitrifikation beteiligten Enzyme induziert werden müssen (TIEDJE 1988). Unter schwankenden Nitratkonzentrationen begünstigt dies die DNRA. In dieser Untersuchung wurden keine starken Schwankungen der Nitratkonzentration im Interstitial der Lahn gemessen, so daß hier eine Begünstigung der dissimilatorischen Nitrat- bzw. Nitritreduktion gegenüber der Denitrifikation nicht vorliegen dürfte.

Der Stoffwechselweg der dissimilatorischen Nitrat- bzw. Nitritreduktion ist nicht der Denitrifikation zuzurechnen. Neue Ergebnisse von CORKER & POOLE (2003) konnten jedoch beweisen, daß *E. coli* K12 unter anaeroben Bedingungen unter Zugabe von Nitrit wächst, Nitrat als terminalen Elektronenakzeptor nutzt und Stickstoffmonoxid produziert. Demnach ist *E. coli* aufgrund des gasförmigen Endproduktes der Nitrat- bzw. Nitritreduktion und dem auf Stickstoffreduzierung basierenden Wachstum der Zellen nach MAHNE & TIEDJE (1995) zu den denitrifizierenden Bakterien zu rechnen.

Die seltene Isolierung von *E. coli* ist demnach darauf zurückzuführen, daß nur wenige *E. coli* Stämme in der Lage sind, unter Bildung von gasförmigen Endprodukten durch Reduktion von Nitrat und Nitrit zu wachsen und damit mittels der gewählten Isolierungsmethode nur ein geringer Anteil detektiert werden konnte.

5.7.5 Aus dem Interstitial flußaufwärts und -abwärts des Kläranlagenablaufes isolierte denitrifizierende Bakterien (Großgruppe C)

Gattung *Aeromonas* (γ -Proteobakterien, cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktase)

Bakterien der Gattung *Aeromonas* wurden aus dem Interstitial der Lahn in den Transekten III und VII isoliert. *Aeromonas* Spezies sind mit *Acinetobacter* und *Pseudomonas* in permanent wassergesättigten Bodenschichten dominant (HOCH 1999) und auch die nicht gasbildenden Stämme von *Aeromonas* sind laut SCHÖNBORN (1992) typisch für polysaprobe Flüsse. *Aeromonas* Spezies gelten auch als typische Zeigerorganismen für eine organische Belastung bzw. für Fließgewässer mit kommunalen Abwässern, deren Belastungsgrad sich bis in den eutrophen Bereich hinein erstreckt (HOCH 1999). Die Detektierung der *Aeromonas* Spezies weist demnach auf eine Belastung des Oberflächenwassers der Lahn hin, die durch Einleitungen von Kläranlagen flußaufwärts des untersuchten Gewässerabschnittes hervorgerufen und durch das Klärwasser der Kläranlage Sarnau noch verstärkt wurde. Im Gegensatz zu SCHMIDER (1985), der *Aeromonas hydrophila* zwar aus der fließenden Welle belasteter Fließgewässer isolieren konnte, jedoch nur selten aus deren Flußsedimenten, konnten die *Aeromonas* Spezies in diesem Untersuchungsabschnitt der Lahn ausschließlich im Interstitial detektiert werden. Eine Einschwemmung durch die Kläranlage konnte in dieser Untersuchung nicht festgestellt werden.

***Stenotrophomonas maltophilia* (früher *Xanthomonas maltophilia*; γ -Proteobakterien; cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktase)**

Stenotrophomonas maltophilia konnte aus den Interstitialwasserproben der Transekte III, V und VII isoliert werden. Diese Art trug bis 1993 die Bezeichnung *Xanthomonas maltophilia* und wurde von PALLERONI & BRADBURY (1993) in *Stenotrophomonas maltophilia* umbenannt.

SCHLOTTER et al. (2000) beschreiben *St. maltophilia* als weit verbreitetes Bakterium, das auch als multiresistenter, humanpathogener und Xenobiotika abbauender Organismus von steigender Bedeutung ist (DENTON & KERR 1998, HOCH 1999). Innerhalb seiner Artbezeichnung zeigt *St. maltophilia* eine hohe genotypischen Heterogenität (DENTON & KERR 1998). JÖRGENSEN & PAULI (1995) isolierten *Xanthomonas* Stämme als denitrifizierende Bakterien aus Belebtschlamm und MERZOUKI et al. (1999) konnten mit *St. maltophilia* ein Abwasserbakterium isolieren, das unter anoxischen bzw. mikroaerophilen Bedingungen denitrifiziert. In dieser Untersuchung wurde keine Einschwemmung von *St. maltophilia* durch das Klärwasser nachgewiesen.

Ein restriktives Vorkommen im Interstitial und nicht in der fließenden Welle ist aufgrund der weiten Verbreitung dieses denitrifizierenden Bakteriums nicht wahrscheinlich. Auch Aussagen über eine Belastung oder Beeinflussung dieser Stämme durch das Klärwasser können anhand der vorliegenden Daten nicht getroffen werden.

***Shewanella putrefaciens* (γ -Proteobakterien)**

Sh. putrefaciens wird als dominantes kultivierbares denitrifizierendes Bakterium im Pelagial der anoxischen Gewässerschichten der Ostsee beschrieben (HÖFLE & BRETTAR 1996, ZIEMKE et al. 1997). Nach der Reklassifizierung von Teilen der unter dem Namen *Sh. putrefaciens* zusammengefaßten Bakterien in eine neue Spezies, *Sh. baltica* (ZIEMKE et al. 1998), gilt dieses Bakterium laut BRETTAR et al. (2001) als dominierender, kultivierbarer Denitrifikant in der Ostsee. Neben der Denitrifikation ist *Sh. putrefaciens* auch unter aeroben Bedingungen zur Nitratreduktion fähig, wogegen die dissimilatorischen Nitratreduktion (DNRA) für den Stoffwechsel dieses Bakterium nur eine untergeordnete Rolle spielt (KRAUSE & NEALSON 1997). Mit *Sh. denitrificans* wurde ein weiteres stark denitrifizierendes Bakterium beschrieben, das aus der oxisch-anoxischen Grenzschicht in der Ostsee isoliert werden konnte (BRETTAR et al. 2002). Für *Sh. putrefaciens* wie auch für *Ochrobactrum anthropi* wurde die Fähigkeit zur simultanen Denitrifikation und Phosphat-Akkumulation in Kläranlagen nachgewiesen (MERZOUKI et al. 1999), so daß von einer Einschwemmung dieses Bakteriums aus der Kläranlage ausgegangen wird.

***Pseudomonas aeruginosa* (γ -Proteobakterien; cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktase)**

In dieser Untersuchung konnte *Pseudomonas aeruginosa* nur im Interstitial, jedoch nicht im Klärwasser oder dem Oberflächenwasser der Lahn nachgewiesen werden.

Ps. aeruginosa ist ein in Böden, Gewässern, Abwässern und in der Luft weitverbreitetes Bakterium, da es ein anspruchsloses Bakterium mit einem breiten Toleranzbereich gegenüber physikalischen Faktoren ist und bei extrem niedrigem Nährstoffangebot wachsen kann (SPIERS et al. 2000). Größe und Zusammensetzung des Genoms spiegeln diese Anpassungsfähigkeit an unterschiedlichste Umwelt- und Substratbedingungen wieder (JORDAN 2004). Mit 6,3 Mb besitzt *Ps. aeruginosa* PAO1 im Vergleich zu anderen Bakterien ein sehr großes Genom und einen hohen Anteil an regulatorisch wirkenden Genen (STOVER et al. 2000). Wie in der Literatur beschrieben (ARAI et al. 1995a, ARAI et al. 1995b) konnte im Genom von *Ps. aeruginosa* das Gen der cytochrom-*cd*₁-haltige Nitritreduktase nachgewiesen werden.

Im klinischen Bereich gilt *Ps. aeruginosa* als opportunistischer, humanpathogener Erreger, der besonders durch eine hohe Resistenz gegenüber vielen Antibiotika und äußeren Umweltbedingungen gekennzeichnet ist (CUNHA 2002). So ist *Ps. aeruginosa* in der Lage, extrem diverse und widerstandsfähige Biofilme auszubilden, wobei besonders bemerkenswert ist, daß durch die Ausbildung von Biofilmen die natürliche Resistenz gegenüber Antibiotika noch verstärkt wird (FLEMMING & WINGENDER 2001, SCHWICHTENBERG 2003). Dies ist in erster Linie auf die Produktion und Sezernierung des Exopolysaccharids Alginate zurückzuführen, das zur Bildung von widerstandsfähigen Biofilmen verwendet werden kann und dieser Art sogar ein Wachstum in chloriertem Wasser ermöglicht (GROBE et al. 2001).

Aufgrund der weiten Verbreitung - infolge einer hohen Toleranz gegenüber physikalischen Faktoren, extrem niedrigen Nährstoffbedingungen und einer hohen natürlichen Resistenz gegenüber Antibiotika - verwundert, daß *Ps. aeruginosa* ausschließlich aus Interstitialwasserproben isoliert werden konnte.

Als mögliche Erklärung kann die angewandte Probenahmetechnik angesehen werden: Untersuchungen an der Elbe haben gezeigt, daß *Ps. aeruginosa* an der Ausbildung von Schwebstofflocken (riversnow) beteiligt ist, die in den Herbst- und Wintermonaten eine durchschnittliche Größe von 1 bis 2 mm, in den Frühlings- und Sommermonaten von 1 bis 5 mm erreichen (BÖCKELMANN et al. 2000, BÖCKELMANN 2001). Die Wasserproben von Klär- und Oberflächenwasser wurden im Gegensatz zu den Interstitialwasserproben, die durch einen Kunststofffilter der Interstitialsonden mit einer mittleren Porengröße von 10 μ m mittels Unterdruck angesogen wurden, direkt entnommen. Durch eine Sedimentation während der Bearbeitungsphase im Labor wurden größere Agglomerate nicht mit in die Anreicherungsansätze

einbezogen, wodurch möglicherweise *Ps. aeruginosa* nicht im Oberflächen- und Klärwasser detektiert werden konnte.

Im aquatischen Bereich kann eine zunehmende Verschmutzung zu einem verstärkten Vorkommen von *Ps. aeruginosa* und zu einer Abnahme der Häufigkeit von *Ps. fluorescens* führen (SCHMIDER 1985). Die Tatsache, daß *Ps. aeruginosa* im Probenahmejahr 2001 nicht mehr detektiert werden konnte, ist nicht mit dem verminderten Stickstoffeintrag durch das Klärwasser im Probenahmejahr 2001 zu erklären, da *Ps. aeruginosa* in den früheren Probenahmejahren in allen Transekten - auch flußaufwärts des Kläranlagenablaufes - detektiert wurde. Aufgrund der hohen metabolischen Variabilität und der natürlichen Resistenz gegenüber vielen Antibiotika und physikalischen Faktoren muß von einer weiten, persistierenden Verbreitung im hyporheischen Interstitial, unabhängig von der organischen Belastung, ausgegangen werden. Diese Persistenz konnte jedoch in dieser Untersuchung nicht nachgewiesen werden.

5.7.6 Isolierte denitrifizierende Bakterien ohne eindeutige Verbreitungspräferenz

Gattung *Enterobacter* (γ -Proteobakterien): Großgruppe C

Bakterien der Gattung *Enterobacter* konnten im Klärwasser sowie im Interstitial der Transekte III und VII nachgewiesen werden. Basierend auf der ARDRA-Analyse erfolgte die Einordnung der *Enterobacter* Isolate mit den *Escherichia coli* Isolaten zu einem Cluster: Ein Ergebnis, daß mit der Identifizierung des MicroLog-Systems übereinstimmt, während die 16S rDNA Sequenzierung keine weiteren Aussagen lieferte.

Enterobacter cloacae gilt in von kommunalen Abwässern belasteter Fließgewässer als typisch, konnte jedoch von SCHMIDER (1985) nur in Gewässern mit oligotrophen bis maximal mesotrophen Bedingungen nachgewiesen werden. *Enterobacter* Spezies traten verstärkt im Sediment eines durch landwirtschaftliche Einträge belasteten Fließgewässers korrelierend mit einer hohen Konzentration an anorganischen Stickstoffverbindungen (Nitrat-N) und einer niedrigen Sauerstoffkonzentration auf, was sich insbesondere in der Verteilung auf Infiltrations- und Exfiltrationsbereiche bemerkbar machte (HALDA-ALIJA et al. 2001). So konnte ein verstärktes Auftreten von *Enterobacter* Spezies im Exfiltrationsbereich im Vergleich zum Infiltrationsbereich detektiert werden, ein Phänomen, das in einer früheren Untersuchung schon für ein unbelastetes Fließgewässer festgestellt wurde (HALDA-ALIJA & JOHNSTON 1999).

Für die Lahn kann auf der Basis dieser Untersuchung keine Aussage bezüglich einer Verbreitungspräferenz der *Enterobacter* Spezies getroffen werden. Sie wurden sowohl aus Wasserproben des Infiltrationsbereiches als auch aus denen des Exfiltrationsbereiches sowie aus dem Klärwasser isoliert.

***Bacillus cereus* (Gram positiv, cytochrom-*cdI*-haltige Nitritreduktase): Großgruppe B und C**

Bacillus cereus konnte aus dem Klärwasser, der fließenden Welle vor dem Kläranlagenabfluß, in Transekt III und in Transekt V nachgewiesen werden.

Die Gram positiven Sporenbildner der Gattung *Bacillus* sind relativ anspruchsvolle Bakterien, deren Bedarf an Vitaminen und bestimmten Aminosäuren besser von Böden und Sedimenten als von der fließenden Welle gedeckt wird. Erhöhte Vorkommen von *Bacillus* in der fließenden Welle wurden als Indikator für Bodeneinschwemmungen und Sedimentaufwirbelungen betrachtet (SCHMIDER 1985). *Bacillus cereus* wurde in biologischen Kläranlagen wie auch in oligotrophen Fließgewässern im Interstitial gefunden, wobei mit zunehmendem Eutrophierungsgrad die Häufigkeit dieser denitrifizierenden Art abnimmt und dafür *Bacillus licheniformis* zunehmend isoliert werden kann (HOCH 1999). *Bacillus licheniformis* wurde in dieser Untersuchung nicht isoliert, was darauf hinweist, daß die Belastungssituation der Lahn in diesem Bereich trotz der direkten Einleitung von Klärwasser noch im mesotrophen Bereich liegt. Die 16S rDNA Sequenzanalyse zeigte unter den als *Bacillus cereus* identifizierten Bakterien eine große genetische Ähnlichkeit. Dies stand im Gegensatz zur ARDRA-Analyse, in der die *Bacillus cereus* Isolate in unterschiedliche ARDRA-Gruppen aufgeteilt wurden, die sich innerhalb dieser Einteilung noch stark bezüglich ihrer Restriktionsfragmentlängen unterschieden. Auch CHENEBY et al. (2000) zeigten in ihrer Untersuchung, daß denitrifizierende *Bacillus*-Arten bezüglich der 16S rDNA eine hohe Ähnlichkeit aufwiesen, aber unterschiedlichen ARDRA-Gruppen angehörten.

***Klebsiella pneumoniae* (γ -Proteobakterium, cytochrom-*cdI*-haltige Nitritreduktase): Großgruppe A und B**

Bei dem durch das MicroLog-System identifizierten denitrifizierenden Bakterium *Klebsiella pneumoniae* wurden keine Sequenzergebnisse erzielt. Auch hier sollte man bei der Einordnung Vorsicht walten lassen, da *Klebsiella* wie die Stämme der Gattungen *Enterobacter* und *Serratia* Polysaccharidkapseln absondern, die zu falschen Identifizierungen führen können. Bakterien der Gattung *Klebsiella* gelten als in Wasser und Boden weit verbreitet und eingeschränkt als Indikator für fäkale Verunreinigungen (SCHLEGEL 1981). Das Auftreten dieser Spezies in der oberen Sedimentschicht des Transektes III weist demnach auf Einträge aus Kläranlagen bzw. aus diffusen Quellen flüßaufwärts des Untersuchungsgebiet hin.

Ein aus einer Kläranlage isolierter und als *Klebsiella oxytoca* identifizierter Denitrifikant zeigte eine vollständige Reduktion des Nitrats zu molekularem Stickstoff, obwohl die Spezies der Gattung *Klebsiella* eher den fermentativen Bakterien zugeordnet werden, die zu einer dissimilatorischen Nitrat- und Nitritreduktion zu Ammonium fähig sind (MERZOUKI et al.

1999). Dieses Ergebnis wird durch die Identifizierung des Gens der cytochrom-*cd1*-haltigen Nitritreduktase für die als *Klebsiella pneumoniae* identifizierten Bakterien bestätigt. Die *Klebsiella pneumoniae* Isolate wurden in der ARDRA-Analyse in unterschiedliche ARDRA-Gruppen eingeteilt. Die innerhalb dieser Spezies auftretende Heterogenität wurde schon von BRISSE & VERHOEF (2001) beschrieben und konnte auch in dieser Untersuchung bestätigt werden.

Gattung *Pseudomonas* (γ -Proteobakterien; cytochrom-*cd1*-haltige Nitritreduktase): Großgruppe B und C

Pseudomonas Spezies konnten aus den Wasserproben der fließenden Welle flußabwärts und flußaufwärts der Kläranlage, im Klärwasser und dominierend aus allen Interstitialwasserproben isoliert werden.

Pseudomonaden sind widerstandsfähige und opportunistische Bakterien. Die Kombination dieser beiden Eigenschaften ermöglicht den Bakterien ein Überleben in nahezu jedem Habitat. Als dominant sind die Pseudomonaden in stark organisch belasteten Fließgewässern, in Belebtschlamm und bei Abwässereinleitungen von Kläranlagen anzusehen (SCHÖNBORN 1992). Aus Proben einer Kläranlage identifizierten DRYSDALE et al. (1999) Bakterien der Gattung *Pseudomonas* als vorherrschende heterotrophe denitrifizierende Bakterien. WARD (1995) wies darauf hin, daß die Gattung *Pseudomonas* sowohl in Gewässern als auch in Sedimenten die dominierenden kultivierbaren Denitrifikanten stellt, während GRÜNTZIG et al. (2001) die Dominanz von *Pseudomonas*, insbesondere von *Pseudomonas stutzeri*, auf Sedimente von Seen und auf das Grundwasser beschränken, marine Gewässer jedoch ausklammern.

Die in dieser Untersuchung erzielten Ergebnisse zeigen eine weite, dominierende Verbreitung der Bakterien der Gattung *Pseudomonas* im hyporheischen Interstitial der Lahn. Allerdings scheint der Belastungsgrad des Fließgewässers für die Bakterien dieser Gattung nicht ausschlaggebend zu sein: HALDA-ALIJA & JOHNSTON (1999) untersuchten das hyporheische Interstitial von In- und Exfiltrationsbereich eines unbelasteten Fließgewässers und konnten innerhalb der heterotrophen, aeroben Bakterien dominierend die Pseudomonaden isolieren, unabhängig von In- und Exfiltrationsbereich. Darüber hinaus kommen Bakterien der Gattung *Pseudomonas* auch in Fließgewässern mit organischer Belastung vor (SCHÖNBORN 1992).

Die Gattung *Pseudomonas* ist auch aufgrund der Ergebnisse dieser Untersuchung nicht als differenzierender Indikator für die Belastungssituation eines Fließgewässers nutzbar, da aufgrund ihrer starken metabolischen Variabilität eine weite Verbreitung im hyporheischen Interstitial - unabhängig von der organischen Belastung - angenommen werden muß. Jedoch kann eine

differenziertere taxonomische Bestimmung der Pseudomonaden detailliertere Aussagen über den Belastungsgrad eines Gewässers zulassen.

***Pseudomonas fluorescens* (γ -Proteobakterium, cytochrom-*cd1*-haltige Nitritreduktase):
Großgruppe A, B und C**

Nur in der Großgruppe A konnte *Pseudomonas fluorescens* Biotyp F nachgewiesen werden. Im Vergleich zu allen anderen als *Ps. fluorescens* Biotyp C identifizierten *Ps. fluorescens* Stämmen konnten die beiden Isolate der ARDRA-Gruppe A, die aus den Interstitialwasserproben des Transektes I in 40 cm Sedimenttiefe isoliert wurden, als *Ps. fluorescens* Biotyp F identifiziert werden.

Diese physiologisch begründete Unterscheidung innerhalb der Spezies *Ps. fluorescens* wird unterstützt durch die unterschiedliche Hemmwirkung auf Referenzbakterien durch die Produktion und Sezernierung von antibiotisch wirksamen Stoffen und durch die Eingruppierung der *Ps. fluorescens* Spezies in unterschiedliche ARDRA-Gruppen. Bezüglich der 16S rDNA, die für die ARDRA-Analyse verwendet wurde, weist *Ps. fluorescens* eine starke Heterogenität auf (LAGUERRE et al. 1994a, LAGUERRE et al. 1994b, YAMAMOTO et al. 2000). So wird die Spezies *Ps. fluorescens* in verschiedene Subspezies untergliedert (PALLERONI 1992). CHO & TIEDJE (2000) konnten aus 248 Isolaten mit sehr ähnlichen Restriktionsfragmentlängen in der ARDRA-Analyse 85 einzelne Genotypen fluoreszierender Pseudomonaden mit Hilfe einer Fragmentanalyse nach einer BOX-PCR feststellen. Die Aufteilung der verschiedenen als *Ps. fluorescens* identifizierten Bakterien in verschiedene ARDRA-Gruppen ist daher Ausdruck dieser genetischen Heterogenität innerhalb der Speziesbezeichnung *Ps. fluorescens*.

Nach SCHMIDER (1985) ist *Ps. fluorescens* in erster Linie in unbelasteten oligotrophen Gewässern dominant vertreten, während bei stärkerer Belastung eher *Ps. putida* und *Ps. aeruginosa* in Erscheinung treten. In der hier vorliegenden Untersuchung wurden sowohl *Ps. fluorescens*, wie auch *Ps. aeruginosa* nachgewiesen, da eine Determinierung der Verbreitung dieser beiden Arten nicht auf die Fähigkeit zur Denitrifikation zurückgeführt werden kann, sondern auf unterschiedliche Nährstoffansprüche.

Ps. fluorescens und *Ps. aeruginosa* (bis einschließlich 2000) erwiesen sich in dieser Untersuchung als dominierende Denitrifikanten im Interstitial der Lahn. Die häufige Isolierung von denitrifizierenden Bakterien der Gattungen *Pseudomonas* und *Bacillus* korrespondiert mit den Ergebnissen von GAMBLE et al. (1977) und Weier und MacRae (1992). Darüber hinaus wiesen CHENEBY et al. (2000) für bestimmte ARDRA-Gruppen von *Pseudomonas* und *Bacillus* ein restriktives Vorkommen in spezifischen Bodentypen nach, was auch in dieser Untersuchung für

die *Pseudomonas fluorescens* Biotype F Stämme zutrifft, die eine eigene ARDRA-Gruppe bilden und ausschließlich flußaufwärts des Kläranlagenablaufes isoliert wurden.

In dieser Untersuchung konnte nachgewiesen werden, daß bestimmte denitrifizierende Bakterien, insbesondere Spezies der *Comamonadaceae* und der Gattung *Alcaligenes*, auf die Bedingungen im Klärwasser sowie im vom Klärwasser beeinflussten Interstitial angewiesen sind, während Pseudomonaden und *Bacillus cereus* eine weite, vom Klärwasser unbeeinflusste Verbreitung aufzeigen.

5.7.7 Kultivierbare denitrifizierende Bakterien in den verschiedenen Kompartimenten der Lahn

Aufgrund der Ergebnisse ist eine Zuordnung der denitrifizierenden Bakterien zu den verschiedenen untersuchten Kompartimenten der Lahn möglich (Tab. 22).

Tab. 22: Aufteilung der aus dem Interstitial und dem Klärwasser isolierten identifizierten denitrifizierenden Bakterien - gruppiert in Abhängigkeit von der Lage der Probenahmestellen: Interstitial flußaufwärts (Zusammenfassung der Transekte I und III) und flußabwärts (Zusammenfassung der Transekte V und VII) des Kläranlagenablaufes und der Kläranlagenablauf selbst.

	Interstitial flußaufwärts des Kläranlagenablaufes	Kläranlagenablauf	Interstitial flußabwärts des Kläranlagenablaufes
Gram negativ			
β -Proteobakterien		<i>Alcaligenes</i> <i>Comamonadaceae</i>	<i>Comamonadaceae</i>
γ -Proteobakterien	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas spec.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Aeromonas</i> <i>Shewanella</i> <i>Klebsiella</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas spec.</i> <i>Enterobacter</i> <i>Acinetobacter</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Pseudomonas spec.</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Enterobacter</i> <i>Stenotrophomonas</i> <i>Aeromonas</i> <i>Shewanella</i> <i>Escherichia</i>
Gram positiv	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus</i>

Denitrifizierende Bakterien der Gattungen *Alcaligenes* (β-Proteobakterien) und *Acinetobacter* (γ-Proteobakterien) treten ausschließlich im Klärwasser auf. Ein Nachweis dieser Bakterien im Interstitial konnte nicht erbracht werden. *Comamonadaceae* (β-Proteobakterien) konnten im Klärwasser und im Interstitial flußabwärts des Kläranlagenablaufes isoliert werden, so daß von einer Einschwemmung dieser Bakterien durch das Klärwasser ins Interstitial und einer Persistenz in diesem Habitat ausgegangen werden muß. Eine weite Verbreitung zeigen die γ-Proteobakterien

der Gattungen *Pseudomonas* (insbesondere *Ps. fluorescens* und *Ps. aeruginosa*), *Enterobacter*, *Stenotrophomonas*, *Aeromonas*, *Shewanella* und *Klebsiella* (auch in der fließenden Welle nachgewiesen; in der Tab. 22 nicht aufgeführt) wie auch die Gram positiven Bakterien der Gattung *Bacillus*. Anhand dieser Verteilung soll nachfolgend die Belastung der Lahn durch den Klärwassereintrag und dessen Wirkung auf denitrifizierende Bakterien eingeschätzt werden.

5.8 Belastung der Lahn durch den Klärwassereintrag im Hinblick auf die Verbreitung und Zusammensetzung der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien

Die Untersuchung verfolgte das Ziel, den Einfluß einer Klärwassereinleitung auf die Verbreitung und die Zusammensetzung von kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien in der Lahn zu bestimmen.

5.8.1 Belastung der Lahn durch den Klärwassereintrag im Hinblick auf die Verbreitung und Zusammensetzung der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien

Nach den Ergebnissen der physiologischen und molekulargenetischen Identifizierungen zeigt sich eine qualitative Verschiebung in der Zusammensetzung der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien unter dem Einfluß der Klärwassereinleitung.

In der Großgruppe A wurden die Isolate der ARDRA-Gruppen zusammengefaßt, die ausschließlich aus den Wasserproben von flüßaufwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Entnahmestellen isoliert wurden. Eine direkte Beeinflussung durch das Klärwasser kann für diese denitrifizierenden Bakterien ausgeschlossen werden. Allerdings zeigt ein Literaturvergleich, daß das Vorkommen dieser Denitrifikanten auf Belastungen der Lahn bereits vor dem untersuchten Kläranlagenablauf hinweist:

Die als *Serratia* Spezies und *Ochrobactrum anthropi* identifizierten Bakterien konnten ausschließlich flüßaufwärts des Kläranlagenablaufes aus der fließenden Welle isoliert werden. Generell sind diese beiden Arten für Fließgewässer mit oligotroph-mesotrophem Charakter als typisch anzusehen, wobei *Ochrobactrum anthropi* auch als weit verbreitetes Bodenbakterium gilt und aus Kläranlagen isoliert werden konnte. In unbelasteten Flüßsedimenten wurden beide Taxa von HALDA-ALIJA & JOHNSTON (1999), die aerobe, heterotrophe Bakterien in Infiltrations- und Exfiltrationsbereichen untersuchten, nicht gefunden. Die Isolierung dieser beiden Arten weist somit auf eine Belastung der Lahn durch Klärwassereinleitungen bzw. diffuse Quellen bereits flüßaufwärts des untersuchten Lahnabschnittes hin. Demzufolge können die beiden Transekte I und III flüßaufwärts des untersuchten Kläranlagenablaufes nicht als von kommunalen Abwässern

bzw. von diffusen Quellen unbeeinflusst gelten. Des weiteren scheinen diese beiden Bakterien, die nur aus dem Oberflächenwasser der Lahn isoliert wurden, nicht in der Lage zu sein, sich im Interstitial der Lahn zu behaupten, bzw. sie sind nicht konkurrenzfähig gegenüber den im Interstitial bereits vorhandenen Bakterien.

Trotz der Belastung der Lahn durch flußaufwärts des Untersuchungsgebietes gelegene Kläranlagen bzw. diffuse Quellen konnte *Comamonadaceae* in Transekt I und III nicht nachgewiesen werden. Dies stimmt mit den Untersuchungen von HALDA-ALIJA & JOHNSTON (1999) überein, die *Comamonadaceae* in unbelasteten Fließgewässersedimenten nicht nachweisen konnten. Das restriktive Auftreten der *Comamonadaceae* ausschließlich im Klärwasser und in direkt vom Klärwasser beeinflussten Probenahmestellen weist auf einen unmittelbaren Einfluß des Klärwassers auf die flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Interstitialbereiche hin.

Die Isolierung der denitrifizierender Bakterien der Gattungen *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Stenotrophomonas* und *Klebsiella* aus Wasserproben von Probenahmestellen flußaufwärts wie flußabwärts des Kläranlagenablaufes und aus dem Klärwasser zeigt, daß es sich bei diesen Bakterien um weit verbreitete Denitrifikanten handelt. Demzufolge gehören sie zum „Grundinventar“ der denitrifizierenden Bakterienpopulation der Lahn, wobei auch eine Einschwemmung solcher Bakterien in die Lahn durch Klärwassereinleitungen bzw. aus diffusen Quellen flußaufwärts des untersuchten Kläranlagenablaufes anzunehmen ist.

5.8.2 Einfluß der Veränderungen der Stickstoffkonzentration im Klärwasser auf die Verbreitung und Zusammensetzung der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien

Die hohe Ammoniumkonzentration des Klärwassers zu Beginn der Untersuchung konnte mit hohen Denitrationspotenzen in Transekt VII in Verbindung gebracht werden. Eine effektive Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation wird für diesen Interstitialbereich angenommen. Eine dissimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium wird in diesem Transekt nicht erwartet. Die zur dissimilatorischen Nitratreduktion fähigen *Escherichia coli* Stämme wurden zwar aus Wasserproben von Transekt VII isoliert, jedoch nicht korrelierend mit hohen Denitrationspotenzen und Ammoniumkonzentrationen. Auch traten in diesem Transekt keine signifikant niedrigeren Nitratkonzentrationen auf, die im aquatischen Milieu dazu führen, daß der Stickstoff über die dissimilatorische bzw. assimilatorische Nitratreduktion zu Ammonium reduziert wird, wogegen bei höheren Nitratkonzentrationen der Stickstoff zu gasförmigen Produkten denitrifiziert wird (RHEINHEIMER 1988). Eine Nitratreduktion zu Ammonium in diesem Transekt ist demnach nicht von großer Bedeutung. In Transekt V konnten hohe Nitritkonzentrationen und geringe Denitrationspotenzen gemessen werden, die auf eine

unvollständige Nitrifikation und auf eine nur in geringem Maße stattfindende Denitrifikation hinweisen.

Das restriktive Auftreten von Stämmen der Familie der *Comamonadaceae* weist am eindeutigsten den Einfluß der Klärwassereinleitung auf die denitrifizierende Bakterienpopulation nach. Diese Bakterien konnten wie auch Bakterien der Gattungen *Acinetobacter* und *Alcaligenes* ausschließlich während und nach den Umbaumaßnahmen in der Kläranlage isoliert werden. Die Umbaumaßnahmen in der Kläranlage Sarnau verursachten scheinbar ein verstärktes Einschwemmen dieser Bakterien in die Lahn, wobei *Acinetobacter* und *Alcaligenes* Spezies im Gegensatz zu den *Comamonadaceae* nicht im Interstitial der Lahn persistieren. Scheinbar sind die isolierten *Acinetobacter* und *Alcaligenes* Spezies auf die Bedingungen im Klärwasser, die höhere Temperaturen und die stete hohe Nährstoffversorgung angewiesen, wogegen die *Comamonadaceae* zwar durch das Klärwasser ins Interstitial eingeschwemmt werden, aber hier auch unter den gegebenen Habitatbedingungen persistieren können.

5.9 *Schlußbetrachtung und Ausblick*

Nach den hier vorliegenden Ergebnissen zeigt sich eine Veränderung in der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterienpopulation durch den unmittelbaren Eintrag von Klärwasser in die Lahn. In diesem Zusammenhang ist besonders das Auftreten von denitrifizierenden *Comamonadaceae* auffällig. Ein direkter Eintrag dieser Bakterien durch das Klärwasser und eine Besiedlung des Interstitials wurden nachgewiesen. Dieser Eintrag von denitrifizierenden *Comamonadaceae* in die Lahn kann zu einer effizienteren Stickstoffeliminierung führen, da es sich bei den beschriebenen Stämmen dieser Familie um effektive Denitrifikanten handelt. Begünstigt durch das Klärwasser sind diese Bakterien in der Lage, im Interstitial zu persistieren. Ob sie auch in weiterer Entfernung vom Kläranlagenablauf im Interstitial verbreitet sind, wäre eine interessante Fragestellung zukünftiger Forschungsvorhaben.

In dieser Untersuchung wurde festgestellt, daß kultivierbare denitrifizierende Bakterien der Gattungen *Acinetobacter* und *Alcaligenes* auf die Bedingungen im Klärwasser bzw. im vom Klärwasser beeinflussten Interstitial angewiesen sind, während Pseudomonaden und *Bacillus cereus* eine weite, vom Klärwasser unbeeinflusste Verbreitung zeigen.

Nur wenige der identifizierten denitrifizierenden Bakterien können als Zeigerorganismen für organische Belastungen fungieren, da überwiegend weitverbreitete und bezüglich ihres Metabolismus sehr variable denitrifizierende Bakterien isoliert wurden. Es konnte festgestellt werden, daß sich die Stickstoffbelastung der Lahn durch die Inbetriebnahme der Nitrifikations- und Denitrifikationsstufe in der Kläranlage Sarnau deutlich verringert hat. Da die Lahn aber bereits durch flußaufwärts gelegene Kläranlagen und diffuse Einträge belastet ist, wäre ein

weiterer Ausbau der flüßaufwärts des Untersuchungsgebietes gelegenen Kläranlagen, z.B. Lahntal-Caldern, zur Verminderung der Stickstoffbelastung erforderlich. Eine Reduktion der diffusen Einträge durch die Landwirtschaft bzw. durch Bodenerosionen könnte durch bedarfsgerechte Düngung und durch Anlegen von Uferrandstreifen mit Baumbestand erreicht werden.

Der direkte Nachweis der gekoppelten Nitrifikation/Denitrifikation im hyporheischen Interstitial könnte mittels einer Ionen-selektiven Mehrkanal-Mikroelektrode nachgewiesen werden (ARTH & FRENZEL 2000). Die zeitgleiche Messung der Konzentration von Ammonium, Nitrat und Nitrit in Verbindung mit einer Messung der Sauerstoffkonzentration auf kleinstem Raum ermöglicht die Detektierung der „anoxic microsites“ und läßt damit Rückschlüsse auf die Kopplung der beiden Prozesse Nitrifikation und Denitrifikation im hyporheischen Interstitial zu.

Die Analyse der Zusammensetzung kultivierbarer denitrifizierender Bakterienpopulationen im Oberflächen- und Interstitialwasser kann durch die Auswahl von verschiedene Anreicherungsmedien z.B. mit Sediment-Extrakt-Medien oder mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen in Minimalmedien komplettiert werden, wie auch eine Entnahme von Sedimentproben aus dem Interstitial und eine Isolierung und Charakterisierung von sessilen denitrifizierenden Bakterien weitere Aufschlüsse über die denitrifizierende Bakterienpopulation geben würde.

Diese Untersuchung beschränkte sich auf die Identifizierung kultivierbarer denitrifizierender Bakterien im Oberflächen- und Interstitialwasser der Lahn. Mittels molekularbiologischer Verfahren wie der denaturierenden Gradientengelelektrophorese (DGGE), die auf der direkten Isolierung der 16S rDNA basiert, wird auch eine kultivierungsunabhängige Populationsanalyse natürlicher Habitats möglich. So ist es mit Hilfe der DGGE möglich, DNA-Fragmente gleicher Länge aufgrund ihres unterschiedlichen Schmelzverhaltens in einem denaturierenden Gradienten aufzutrennen und Unterschiede in der Diversität verschiedener Bakteriengemeinschaften und deren Dynamik vergleichend auf einem Gel darzustellen (MUYZER et al. 1993). Diese Methode gibt allerdings nur Aufschluß über die Anzahl der verschiedenen Genotypen in der Bakterienpopulation, schließt jedoch Informationen zur Identifizierung dieser nicht mit ein. Erst eine darauffolgende Klonierung und Sequenzierung der 16S rDNA kann die in der Bakterienpopulation vertretenen Spezies identifizieren. Mit dieser Methode lassen sich somit zwar Aussagen über eine Veränderung in der Bakterienpopulation durch verschiedene Einflüsse wie z.B. Klärwassereinleitungen und die damit verbundene Einschwemmung von Organismen treffen,

sie liefert aber keine Informationen über die physiologische und metabolische Kapazität der untersuchten Bakterien, so daß diese Methode für denitrifizierende Bakterien nur in Verbindung mit einer gleichzeitigen Kultivierung und einem Nachweis über die Fähigkeit zur Denitrifikation angewendet werden kann.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluß von eingeleitetem Klärwasser auf die Verbreitung und Diversität von denitrifizierenden Bakterien im Oberflächenwasser und hyporheischen Interstitial der Lahn zu untersuchen und mögliche Veränderungen sowie deren Ursachen zu detektieren.

Der für dieses Forschungsvorhaben ausgewählte naturnah strukturierte Untersuchungsabschnitt wurde dazu in zwei vom Klärwasser unbeeinflusste und zwei vom Klärwasser beeinflusste Abschnitte untergliedert. In den Jahren 1999 bis 2001 wurden dort aus dem Klär- und Oberflächenwasser und mit Hilfe von Interstitialsonden simultan aus unterschiedlichen Sedimenttiefen (5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm) Wasserproben entnommen.

Um Informationen über die denitrifizierende Bakterienpopulation und ihre Zusammensetzung in Abhängigkeit zu vorliegenden Milieubedingungen treffen zu können, wurden neben der Erfassung ausgewählter chemisch-physikalischer Parameter und der Bestimmung der relativen Anzahl von nitratreduzierenden und denitrifizierenden Bakterien, kultivierbare denitrifizierende Bakterien isoliert und mittels physiologischer und molekulargenetischer Methoden charakterisiert und identifiziert.

Die Ergebnisse der physikalisch-chemischen Analysen ermöglichen eine vergleichende Beschreibung der Milieubedingungen in den untersuchten Interstitialbereichen flußaufwärts und flußabwärts der Einleitungsstelle des Klärwassers.

Die Werte der auch als konservativer Tracer dienenden elektrischen Leitfähigkeit weisen auf einen starken Austausch zwischen Oberflächenwasser und Interstitialwasser bis in 45 cm Sedimenttiefe und auf einen geringen Einfluß des Grundwassers auf die untersuchten Sedimentschichten hin.

Es zeigte sich für die untersuchten Interstitialbereiche, daß die Verfügbarkeit von Nitrat keinen limitierenden Faktor für die Denitrifikation darstellt. Eine Determinierung der Verbreitung von kultivierbaren denitrifizierenden Bakterien durch die Nitratkonzentration im Interstitial und bezüglich der Sedimenttiefe wurde nicht festgestellt. Auch ein temporär erhöhter Eintrag von Nitrat durch das Klärwasser führte weder zu einer deutlich erhöhten Nitratkonzentration noch zu einer erhöhten Denitrationspotenz in den flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Interstitialbereichen.

Die schon aus vorangegangenen Projekten in diesem Untersuchungsabschnitt der Lahn festgestellten Nitritanreicherungen konnten in dieser Untersuchung für den flußabwärts des Kläranlagenablaufes gelegenen Interstitialbereich in den Sommermonaten bestätigt werden. Aufgrund der in diesem Bereich festgestellten niedrigen Ammoniumkonzentrationen und

Denitrationspotenzen lassen sich diese nicht auf eine unvollständige Denitrifikation, sondern auf eine unvollständige Nitrifikation zurückführen.

Im ca. 250 m flußabwärts vom Kläranlagenablauf gelegenen Interstitialbereich konnte keine Nitritakkumulation, dafür aber eine erhöhte Denitrationspotenz festgestellt werden. Da mit gesunkener Ammoniumkonzentration im Klärwasser die Denitrationspotenz in diesem Interstitialbereich erniedrigt war, weist dies auf eine scheinbar effektive Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation während erhöhter Ammoniumkonzentration in diesem Bereich hin.

Die Gewässermorphologie der Untersuchungsstrecke wies eine Riffle-Pool-Riffle Sequenz auf und ermöglichte es, den Einfluß der unterschiedlichen hydraulischen Verhältnisse von Exfiltrations- und Infiltrationsbereich auf die Verbreitung der denitrifizierenden Bakterien zu analysieren. Im untersuchten Exfiltrationsbereich (upwelling) konnten vermehrt kultivierbare denitrifizierende Bakterien isoliert werden, so daß von einer Verbreitungspräferenz der denitrifizierenden Bakterien im upwelling Bereich aufgrund der erniedrigten Sauerstoffkonzentration ausgegangen wird.

Aufgrund von Tag-Nachtschwankungen der Sauerstoffkonzentration in der fließenden Welle und der gemessenen Differenz zwischen der Sauerstoffkonzentration in der fließenden Welle und der im Interstitialwasser, ist von alternierenden Sauerstoffkonzentrationen im Interstitial und der Ausbildung von „anoxic sites“ in der Lahn auszugehen, wodurch eine Denitrifikation begünstigt wird.

Die isolierten denitrifizierenden Bakterien wurden mittels der molekularbiologischen ARDRA-Methode in 24 phylogenetisch unterschiedliche Gruppen eingeteilt. Diese genotypische Diversität ist vergleichbar mit der von kultivierbaren Bakterien in Böden, die durch dieselbe Methode festgestellt wurde.

Eine vergleichende Betrachtung der jeweiligen Isolationsstandorte dieser Bakterien erlaubt es, den Einfluß des Klärwassers auf die Verbreitung denitrifizierender Bakterien im Oberflächen- und Interstitialwasser der Lahn nachzuweisen. Stämme der Gattungen *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Shewanella*, *Stenotrophomonas* und *Klebsiella* wiesen eine vom Klärwasser unbeeinflusste Verbreitung auf. Sie gehören demnach der permanenten mikrobiellen Denitrifikantenpopulation im Oberflächen- und Interstitialwasser der Lahn an.

Für die isolierten denitrifizierenden Stämme der Gattungen *Pseudomonas* und *Bacillus* konnte in dieser Untersuchung eine Persistenz im hyporheischen Interstitial der Lahn über einen Zeitraum von mindestens fünf Jahren festgestellt werden. Eine weite Verbreitung im Oberflächen- und Interstitialwasser der Lahn wies das Gram positive Bakterium *Bacillus cereus* und das Gram

negative Bakterium *Pseudomonas fluorescens* auf, wobei letzteres in der kultivierbaren denitrifizierenden Bakterienpopulation dominiert.

Im Gegensatz dazu wurden *Ochrobactrum anthropi* und *Serratia spec.* nur flußaufwärts im Oberflächenwasser detektiert, was auf eine Belastung der Lahn durch flußaufwärts gelegene punktuelle und diffuse Quellen hinweist.

Während *Alcaligenes* Spezies und *Acinetobacter spec.* auf die Bedingungen im Klärwasser angewiesen sind, wurden *Comamonadaceae* nicht nur im Klärwasser nachgewiesen, sondern persistierend im Oberflächen- und Interstitialwasser der Lahn festgestellt. Die Veränderung innerhalb der kultivierbaren Bakterienpopulation der Lahn durch den Eintrag des Klärwassers zeigt sich insbesondere durch die restriktive Isolierung der Stämme der *Comamonadaceae*, die nur im und flußabwärts des Kläranlagenablaufes detektiert wurden. Eine direkte Einschwemmung von denitrifizierenden Bakterien durch das Klärwasser ins Interstitial der Lahn und eine Persistenz dieser im Interstitial konnte damit nachgewiesen werden.

7 LITERATUR

- ABELING, U. & SEYFRIED, C. F. (1992): Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater - nitrogen removal via nitrite. - *Wat. Sci. Tech.* **26**: 1007-1015.
- ACINAS, S. G, RODRÍGUEZ-VALERA, F. & PEDRÓS-ALIÓ, C. (1997): Spatial and temporal variation in marine bacterioplankton diversity as shown by RFLP fingerprinting of PCR amplified 16S rDNA. - *FEMS Microbiol. Ecol.* **24**: 27-40.
- ALEF, K. (1991): *Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie*. - Landsberg/Lech.
- ALLEMAN, J. E. (1985): Elevated nitrite occurrences in biological wastewater treatment systems. - *Wat. Sci. Tech.* **17**: 409-419.
- ALTSCHUL, S. F., GISH, W., MILLER, W., MEYERS, E. W. & LIPMAN, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. - *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410.
- AMANN, R., LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. H. (1995): Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. - *Microbiol. Rev.* **59**: 143-169.
- ANTHONISEN, A. C., LOEHR, R. C., PRAKASAM, T. B. S. & SRINARH, E. G. (1976): Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. - *J. Wat. Pollut. Control Fed.* **48**: 835-852.
- ARAI, H., IGARASHI, Y. & KODAMA, T. (1995a): The structural genes for nitric oxide reductase from *Pseudomonas aeruginosa*. - *Biochimica et Biophysica* **1261**: 279-284.
- ARAI, H., IGARASHI, Y. & KODAMA, T. (1995b): Expression of the *nir* and *nor* genes for denitrification of *Pseudomonas aeruginosa* requires a novel CRP/FNR-related transcriptional regulator, DNR, in addition to ANR. - *FEBS Letters* **371**: 73-76.
- ARTH, I., FRENZEL, P. & CONRAD, R. (1998): Denitrification coupled to nitrification in the rhizosphere of rice. - *Soil Biol. Biochem.* **30**: 509-515.
- ARTH, I. & FRENZEL, P. (2000): Nitrification and denitrification in the rhizosphere of rice: the detection of processes by a new multi-channel electrode. - *Biol. Fert. Soils* **31**: 427-435.
- AUSUBEL, F. M., BREUT, R., KINGSTON, R. E., MOORE, D. D., SMITH, J. A., SEIDMANN, J. G. & STRUHL, K. [Hrsg] (1994): *Current protocols in molecular biology*, section 2.4. John Wiley & Sons, New York.
- AVRAHAMI, S., CONRAD, R. & BRAKER, G. (2002): Effect of soil ammonium concentration on N₂O release and on the community structure of ammonia oxidizers and denitrifiers. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **68**: 5685-5692.
- BALMELLE, B., NGUYEN, K. M., CAPDEVILLE, B., CORNIER, J. C. & DEGUIN, A. (1992): Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification. - *Wat. Sci. Tech.* **26**: 1017-1025.
- BECKER, B. U. (2002): Identifizierung und Analyse neuer symbioserelevanter Genorte in *Bradyrhizobium japonicum* 110spc4. - Dissertation, Universität Marburg.

- BMFT [Hrsg] (1993): Gewässerökologie. - Erarbeitung von Konzepten für die ökologische Sanierung kleiner Fließgewässer.
- BÖCKELMANN, U., MANZ, W., NEU, T. R. & SZEWYZYK, U. (2000): Characterization of the microbial community of lotic organic aggregates ('river snow') in the Elbe River of Germany by cultivation and molecular methods. - FEMS Microbiol. Ecol. **33**: 157-170.
- BÖCKELMANN, U. (2001): Description and characterization of bacteria attached to lotic organic aggregates (river snow) in the Elbe River of Germany and the South Saskatchewan River of Canada. - Dissertation, Berlin.
- BONIN, P., OMNES, P. & CHALAMET, A. (1998): Simultaneous occurrence of denitrification and nitrate ammonification in sediments of the French Mediterranean Coast. - Hydrobiologia **389**: 169-182.
- BONNET, C., VOLAT, B., BARDIN, R., DEGRANGES, V. & MONTUELLE, B. (1997): Use of immunofluorescence technique for studying a *Nitrobacter* population from wastewater treatment plant following discharge in river sediments: First experimental data. - Chemosphere **50**: 919-928.
- BORCHARDT, D. & FISCHER, J. (2000): Three-dimensional patterns and processes in the River Lahn (Germany): Variability of abiotic and biotic conditions. - Verh. Internat. Verein. Limnol. **27**: 393-397.
- BOSSHARD, P. P., SANTINI, Y., GRUTER, D., STETTLER, R. & BACHOFEN, R. (2000): Bacterial diversity and community composition in the chemocline of the meromictic alpine Lake Cadagno as revealed by 16S rDNA analysis. - FEMS Microbiol. Ecol. **31**: 173-182.
- BOTHE, H., JOST, G., SCHLOTTER, M., WARD, B. B. & WITZEL, K. (2000): Molecular analysis of ammonia oxidation and denitrification in natural environments. - FEMS Microbiol. Rev. **24**: 673-90.
- BRAKER, G., FESEFELDT, A. & WITZEL, K.-P. (1998): Development of PCR primer systems for amplification of nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) to detect denitrifying bacteria in environmental samples. - Appl. and Environ. Microbiol. **64**: 3769-3775.
- BRAKER, G., ZHOU, J., WU, L., DEVOL, A. H. & TIEDJE, J. M. (2000): Nitrite reductase genes (*nirK* and *nirS*) as functional markers to investigate diversity of denitrifying bacteria in Pacific northwest marine sediment communities. - Appl. and Environ. Microbiol. **66**: 2096-2104.
- BRAKER, G., AYALA-DEL-RIO, H. L., DEVOL, A. H., FESEFELDT, A. & TIEDJE, J. M. (2001): Community structure of denitrifiers, *Bacteria*, and *Archaea* along redox gradients in Pacific Northwest marine sediments by terminal restriction fragment length polymorphism analysis of amplified nitrite reductase (*nirS*) and 16S rRNA genes. - Appl Environ Microbiol **67**: 1893-901.
- BRETTAR, I., MOORE, E. R. & HÖFLE, M. G. (2001): Phylogeny and abundance of novel denitrifying bacteria isolated from the water column of the central Baltic Sea. - Microb. Ecol. **42**: 295-305.
- BRETTAR, I., CHRISTEN, R. & HÖFLE, M. G. (2002): *Shewanella denitrificans* sp. nov., a vigorously denitrifying bacterium isolated from the oxic-anoxic interface of the Gotland Deep in the central Baltic Sea. - Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **52**: 2211-2217.

- BRION, N. & BILLEN, G. (2000): Wastewater as a source of nitrifying bacteria in river systems: the case of the River Seine downstream from Paris. - *Wat. Res.* **34**: 3213-3221.
- BRISSE, J. & VERHOEF, J. (2001): Phylogenetic diversity of *Klebsiella pneumoniae* and *Klebsiella oxytoca* clinical isolates revealed by randomly amplified polymorphic DNA, *gyrA* and *parC* genes sequencing and automated ribotyping. - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 915-924.
- BRUNKE, M. & GONSER, J. (1997): The ecological significance of the exchange processes between rivers and groundwater. - *Freshwat. Biol.* **37**: 1-33.
- BURNS, L. C., STEVENS, R. J. & LAUGHLIN, R. J. (1996): Production of nitrite in soil by simultaneous nitrification and denitrification. - *Soil Biol. & Biochem.* **28**: 609-616.
- BUTTURINI, A., BATTIN, T. J. & SABATER, F. (2000): Nitrification in stream sediment biofilms: the role of ammonium concentration and DOC quality. - *Wat. Res.* **34**: 629-639.
- CARTER, J. P., HSIAO, Y. H., SPIRO, S. & RICHARDSON, D. J. (1995): Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **61**: 2852-2858.
- CHENEBY, D., PHILIPPOT, L., HARTMANN, A., HENAULT, C. & GERMON, J. (2000): 16S rDNA analysis for characterization of denitrifying bacteria isolated from three agricultural soils. - *FEMS Microbiol. Ecol.* **34**: 121-128.
- CHO, J.-C. & TIEDJE, J. M. (2000): Biogeography and degree of endemicity of fluorescent *Pseudomonas* strains in soil. - *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 5448-5456.
- COLE, J. A. & BROWN, C. M. (1980): Nitrite reduction to ammonia by fermentative bacteria: a short circuit in the biological nitrogen cycle. - *FEMS Microbiol. Lett.* **7**: 65-72.
- CONRAD, R. (1996): Soil microorganisms as controllers of atmospheric trace gases (H₂, CO, CH₄, OCS, N₂O, and NO). - *Microbiol. Rev.* **60**: 609-640.
- CORKER, H. & POOLE, R. K. (2003): Nitric oxide formation by *Escherichia coli*. Dependence on nitrite reductase, the NO-sensing regulator Fnr, and flavohemoglobin Hmp. - *J. Biol. Chem.* **278**: 31584-31592.
- COYNE, M. S., ARUNAKUMARI, A., AVERILL, B. A. & TIEDJE, J. M. (1989): Immunological identification and distribution of dissimilatory heme *cd₁* and nonheme copper nitrite reductase in denitrifying bacteria. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **55**: 2924-2931.
- CUNHA, B. A. (2002): *Pseudomonas aeruginosa*: resistance and therapy. - *Semin. Respir. Infect.* **17**: 231-239.
- DALSGAARD, T. & THAMDRUP, B. (2002): Factors controlling anaerobic ammonium oxidation with nitrite in marine sediments. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **68**: 3802-3808.
- DAVIES, K. J. P., LLOYD, D. & BODDY, L. (1989): Aerobic denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. - *J. Gen. Microbiol.* **135**: 2445-2451.
- DEES, P. M. & GHIORSE, W. C. (2001): Microbial diversity in hot synthetic compost as revealed by PCR-amplified rRNA sequences from cultivated isolates and extracted DNA. - *FEMS Microbiol. Ecol.* **35**: 207-216.

- DENTON, M. & KERR, K. G. (1998): Microbiological and clinical aspects of infection associated with *Stenotrophomonas maltophilia*. - Clin. Microbiol. Rev. **11**: 57-80.
- DON, R. H., COX, P. T., WAINWRIGHT, B. J., BAKER, K. & MATTICK, J. S (1991): 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. - Nucl. Acids Res. **19**: 4008.
- DRYSDALE, G. D., KASAN, H. C. & BUX, F. (1999): Denitrification by heterotrophic bacteria during activated sludge treatment. - Water SA **25**: 357-362.
- EILERS, H., PERNTHALER, J., GLÖCKNER, F. O. & AMANN, R. (2000): Culturability and in situ abundance of pelagic bacteria from the North Sea. - Appl. Environ. Microbiol. **66**: 3044-3051.
- ELLIS, S., DENDOOVEN, L. & GOULDING, W. T. (1996): Quantitative assessment of soil nitrate disappearance and N₂O evolution during denitrification. - Soil Biol. & Biochem. **28**: 589-595.
- ESTEVEZ, F. A., ENRICH-PRAST, A. & BIESOBOER, D. D. (2001): Potential denitrification in submerged natural and impacted sediments of Lake Batata, an Amazonian lake. - Hydrobiologia **444**: 111-117.
- ETCHEBEHERE, C., ERRAZQUIN, M. I., BARRANDEQUY, E., DABERT, P., MOLETTA, R. & MUXI, L. (2001a): Evaluation of the denitrifying microbiota of anoxic reactors. - FEMS Microbiol. Ecol. **35**: 259-265.
- ETCHEBEHERE, C., ERRAZYUIN, M. I., DABERT, P., MOLETTA, R. & MUXI, L. (2001b): *Comamonas nitratorans* sp. nov., a novel denitrifier isolated from a denitrifying reactor treating landfill leachate. - Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **51**: 997-983.
- EWEN, H., KALTWASSER, H. & JAHNS, T. (2000): Ammonium and methylammonium uptake in a fertilizer-degrading strain of *Ochrobactrum anthropi*. - Antonie van Leeuwenhoek **77**: 263-270.
- FELSKE, A., WOLTERIN, A., VAN LIS, R., DE VOS, W. M. & AKKERMANS, A. D. L. (1999): Searching for predominant soil bacteria: 16S rDNA cloning versus strain cultivation. - FEMS Microbiol. Ecol. **30**: 137-145.
- FISCHER, J. & BORCHARDT, D. (2001): Einsatz von Optoden zur kontinuierlichen Sauerstoffmessung im hyporheischen Interstitial. - Bericht der Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Limnologie (DGL) 2000 in Madgeburg: 316-320.
- FISCHER, J., BORCHARDT, D., INGENDAHL, D., IBISCH, R., SAENGER, N., WAWRA, B. & LENK, M. (zur Publikation angenommen): Vertical gradients of nutrients and oxygen in the hyporheic zone of the River Lahn (Germany): Relevance of hydrological retention versus biological conversion processes. - Arch. Hydrobiol.
- FLAIG, H., LEHN, H., PFENNIG, U., AKKAN, Z., ELSNER, D. & WACLAWSKI, N. (2002): Umsetzungsdefizite bei der Reduzierung der Nitratbelastung des Grundwassers. - Akademie für Technikfolgenabschätzung in Baden-Württemberg.
- FLEMMING, H.-C. & WINGENDER, J. (2001): Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien. - Biologie in unserer Zeit **31**: 169-180.

- FOX, G. E., WISOTZKEY, J. D. & JURTSCHUK, J. R. (1992): How close is close: 16S rRNA sequence identity may not be sufficient to guarantee species identity. - *Int. J. Syst. Bacteriol.* **42**: 166-170.
- FRANKEN, R. J. M., STOREY, R. G. & WILLIAMS, D. D. (2001): Biological, chemical and physical characteristics of downwelling and upwelling zones in the hyporheic zone of a north-temperate stream. - *Hydrobiologia* **444**: 183-195.
- GAMBLE, T. N., BETLACH, M. R. & TIEDJE, J. M. (1977): Numerically dominant denitrifying bacteria from world soils. - *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 926-939.
- GARCIA-RUIZ, R., PATTINSON, S. N. & WHITTON, B. A. (1998): Denitrification and nitrous oxide production in sediments of the Wiske, a lowland eutrophic river. - *The Science of the Total Environment* **210/211**: 307-320.
- GRIMM, N. B. & FISHER, S. G. (1984): Exchange between interstitial and surface water: Implications for stream metabolism and nutrient cycling. - *Hydrobiologia* **111**: 219-228.
- GROBE, S., WINGENDER, J. & FLEMMING, H.-C. (2001): Capability of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* to survive in chlorinated water. - *Int. J. Hyg. Environ. Health* **204**: 139-142.
- GRÜNTZIG, V., NOLD, S. C., ZHOU, J. & TIEDJE, J. M. (2001): *Pseudomonas stutzeri* nitrite reductase gene abundance in environmental samples measured by Real-Time PCR. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **67**: 760-768.
- GUMAEILIUS, L., MAGNUSSON, G., PETTERSON, B. & DALHAMMAR, G. (2001): *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 999-1006.
- GUTKNECHT, D., BLASCHKE, A. P., SENGSCHEMITT, D. & STEINER, K.-H. (1998): Kolmationsvorgänge in Flußstauräumen - Konzeptionen und Beobachtungen. - *ÖIAZ* **143**: 21-32.
- HALDA-ALIJA, L. & JOHNSTON, T. C. (1999): Diversity of culturable heterotrophic aerobic bacteria in pristine stream bed sediments. - *Can. J. Microbiol.* **45**: 879-884.
- HALDA-ALIJA, L., HENDRICKS, S. P. & JOHNSTON, T. C. (2001): Spatial and temporal variation of *Enterobacter* genotypes in sediments and the underlying hyporheic zone of an agricultural stream. - *Microb. Ecol.* **42**: 286-294.
- HALLIN, S. & LINDGREN, P.-E. (1999): PCR detection of genes encoding nitrite reductase in denitrifying bacteria. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **65**: 1652-1657.
- HAMM, A. (1991): Studie über Wirkungen und Qualitätsziele von Nährstoffen in Fließgewässern. - Academia Verlag, Sankt Augustin.
- HANAHAHAN, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. - *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- HELMER, C. & KUNST, S. (1998): Simultaneous nitrification/denitrification in an aerobic biofilm system. - *Wat. Sci. Tech.* **37**: 183-187.

- HENDRICKS, S. P. (1993): Microbial ecology of the hyporheic zone: a perspective integrating hydrology and biology. - J. N. Am. Benthol. Soc. **12**: 70-78.
- HENDRICKS, S. P. (1996): Bacterial biomass, activity, and production within the hyporheic zone of a north-temperate stream. - Arch. Hydrobiol. **136**: 467-487.
- HENDRIKS, J., OUBRIE, A., CASTRESANA, J., URBANI, A., GEMEINHARDT, S. & SARASTE, M. (2000): Nitric oxide reductase in bacteria. - Biochimica et Biophysica **1459**: 266-273.
- HEYNDRICKX, M., VAUTERIN, L., VANDAMM, P., KERSTERS, K. & DE VOS, P. (1996): Application of combined amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) patterns in bacterial phylogeny and taxonomy. - J. of Microbiol. Methods **26**.
- HILL, A. R., LABADIA, C. F. & SANMUGADAS, K. (1998): Hyporheic zone hydrology and nitrogen dynamics in relation to the streambed topography of a N-rich stream. - Biogeochem. **42**: 285-310.
- HMULV (2004): Bewirtschaftungsplan Mittelrhein, Regierungspräsidium Gießen, http://www.flussgebiete-hessen.de/geographie/mittelrhein/mr_steckbrief.html.
- HOCH, CHRISTEL (1999): Polyphasische Analyse der mikrobiellen Populationen des Spittelwassersediments. - Dissertation, TU Braunschweig.
- HÖFLE, M. G. & BRETTAR, I. (1996): Genotyping of heterotrophic bacteria from the Central Baltic Sea by use of low-molecular-weight RNA profiles. - Appl. and Environ. Microbiol. **62**: 1383-1390.
- HOLMES, R. M., FISHER, S. G. & GRIMM, N. B. (1994): Parafluvial nitrogen dynamics in a desert stream ecosystem. - J. N. Am. Benthol. Soc. **13**: 468-478.
- HOLMES, R. M., JONES, J. B., JR, FISHER, S. G. & GRIMM, N. B. (1996): Denitrification in a nitrogen-limited stream ecosystem. - Biogeochem. **33**: 125-146.
- HORAN, N. J. (1991): Biological wastewater treatment systems: theory and operation - Chapter 8: Nutrient removal from wastewaters. - John Wiley & Sons, Chichester.
- HÜBNER, D. (2003): Die Ablach- und Interstitialphase der Äsche (*Thymallus thymallus* L.) Grundlagen und Auswirkungen anthropogener Belastungen. - Dissertation, Universität Marburg.
- IBISCH, R. & BORCHARDT, D. (2003): Effects of periphyton biomass and suspended solids on river bed permeability and hyporheic oxygen balances. - Verh. Int. Verein. Limnol. **28**: 1875-1879.
- IBISCH, R., BORCHARDT, D. & SEYDELL, I. (zur Publikation angenommen): Influence of periphyton biomass dynamics on biological colmation processes in the hyporheic zone of a gravel river bed (River Lahn, Germany). - Arch. Hydrobiol.
- INGENDAHL, D. (1999): Der Reproduktionserfolg von Meerforelle (*Salmo trutta* L.) und Lachs (*Salmo salar* L.) in Korrelation zu den Milieubedingungen des hyporheischen Interstitials. - Dissertation, Universität Köln.

- INGENDAHL, D., TER HASEBORG, E., MEIER, M., VAN DER MOST, O., STEELE, H. & WERNER, D. (2002): Linking hyporheic community respiration and inorganic nitrogen transformation in the River Lahn (Germany). - Arch. Hydrobiol. **155**: 99-120.
- JENSEN, K., SLOTH, K. N. P., RISGAARD-PETERSON, N., RYSGAARD, S. & REVSBECH, N. P. (1994): Estimation of nitrification and denitrification from microprofiles of oxygen and nitrate in model sediment systems. - Appl. Environ. Microbiol. **60**: 2094-2100.
- JETTEN, M. S. M., LOGEMANN, S., MUYZER, G., ROBERTSON, L. A., DE VRIES, S., VAN LOOSDRECHT, M. C. M. & KUENEN, J. G. (1997): Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. - Antonie van Leeuwenhoek **71**: 75-93.
- JETTEN, M. S. M., SCHMID, M., SCHMIDT, I., WUBBEN, M., VAN DONGEN, U., ABMA, W., SLIEKERS, O., REVSBECH, N. P., BEAUMONT, H. J. E., OTTOSEN, L., VOLCKE, E., LAANBROEK, H. J., CAMPOS-GOMEZ, J. L., COLE, J., VAN LOOSDRECHT, M., MULDER, J. W., FUERST, J., RICHARDSON, D., VAN DE PAS, K., MENDEZ-PAMPIN, R., THIRD, K., CIRPUS, I., VAN SPANNING, R., BOLLMANN, A., NIELSEN, L. P., OP DEN CAMP, H., SCHULTZ, C., GUNDERSON, J., VANROLLEGHEM, P., STROUS, M., WAGNER, M. & KUENEN, J. G. (2002): Improved nitrogen removal by application of new nitrogen-cycle bacteria. - Re/Views in Environmental Science & Bio/Technology **1**: 51-63.
- JONES, J. B., FISHER, S. G. & GRIMM, N. B. (1995): Nitrification in the hyporheic zone of a desert stream ecosystem. - J. N. Amer. Benthol. Soc. **14**: 249-258.
- JORDAN, D. (2004): Charakterisierung von zytotoxischen *Pseudomonas aeruginosa* 'small colony variants' isoliert aus dem Respirationstrakt von Patienten mit Cystischer Fibrose. - Dissertation, Tierärztliche Hochschule Hannover.
- JÖRGENSEN, K. S. & PAULI, A. S.-L. (1995): Polyphosphate accumulation among denitrifying bacteria in activated sludge. - Anaerobe **1**: 161-168.
- KEEL, C., WELLER, D. M., NATSCH, A., DEFAGO, G., COOK, R. J. & THOMASHOW, L. S. (1996): Conservation of the 2,4-diacetylphloroglucinol biosynthesis locus among fluorescent *Pseudomonas* strains from diverse geographic locations. - Appl. and Environ. Microbiol. **62**: 552-563.
- KELSO, B. H. L., SMITH, R. V., LAUGHLIN, R. J. & LENNOX, S. D. (1997): Dissimilatory nitrate reduction in anaerobic sediments leading to river nitrite accumulation. - Appl. Environ. Microbiol. **63**: 4679-4685.
- KELSO, B. H. L., SMITH, R. V. & LAUGHLIN, R. L. (1999): Effects of carbon substrates on nitrite accumulation in freshwater sediments. - Appl. and Environ. Microbiol. **65**: 61-66.
- KLEE, O. (1985): Angewandte Hydrobiologie: Trinkwasser - Abwasser - Gewässerschutz. - Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- KNOWLES, R. (1982): Denitrification. - Microbiol. Rev. **46**: 43-70.
- KRAUSE, B. & NEALSON, K. H. (1997): Physiology and enzymology involved in denitrification by *Shewanella putrefaciens*. - Appl. and Environ. Microbiol. **63**: 2613-2618.
- KRETZER, H. (1992): Eine Methode zur tiefenorientierten Beprobung von Grund- und Bodenwasser. - Wasser und Boden (2): 77-78.

- LABBE, N., JUTEAU, P., PARENT, S. & VILLEMUR, R. (2003): Bacterial diversity in a marine methanol-fed denitrification reactor at the Montreal Biodome, Canada. - *Microb. Ecol.* **46**: 12-21.
- LACKO, N., DRYSDALE, G. D. & BUX, F. (2003): Anoxic phosphorus removal by denitrifying heterotrophic bacteria. - *Wat. Sci. Tech.* **47**: 17-22.
- LAGUERRE, G., ALLARD, M.-R., REVOY, F. & AMARGER, N. (1994a): Rapid identification of rhizobia by restriction fragment length polymorphism analysis of PCR-amplified 16S rRNA genes. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **60**: 56-63.
- LAGUERRE, G., RIGOTTIER-GOIS, L. & LEMANCEAU, P. (1994b): Fluorescent *Pseudomonas* species categorized by using polymerase chain reaction (PCR)/ restriction fragment analysis of 16S rDNA. - *Molecular Ecology* **3**: 479-487.
- LAMPERT, W. & SOMMER, U. (1993): *Limnoökologie*, 1. Auflage. - George Thieme Verlag. Stuttgart. New York.
- LANDESUMWELTAMT-NORDRHEIN-WESTFALEN (1993): *Deutsches Gewässerkundliches Jahrbuch, Rheingebiet, Teil III.* - LUA, Essen.
- LANDESUMWELTAMT-NORDRHEIN-WESTFALEN (2002): *Gewässergütebericht 2001, Berichtszeitraum 1995 - 2000.* - LUA, Essen.
- LEFF, L. G., DANA, J. R., MCARTHUR, J. V. & SHIMKETS, L. J. (1995): Comparison of methods of DNA extraction from stream sediments. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **61**: 1141-1143.
- LEISINGER, T. & MARGRAFF, R. (1979): Secondary metabolites of the fluorescent *Pseudomonads*. - *Microbiol. Rev.* **43**: 422-442.
- LEMKE, M. J., BROWN, B. J. & LEFF, L. G. (1997): The response of three bacterial populations to pollution in a stream. - *Microb. Ecol.* **34**: 224-231.
- LEMKE, M. J. & LEFF, L. G. (1999): Bacterial populations in an anthropogenically disturbed stream: Comparison of different seasons. - *Microb. Ecol.* **38**: 234-243.
- LEMMER, H., ZAGLAUER, A., NEEF, A., MEIER, H. & AMANN, R. (1997): Denitrification in a methanol-fed fixed-bed reactor. Part 2: Composition and ecology of the bacterial community in the biofilms. - *Wat. Res.* **31**: 1903-1908.
- LENK, M. (2000): *Hydraulische Austauschvorgänge zwischen Fließgewässer und Interstitial - Felduntersuchungen in einer Pool-Riffle Sequenz an der oberen Lahn.* - Wasserbauliche Mitteilungen des Instituts für Wasserbau und Wasserwirtschaft, TU Darmstadt.
- LENK, M. & SAENGER, N. (2000): Exchange processes in the river bed and their influence on temperature variations. - *Verh. Internat. Verein. Limnol.* **27**: 427-430.
- LIU, W.-T., MARSH, T. L., CHENG, H. & FORNEY, L. J. (1997): Characterization of microbial diversity by determining terminal restriction fragment length polymorphisms of genes encoding 16S rDNA. - *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4516-4522.

- LLOYD, D., BODDY, L. & DAVIES, K. J. P. (1987): Persistence of bacterial denitrification capacity under aerobic conditions: the rule rather than the exception. - FEMS Microbiol. Ecol. **45**: 185-190.
- LONDONG, J., BORCHARDT, D., FIRK, W., REICHERT, P., STEIN, M. & STROTMANN, U. (1994): Nitrit in Fließgewässern, Arbeitsbericht der ATV-Arbeitsgruppe 2.1.4 im Fachausschuss 2.1 der Abwassertechnischen Vereinigung (ATV). - Korrespondenz Abwasser **11**: 2069-2076.
- LORENZEN, J., LARSEN, L. H., KJAER, T. & REVSBECH, N. P. (1998): Biosensor determination of the microscale distribution of nitrate, nitrate assimilation, nitrification and denitrification in a diatom-inhabited freshwater sediment. - Appl. Environ. Microbiol. **64**: 3264-3269.
- LUDWIG, W. & SCHLEIFER, K. H. (1994): Bacterial phylogeny based on 16S and 23S rRNA sequence analysis. - FEMS Microbiol. Rev. **15**: 155-173.
- MAHNE, I. & TIEDJE, J. M. (1995): Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. - Appl. and Environ. Microbiol. **61**: 1110-1115.
- MANIATIS, T. A., FRISCH, E. F. & SAMBROOK, J. (1982): Molecular cloning, a laboratory manual. - Cold Spring Harbour Laboratory, New York.
- MANZ, W., WAGNER, M., AMANN, R. & SCHLEIFER, K. H. (1994): In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. - Wat. Res. **28**: 1715-1723.
- MARTINEZ, E., PARDO, M. A., PALACIOS, R. & CEVALLOS, M. A. (1985): Reiteration of nitrogen fixation gene sequences and specificity of *Rhizobium* in nodulation and nitrogen fixation in *Phaseolus vulgaris*. - J. Gen. Microbiol. **131**: 1779-1786.
- MASER, E., XIONG, G., GRIMM, C., FICNER, R. & REUTER, K. (2001): 3 α -Hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase from *Comamonas testosteroni*: biological significance, three-dimensional structure and gene regulation. - Chemico-Biological Interactions **130-132**: 707-722.
- MASSOL-DEYA, A., WELLER, R., RIOS-HERNANDEZ, L., ZHOU, J.-Z., HICKEY, R. F. & TIEDJE, J. M. (1997): Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. - Appl. Environ. Microbiol. **63**: 270-276.
- MAURER, M. (1996): Erhöhte biologische Phosphatelimination - Modellierung der biologischen und chemischen Prozesse. - Dissertation, ETH Zürich.
- MCDEVITT, C., BURRELL, P., BLACKALL, L. L. & MCEWAN, A. G. (2000): Aerobic nitrate respiration in a nitrite-oxidising bioreactor. - FEMS Microbiol. Lett. **184**: 113-118.
- MERGEL, A., SCHMITZ, O., MALLMANN, T. & BOTHE, H. (2001): Relative abundance of denitrifying and dinitrogen-fixing bacteria in layers of a forest soil. - FEMS Microbiol. Ecol. **36**: 33-42.
- MERMILLOD-BLONDIN, F., CREUZE DES CHATELLIERS, M., MARMONIER, P. & DOLE-OLIVIER, M.-J. (2000): Distribution of solutes, microbes and invertebrates in river sediments along a riffle-pool-riffle sequence. - Freshwater Biology **44**: 255-269.

- MERZOUKI, M., DELGENES, J.-P., BERNET, N., MOLETTA, R. & BENLEMLIH, M. (1999): Polyphosphate-accumulating and denitrifying bacteria isolated from anaerobic-anoxic and anaerobic-aerobic sequencing batch reactor. - *Current Microbiology* **38**: 9-17.
- METZ, S., BEISKER, W., HARTMANN, A. & SCHLOTTER, M. (2003): Detection methods for the expression of the dissimilatory copper-containing nitrite reductase gene (*DnirK*) in environmental samples. - *J. Microbiol. Methods* **55**: 41-50.
- MEYER, J. L., MCDOWELL, W. H., BOTT, T. L., ELWOOD, J. W., ISHIZAKI, C., MELACK, J. M., PECKARSKY, B. L., PETERSON, B. J. & RUBLEE, P. A. (1988): Elemental dynamics in streams. - *J. N. Amer. Benthol. Soc.* **7**: 410-432.
- MONTUELLE, B., VOLAT, B., TORIO-FERNANDEZ, M. M. & NAVARRO, E. (1996): Changes in *Nitrobacter* serotypes biodiversity in a river: impact of a wastewater treatment plant discharge. - *Wat. Res.* **30**: 1057-1064.
- MOYER, C. L., TIEDJE, J. M., DOBBS, F. C. & KARL, D. M. (1996): A computer-simulated restriction fragment length polymorphism analysis of bacterial small-subunit rRNA genes: Efficacy of selected tetrameric restriction enzymes for studies of microbial diversity in nature. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **62**: 2501-2507.
- MUYZER, G., DE WAAL, E. & UITTERLINDEN, A. G. (1993): Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **59**: 695-700.
- NEEF, A., ZAGLAUER, A., MEIER, H., AMANN, R., LEMMER, H. & SCHLEIFER, K. H. (1996): Population analysis in a denitrifying sand filter: conventional and in situ identification of *Paracoccus* spp. in methanol-fed biofilms. - *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4329-39.
- NIELSEN, T. H., NIELSEN, L. P. & REVSBECH, N. P. (1996): Nitrification and coupled nitrification-denitrification associated with a soil/manure interface. - *Soil Sci. Soc. Am. J.* **60**: 1829-1840.
- NIJHOF, M. & KLAPWIJK, A. (1995): Diffusional transport mechanisms and biofilm nitrification characteristics influencing nitrite levels in nitrifying trickling filter effluents. - *Wat. Res.* **29**: 2287-2292.
- NOGALES, B., TIMMIS, K. N., NEDWELL, D. B. & OSBORN, A. M. (2002): Detection and diversity of expressed denitrification genes in estuarine sediments after reverse transcription-PCR amplification from mRNA. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **68**: 5017-5025.
- ORGHIDAN, T. (1959): Ein neuer Lebensraum des unterirdischen Wassers: der hyporheische Biotop. - *Arch. Hydrobiol.* **55**: 392-414.
- OTTE, S., GROBBEN, N. G., ROBERTSON, L. A., JETTEN, M. S. & KUENEN, J. G. (1996): Nitrous oxide production by *Alcaligenes faecalis* under transient and dynamic aerobic and anaerobic conditions. - *Appl Environ Microbiol* **62**: 2421-6.
- PALLERONI, N. J. [A. BALOWS, TRÜPER H. G., DWORKIN M., HARDER W. & SCHLEIFER K.-H.] (1992): Human- and animal pathogenic Pseudomonads. -In: *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*, 2nd Ed., S. 3087-3100. Springer-Verlag, New York.

- PALLERONI, N. J. & BRADBURY, J. F. (1993): *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings et al. 1983. - Int. J. Syst. Bacteriol. **43**: 606-609.
- PAPEN, H., VON BERG, R., HINKEL, I., THOENE, B. & RENNENBERG, H. (1989): Heterotrophic nitrification by *Alcaligenes faecalis*: NO₂⁻, NO₃⁻, N₂O, and NO production in exponentially growing cultures. - Appl. and Environ. Microbiol. **55**: 2068-2072.
- PATUREAU, D., DAVISON, J., BERNET, N. & MOLETTA, R. (1994): Denitrification under various aeration conditions in *Comamonas* sp., strain SGLY2. - FEMS Microbiol. Ecol. **14**: 71-78.
- PATUREAU, D., BERNET, N. & MOLETTA, R. (1997): Combined nitrification and denitrification in a single aerated reactor using the aerobic denitrifier *Comamonas* sp. strain SGLY2. - Wat. Res. **31**: 1363-1370.
- PHILIPPOT, L., MIRLEAU, P., MAZURIER, S., SIBLOT, S., HARTMANN, A., LEMANCEAU, P. & GERMON, J. C. (2001): Characterization and transcriptional analysis of *Pseudomonas fluorescens* denitrifying clusters containing the *nar*, *nir*, *nor* and *nos* genes. - Biochimica et Biophysica **1517**: 436-440.
- PURDOM, C. E., HARDIMAN, P. A., BYE, V. J., ENO, N. C., TYLER, C. R. & SUMPTER, J. P. (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. - Chem. Ecol. **8**: 275-285.
- PUSCH, M. & SCHWOERBEL, J. (1994): Community respiration in hyporheic sediments of a mountain stream (Steina, Black Forest). - Arch. Hydrobiol. **130**: 35-52.
- PUSCH, M., FIEBIG, D., BRETTAR, I., EISENMANN, H., ELLIS, B. K., KAPLAN, L. A., LOCK, M. A., NAEGELI, M. W. & TRAUNSPURGER, W. (1998): The role of micro-organisms in the ecological connectivity of running waters. - Freshwat. Biol. **40**: 453-495.
- RANDALL, C. W. & BUTH, D. (1984): Nitrite build-up in activated sludge resulting from temperature effects. - Journal WPCF **56**: 1039-1044.
- REDECKER, D., FEDER, I. S., VINUESA, P., BATINIC, T., SCHULZ, U., KOSCH, K. & WERNER, D. (1999): Biocontrol strain *Pseudomonas* sp. W34: specific detection and quantification in the rhizosphere of *Cucumis sativus* with a DNA probe and genotypic characterization by DNA fingerprinting. - Z. Naturforsch. **54c**: 359-370.
- REGIERUNGSPRÄSIDIUM-GIEßEN [Hrsg] (1994): Modellhafte Erarbeitung eines ökologisch begründeten Sanierungskonzeptes für kleine Fließgewässer am Beispiel der Lahn, Abschlußbericht. - Gießen.
- RHEINHEIMER, G. (1965): Mikrobiologische Untersuchungen in der Elbe zwischen Schnackenburg und Cuxhaven. - Arch. Microbiol. **2**: 181-251.
- RHEINHEIMER, G. (1988): Stickstoffkreislauf im Wasser: Stickstoffumsetzungen in natürlichen Gewässern, in der Abwasserreinigung und Wasserversorgung. - Oldenbourg Verlag, München.
- ROBERTSON, L. A. & KUENEN, J. G. (1984): Aerobic denitrification: a controversy revived. - Arch. Microbiol. **139**: 351-354.

- ROBERTSON, L. A., DALSGAARD, T., REVSBECH, N. P. & KUENEN, J. G. (1995): Confirmation of "aerobic denitrification" in batch cultures, using gas chromatography and ^{15}N mass spectrometry. - *FEMS Microbiol. Ecol.* **18**: 113-120.
- SAENGER, N. (2000): Identifikation von Austauschprozessen zwischen Fließgewässer und hyporheischer Zone. - *Wasserbauliche Mitteilungen des Instituts für Wasserbau und Wasserwirtschaft, TU Darmstadt.*
- SAENGER, N. & LENK, M. (2000): Hydraulic head and tracer experiments - two techniques to examine the hydraulic exchange through a riffle. - *Verh. Int. Verein. Limnol.* **27**: 460-462.
- SAENGER, N. & ZANKE, U. (zur Publikation angenommen): A depth-oriented view of hydraulic exchange patterns between surface water and the hyporheic zone - Analysis of field experiments. - *Arch. Hydrobiol.*
- SAIKI, R. K., GELFAND, D. H., STOFFEL, S., SCHARF, S. J., R., HIGUCHI, HORN, G. T., MULLIS, K. B. & ERLICH, H. A. (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. - *Science* **239**: 487-491.
- SAKANO, Y., PICKERING, K. D., STROM, P. F. & KERKHOF, L. J. (2002): Spatial distribution of total, ammonia-oxidizing, and denitrifying bacteria in biological wastewater treatment reactors for bioregenerative life support. - *App. and Environ. Microbiol.* **68**: 2285-2293.
- SCHIPPER, L. A. & VOJVODIC-VUKOVIC, M. (2000): Nitrate removal from groundwater and denitrification rates in a porous treatment wall amended with sawdust. - *Ecological Engineering* **14**: 269-278.
- SCHLEGEL, H. G. (1981): *Allgemeine Mikrobiologie*. 5. Auflage. - George Thieme Verlag. Stuttgart, New York.
- SCHLOTTER, M., LEBUHN, M., HEULIN, T. & HARTMANN, A. (2000): Ecology and evolution of bacterial microdiversity. - *FEMS Microbiol. Rev.* **24**: 647-660.
- SCHMIDER, F. (1985): *Denitrifizierende Mikroflora in Kläranlagen und Gewässern*. Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft, Band 88. - Oldenbourg Verlag, München.
- SCHMIDT, J. (2002): *Methodische Konzeptionen zur Charakterisierung der funktionalen Rolle der interstitiellen Fauna im Hyporheal eines anthropogen belasteten Fließgewässers*. - Diplomarbeit, Universität Marburg.
- SCHÖNBORN, W. (1992): *Fließgewässerbiologie*, 1. Auflage. - Gustav Fischer Verlag. Jena, Stuttgart.
- SCHWICHTENBERG, L. (2003): *Die Bedeutung Pathogen-assoziiierter Moleküle bei der Induktion epithelialer antimikrobieller Proteine und proinflammatorischer Zytokine*. - Dissertation, Kiel.
- SCHWOERBEL, J. (1961): *Über die Lebensgemeinschaft und die Besiedlung des hyporheischen Lebensraumes*. - *Arch. Hydrobiol. Suppl.* **25**: 182-214.
- SCHWOERBEL, J. (1999): *Einführung in die Limnologie*, 8. Auflage. - George Thieme Verlag. Stuttgart.

- SEITZINGER, S. P. (1996): Estimating denitrification in North Atlantic continental shelf sediments. - *Biogeochem.* **35**: 235-260.
- SENGSCHMITT, D., STEINER, K.-H., BLASCHKE, A. P. & GUTKNECHT, D. (1999): Selbstdichtungsvorgänge im Stauraum Wien - Freudenau. - *Perspektiven* **2**: 46-49.
- SERVAIS, P., GARNIER, J., DEMARTEAU, N., BRION, N. & BILLEN, G. (1999): Supply of organic matter and bacteria to aquatic ecosystems through waste water effluents. - *Wat. Res.* **33**: 3521-3531.
- SHIGEMATSU, T., YUMIHARA, K., UEDA, Y., NUMAGUCHI, M., MORIMURA, S. & KIDA, K. (2003): *Delftia tsuruhatensis* sp. nov., a terephthalate-assimilating bacterium isolated from activated sludge. - *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53**: 1479-1483.
- SIMEK, M. & COOPER, J. E. (2002): The influence of soil pH on denitrification: progress towards the understanding of this interaction over the last 50 years. - *European Journal of Soil Science* **53**: 345-354.
- SMITH, R. V., FOY, R. H., LENNOX, S. D., JORDAN, C., BURNS, L. C., COOPER, J. E. & STEVENS, R. J. (1995): The occurrence of nitrite in the Lough Neagh River system. - *Journal of Environmental Quality* **24**: 952-959.
- SMITH, R. V., DOYLE, R. M., BURNS, L. C. & STEVENS, R. J. (1997): A model for nitrite accumulation in soils. - *Soil Biol. & Biochem.* **29**: 1241-1247.
- SOKAL, R. R. & MICHERNER, C. D. (1958): A statistical method for evaluating systematic relationships. - *Univ. Kans. Sci. Bull.* **38**: 1409-1438.
- SPIERS, A. J., BUCKLING, A. & RAINEY, P. B. (2000): The cause of *Pseudomonas* diversity. - *Microbiology* **146**: 2345-2350.
- SPRENGLER, P. (2001): Identifizierung und Quantifizierung von Verbindungen mit östrogenen Wirkung im Abwasser. - Dissertation, Stuttgart.
- STACKEBRANDT, E. & GOEBEL, B. M. (1994): Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. - *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**: 846-849.
- STAHL, D. A., FLESHER, B., MANSFIELD, H. R. & MONTGOMERY, L. (1988): Use of phylogenetically based hybridization probes for studies of ruminal microbial ecology. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **54**: 1079-1084.
- STEFFEN, U. M. (1995): Milieubedingungen und Biozönose im hyporheischen Interstitial der Lahn unter dem Einfluß von Kläranlagenabwässern. - Diplomarbeit, Universität Marburg.
- STEVENS, R. J., LAUGHLIN, R. J. & MALONE, J. P. (1998): Soil pH affects the process reducing nitrate to nitrous oxide and di-nitrogen. - *Soil Biol. & Biochem.* **30**: 1119-1126.
- STIEF, P. & NEUMANN, D. (1998): Nitrite formation in sediment cores from nitrate-enriched running waters. - *Arch. Hydrobiol.* **142**: 153-169.

- STIEF, P., DE BEER, D. & NEUMANN, D. (2002): Small-scale distribution of interstitial nitrite in freshwater sediment microcosms: The role of nitrate and oxygen availability, and sediment permeability. - *Microbiol. Ecol.* **43**: 367-378.
- STOLZ, J. F. & BASU, P. (2002): Evolution of nitrate reductase: Molecular and structural variations on a common function. - *ChemBioChem* **3**: 198-206.
- STOVER, C. K., PHAM, X. Q., ERWIN, A. L., MIZOGUCHI, S. D., WARRENER, P., HICKEY, M. J., BRINKMAN, F. S., HUFNAGLE, W. O., KOWALIK, D. J., LAGROU, M., GARBER, R. L., GOLTRY, L., TOLENTINO, E., WESTBROCK-WADMAN, S., YUAN, Y., BRODY, L. L., COULTER, S. N., FOLGER, K. R., KAS, A., LARBIG, K., LIM, R., SMITH, K., SPENCER, D., WONG, G. K., WU, Z., PAULSEN, I. T., REIZER, J., SAIER, M. H., HANCOCK, R. E., LORY, S. & OLSON, M. V. (2000): Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. - *Nature* **406**: 959-964.
- SUMPTER, J. P. (1995): Feminized responses in fish to environmental estrogens. - *Toxicol. Lett.* **82-83**: 737-742.
- SUTHERSAN, S. & GANCZARCZYK, J. J. (1986): Inhibition of nitrite-oxidation during nitrification - Some observations. - *Wat. Pollut. Res. J. Can.* **21**: 257-266.
- SWINGS, J., LAMBERT, B., KERSTERS, K. & HOLMES, B. [A. BALOWS, TRÜPER H. G., DWORKIN M., HARDER W. & SCHLEIFER K.-H.] (1992): The genera *Pseudomonadaceae* and *Ochrobactrum*. -In: *The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria*, 2nd Ed., S. 2602-2605. Springer-Verlag, New York.
- TER HASEBORG, E., MEIER, M., INGENDAHL, D. & WERNER, D. (zur Publikation angenommen): Denitrifying bacterial populations in the hyporheic zone of the River Lahn (Germany): spatial and temporal distribution and the significance of external inputs. - *Arch. Hydrobiol.*
- THAMDRUP, B. & DALSGAARD, T. (2002): Production of N₂ through anaerobic ammonium oxidation coupled to nitrate reduction in marine sediments. - *Appl. and Environ. Microbiol.* **68**: 1312-1318.
- THOMPSON, J. D., GIBSON, T. J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F. & HIGGINS, D. G. (1997): The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. - *Nucl. Acids Res.* **25**: 4876-4882.
- TIEDJE, J. M. [A. J. B. ZEHNDER] (1988): Ecology of denitrification and dissimilatory nitrate reduction to ammonium. -In: *Biology of anaerobic microorganisms*, S. 179-244. John Wiley and Sons, New York.
- TIEDJE, J. M. [R. W. WEAVER, ANGLE J. S & BOTTOMLEY P. S.] (1994): Denitrifiers. -In: *Methods of soil analysis. Part 2: Microbiological and biochemical properties*, S. 245-267. Soil Sci. Soc. Amer., Madision.
- TOMASZEK, J. A. & CZERWIENCIEC, E. (2000): In situ denitrification measurements in reservoir sediments: an example from southeast Poland. - *Ecological Engineering* **16**: 61-71.
- TRISKA, F. J., KENNEDY, V. C., AVANZINO, R. J., ZELLWEGER, G. W. & BENCALA, K. E. (1989): Retention and transport of nutrients in a third-order stream in northwestern California: Hyporheic processes. - *Ecology* **70**: 1893-1905.

- VAN BENNEKOM, A. J., BERGER, G. W., HELDER, W. & DE VRIES, R. T. P. (1978): Nutrient distribution in the Zaire estuary and river plume. - Neth. J. Sea Res. **12**: 296-323.
- VAN SPANNING, R. J. M., DELGADO, M. J. & RICHARDSON, D. J. (2003): The nitrogen cycle: Denitrification and relationship to N₂ fixation. -In: Nitrogen fixation research: Origins and Progress. - Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- VAUX, W. G (1968): Intragravel flow and interchange of water in a streambed. - U. S. Fish. Wild. Serv. Fish. **66**.
- VINUESA, P. (1998): Genotypic and phenotypic analysis of *Rhizobium etli* and *Rhizobium tropici* mutants defective in lipopolysaccharide synthesis and acid tolerance, and applications of genomic typing methods. - Dissertation, Marburg.
- VON DER WIESCHE, M. & WETZEL, A. (1998): Temporal and spatial dynamics of nitrite accumulation in the River Lahn. - Wat. Res. **32**: 1653-1661.
- WAGNER, M., ERHART, R., MANZ, W., AMANN, R., LEMMER, H., WEDI, D. & SCHLEIFER, K. H. (1994): Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for *in situ* monitoring in activated sludge. - Appl. and Environ. Microbiol. **60**: 792-800.
- WAIBEL, A. E., PETER, T., CARSLAW, K. S., OELHAF, H., WETZEL, G., CRUTZEN, P. J., POSCHL, U., TSIAS, A., REIMER, E. & FISCHER, H. (1999): Arctic ozone loss due to denitrification. - Science **283**: 2064-2169.
- WANG, H. & GUNSALUS, R. P. (2000): The *nrfA* and *nirB* nitrite reductase operons in *Escherichia coli* are expressed differently in response to nitrate than to nitrite. - J. Bacteriol. **182**: 5813-5822.
- WANG, Z. (1998): Application of biofilm kinetics to the sulfur/lime packed bed reactor for autotrophic denitrification of groundwater. - Wat. Sci. Tech. **37**: 97-104.
- WARD, B. B. (1995): Diversity of culturable denitrifying bacteria. Limits of rDNA RFLP analysis and probes for the functional gene, nitrite reductase. - Arch. Microbiol. **163**: 167-175.
- WEGSCHEIDER (2004): Untersuchungen zu *Bacillus cereus* Enterotoxin-Komplexen auf zellulärer Ebene. - Universität München.
- WEIER, K. L. & MACRAE, I. C. (1992): Denitrifying bacteria in the profile of a brigalow clay soil beneath a permanent pasture and a cultivated crop. - Soil Biol. & Biochem. **24**: 919-923.
- WEISBURG, W. G., BARNS, S. M., PELLETIER, D. A. & LANE, D. J. (1991): 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. - J. Bacteriol. **173**: 697-703.
- WEN, A., FEGAN, M., HAYWARD, C., CHARKRABORTY, S. & SLY, L. I. (1999): Phylogenetic relationships among members of the *Comamonadaceae*, and description of *Delftia acidovorans* (den Dooren de Jong 1926 and Tamaoka et al. 1987) gen. nov., comb. nov. - Int. J. Syst. Evol. Microbiol. **49**.
- WERNER, D., WILCOCKSON, J. & ZIMMERMANN, E. (1975): Adsorption and selection of Rhizobia with ion-exchange papers. - Arch. Microbiol. **105**: 27-32.

- WISE, M. G, SHIMKETS, L. J. & MCARTHUR, J. V. (1995): Genetic structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. - Appl. and Environ. Microbiol. **61**: 1791-1798.
- WISE, M. G, MCARTHUR, J. V., WHEAT, C. & SHIMKETS, L. J. (1996): Temporal variation in genetic diversity and structure of a lotic population of *Burkholderia (Pseudomonas) cepacia*. - Appl. and Environ. Microbiol. **62**: 1558-1562.
- WITZSCHE, A. (1999): Erprobung einer Entnahmetechnik für Porenwasser aus der Fließgewässersohle mittels Multilevel-Sonden. - Diplomarbeit, TU Darmstadt.
- XIONG, G. & MASER, E. (2001): Regulation of the steroid-inducible 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase/carbonyl reductase gene in *Comamonas testosteroni*. - J. Biol. Chem. **276**: 9961-9970.
- YAMAMOTO, S., KASAI, H., ARNOLD, D. L., JACKSON, R. W., VIVIAN, A. & HARAYAMA, S. (2000): Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: Intergeneric structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. - Microbiology **146**: 2345-2394.
- YANG, L. & ALLEMAN, J. E. (1992): Investigation of batchwise nitrite build-up by an enriched nitrification culture. - Wat. Sci. Tech. **26**: 997-1005.
- YOSHIE, S., NODA, N., MIYANO, T., TSUNEDA, S., HIRATA, A. & INAMORI, Y. (2001): Microbial community analysis in the denitrification process of saline-wastewater by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA and cultivation method. - J. Biosci. Bioeng. **92**: 346-353.
- ZIEMKE, F., BRETTAR, I. & HÖFLE, M. G. (1997): Stability and diversity of the genetic structure of a *Shewanella putrefaciens* population in the water column of the central Baltic. - Aquat. Microbiol. Ecol. **13**: 63-74.
- ZIEMKE, F., HÖFLE, M. G., LALUCAT, J. & ROSSELLO-MORA, R. (1998): Reclassification of *Shewanella putrefaciens* Owen's genomic group II as *Shewanella baltica* sp. nov. - Int. J. Syst. Bacteriol. **48**: 179-186.
- ZUMFT, W. G. [A. BALOWS, TRÜPER H. G., DWORKIN M., HARDER W. & SCHLEIFER K.-H.] (1992): The denitrifying prokaryotes. -In: The Prokaryotes: a handbook on the biology of bacteria, 2nd Ed., S. 554-582. Springer-Verlag, New York.
- ZUMFT, W. G. (1997): Cell biology and molecular basis of denitrification. - Microbiol. Mol. Biol. Rev. **61**: 533-616.

ANHANG

A.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Ampere
A. bidest.	Aqua bidestillata
Abs	Absorption
Ap	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C	Cytosin
°C	Grad Celsius
Cm	Chloramphenicol
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
Cys	Cystein
d	Tage (days)
DMF	N, N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ddNTP	Didesoxynukleosid-5'-triphosphat (N = G, A, T oder C)
dNTP	Desoxynukleosid-5'-triphosphat (N = G, A, T oder C)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
EW	Einwohnerwerte
g	Gramm
G	Guanin
h	Stunde (hour)
kb	Kilobasen
Km	Kanamycin
l	Liter
Lsg.	Lösung
m	Meter
M	Mol·l ⁻¹
min	Minute
μ	Mikro
n	Anzahl der Stichproben
N	Stickstoff
NN	Normalnull
NH ₄ -N	Ammonium-Stickstoff
NO ₂ -N	Nitrit-Stickstoff
NO ₃ -N	Nitrat-Stickstoff
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte

p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PCR	Polymerase Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
pH	negativ dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
rDNA	ribosomale DNA
rpm	Umdrehungen pro Minute (revolutions per min)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
S	Siemens
SDS	Natriumdodecylsulfat (Sodiumdodecylsulfate)
spec.	Spezies (nicht näher definierte Art einer Gattung)
Stabw.	Standardabweichung
T	Thymin
TA	Tris Acetat
TBE	Trisborat EDTA
TE	Tris EDTA
TIF	Tagged image file
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units (Einheit der Enzymaktivität)
U	Uracil
ü.N.	über Nacht
UPGMA	Unweighted pair-goup method arithmetic average
UV	ultraviolett
v	Volumen
V	Volt
v:v	Volumen pro Volumen (volume per volume)
W	Watt
w:v	Masse pro Volumen (weight per volume)
x	mal
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-b-D-Galactopyranosid

Die verwendeten chemischen Formeln, Symbole und Einheiten entsprechen den internationalen Standards.

A.2 Tabellen

Tab. A.2.23: Tabellarische Darstellung der Ammonium-, Nitrat-, und Nitritkonzentration im Klärwasser der Kläranlage Sarnau in den Jahren 1999 bis 2001 (Daten des Abwasserverbandes Lahn-Wetschaft).

	NH ₄ -N	NO ₃ -N	NO ₂ -N		NH ₄ -N	NO ₃ -N	NO ₂ -N		NH ₄ -N	NO ₃ -N	NO ₂ -N
1999	[mg l ⁻¹]	[mg l ⁻¹]	[mg l ⁻¹]	2000	[mg l ⁻¹]	[mg l ⁻¹]	[mg l ⁻¹]	2001	[mg l ⁻¹]	[mg l ⁻¹]	[mg l ⁻¹]
Januar	10,60	3,80	0,40	Januar	7,10	3,50	0,50	Januar	0,62	2,54	0,26
	12,40	2,90	0,60		8,30	3,20	0,40		1,98	5,03	0,57
	9,60	3,10	0,50		11,40	2,60	0,30		2,69	2,32	0,19
Februar	9,50	3,40	0,10	Februar	7,90	2,40	0,20	Februar	0,69	5,35	0,60
	13,90	8,60	0,40		3,80	5,80	0,30		1,39	3,21	0,23
	9,40	4,30	0,70		12,90	0,50	3,10		3,17	4,36	0,49
März	14,10	1,90	0,50	März	8,30	4,80	0,90	März	5,38	1,23	0,30
	4,80	5,10	0,20		6,30	4,40	0,40		3,22	1,70	0,17
	9,20	4,50	0,60		6,40	2,90	0,30		7,23	2,99	0,28
April	8,50	3,20	0,40	April	7,90	2,60	0,10	April	3,60	4,46	0,19
	5,70	3,60	0,30		9,30	4,90	0,10		3,60	6,74	0,14
	9,70	3,30	0,40		10,80	4,30	0,00		2,22	5,18	0,08
Mai	6,80	4,40	0,40	Mai	6,10	5,20	0,00	Mai	2,96	5,81	0,10
	7,20	3,70	0,40		3,70	10,30	0,40		2,01	2,87	0,09
	7,90	2,90	0,30		0,60	15,30	0,00		4,24	6,56	0,11
Juni	9,40	2,60	0,20	Juni	1,10	15,50	0,10	Juni	2,47	3,32	0,10
	9,10	2,80	0,10		9,90	15,00	0,30		1,24	3,32	0,09
	8,70	2,50	0,20		2,90	10,10	0,20		1,86	5,40	0,12
Juli	7,80	2,40	0,20	Juli	8,50	15,00	0,50	Juli	1,85	8,15	0,26
	10,10	2,60	0,10		11,10	18,30	0,50		0,82	9,04	0,20
	8,50	2,40	0,00		2,90	11,90	0,30		3,17	3,82	0,15
August	9,20	2,10	0,10	August	1,60	11,20	0,80	August	2,57	4,99	0,16
	7,60	2,50	0,10		2,30	14,70	0,70		0,96	2,85	0,10
	16,60	2,00	0,00		1,20	15,30	0,40		0,60	1,68	0,10
September	7,50	0,10	0,10	September	0,90	7,80	0,20	September	0,56	1,74	0,04
	7,60	2,30	0,00		0,70	6,80	0,10		0,31	1,62	0,02
	11,30	1,60	0,00		1,10	7,30	0,10		0,71	1,51	0,06
Oktober	9,70	1,20	0,00	Oktober	0,10	8,30	0,00	Oktober	0,55	2,22	0,08
	10,40	1,40	0,40		0,10	17,80	0,10		0,55	3,55	0,12
	9,80	1,30	0,00		0,20	21,20	0,10		1,72	2,50	0,07
November	7,90	1,40	0,10	November	0,30	20,40	0,20	November	0,71	2,14	0,09
	9,10	1,50	0,00		0,20	15,80	0,20		0,52	2,01	0,04
	7,20	4,00	0,60		0,10	18,40	0,10		0,34	3,04	0,07
Dezember	10,70	1,70	0,00	Dezember	0,20	18,30	0,30	Dezember	0,56	2,77	0,03
	10,30	1,30	0,00		0,00	20,10	0,00		0,73	2,79	0,05
	8,70	1,70	0,10		0,10	11,00	0,00		3,44	1,92	0,06
Januar	6,20	2,40	0,10	Januar	0,30	8,60	0,10	Januar	5,41	1,05	0,06
	9,60	1,60	0,00		0,30	7,90	0,10		9,88	1,09	0,05
	9,90	1,80	0,10		0,40	10,30	0,10		6,82	2,23	0,06
Februar	8,60	1,50	0,00	Februar	0,30	12,00	0,10	Februar	3,84	4,18	0,09
	1,40	1,30	0,00		0,30	8,80	0,10		5,75	3,89	0,08
	8,70	1,70	0,10		0,80	11,90	0,20		4,92	5,41	0,20
März	11,80	1,60	0,10	März	0,20	12,20	0,10	März	2,67	2,74	0,19
	9,50	2,30	0,20		0,60	12,50	0,20		2,74	2,95	0,30
	17,10	0,70	0,20		0,40	12,40	0,20		1,00	4,29	0,34
April	8,20	2,40	0,10	April	0,30	7,30	0,30	April			
	6,90	3,30	0,30		0,20	13,40	0,30				
	7,50	4,60	0,20		1,90	3,60	0,30				

Tab. A.2.24: Tabellarische Darstellung der Ammoniumkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA) im Probenahmezeitraum 1999-2001.

NH₄-N [mg l⁻¹]														
	6.7.99	21.9.99	16.11.99	22.3.00	19.5.00	26.6.00	10.7.00	24.7.00	14.8.03	4.9.00	26.9.00	1.5.01	3.7.01	16.10.01
FW V	0,091	0,020	0,139	0,170	0,512	0,076	0,364	0,070	0,049	0,038	0,020	0,007	0,081	0,020
I 5cm	0,027	0,000	0,033	0,023	0,312	0,021	0,296	0,100	0,067	0,016	0,000	0,003	0,012	0,000
I 15cm	0,000	0,000	0,003	0,010	0,219	0,006	0,243	0,065	0,037	0,033	0,000	0,000	0,046	0,000
I 25cm	0,000	0,000	0,020	0,008	0,175	0,027	0,270	0,046	0,019	0,013	0,000	0,000	0,019	0,000
I 45cm	0,000	0,000	0,000	0,012	0,159	0,021	0,208	0,065	0,027	0,025	0,013	0,000	0,012	0,000
III 5cm	0,013	0,000	0,009	0,045	0,159	0,025	0,197	0,040	0,027	0,016	0,015	0,000	0,118	0,007
III 15cm	0,000	0,000	0,000	0,009	0,159	0,008	0,277	0,024	0,040	0,008	0,009	0,000	0,007	0,005
III 25cm	0,000	0,000	0,009	0,006	0,159	0,013	0,151	0,043	0,032	0,021	0,000	0,000	0,062	0,005
III 45cm	0,000	0,000	0,000	0,009	0,159	0,014	0,224	0,033	0,051	0,010	0,010	0,000	0,112	0,005
KA	2,131	11,241	7,205	8,319	1,662	0,588	0,657	0,272	0,092	0,111	0,963	0,472	0,474	1,020
V 5cm	0,402	0,306	0,000	0,031	0,304	0,086	0,224	0,067	0,068	0,032	0,007	0,005	0,556	0,000
V 15cm	0,000	0,000	0,000	0,008	0,315	0,017	0,154	0,062	0,046	0,049	0,018	0,000	0,089	0,000
V 25cm	0,000	0,000	0,001	0,020	0,315	0,064	0,191	0,072	0,040	0,022	0,000	0,000	0,013	0,000
V 45cm	0,000	0,019	0,006	0,012	0,361	0,073	0,219	0,092	0,068	0,038	0,011	0,000	0,028	0,000
VII 5cm	0,415	1,565	0,756	0,053	0,351	0,161	0,197	0,094	0,068	0,051	0,019	0,000	0,095	0,000
VII 15cm	0,467	0,596	0,005	0,023	0,288	0,059	0,202	0,062	0,033	0,043	0,018	0,000	0,489	0,000
VII 25cm	0,732	1,116	0,000	0,018	0,313	0,054	0,154	0,086	0,033	0,056	0,010	0,000	0,239	0,000
VII 45cm	0,425	0,429	0,004	0,004	0,135	0,029	0,027	0,035	0,022	0,027	0,019	0,000	0,016	0,000
FW N	0,740	1,886	0,588	0,371	0,655	0,033	0,302	0,087	0,045	0,056	0,040	0,080	0,235	0,235

Tab. A.2.25: Tabellarische Darstellung der Nitratkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA) im Probenahmezeitraum 1999-2001.

NO₃-N [mg l⁻¹]													
	6.7.99	21.9.99	16.11.99	22.3.00	10.7.00	24.7.00	14.8.00	4.9.00	26.9.00	1.5.01	3.7.01	16.10.01	
FW V	3,313	5,072	2,790	2,165	1,980	1,590	2,310	2,000	2,280	0,894	0,000	2,110	
I 5cm	7,310	1,628	2,354	2,180	2,270	1,680	2,320	1,960	0,590	2,011	0,000	2,330	
I 15cm	6,656	2,369	6,423	2,325	2,080	1,710	2,240	1,940	1,030	0,419	1,933	2,290	
I 25cm	3,371	3,996	3,023	2,645	2,150	1,710	2,190	1,950	7,660	0,744	0,930	2,260	
I 45cm	1,511	4,360	1,933	3,328	2,130	1,570	2,240	2,070	8,710	0,000	0,334	2,150	
III 5cm	2,456	4,854	2,906	3,110	1,890	0,920	1,180	1,140	8,460	1,240	0,683	1,060	
III 15cm	3,124	4,040	1,860	2,848	1,950	0,880	1,260	1,200	8,380	1,013	0,087	0,810	
III 25cm	2,151	4,243	1,817	4,200	1,790	0,970	1,230	1,020	0,470	2,189	1,511	0,920	
III 45cm	2,049	3,328	2,369	2,252	1,930	0,960	1,160	0,840	8,780	0,348	1,250	0,850	
KA	1,468	1,192	1,235	2,906	9,300	12,130	12,980	9,740	2,960	1,260	0,189	2,190	
V 5cm	3,110	1,439	3,197	3,342	3,750	4,170	3,780	2,820	2,640	0,649	1,511	2,350	
V 15cm	1,599	0,058	2,921	3,836	3,020	4,080	3,890	2,900	2,780	0,226	0,901	2,210	
V 25cm	1,293	1,744	2,238	3,023	2,840	3,370	3,780	2,880	2,620	1,966	0,000	2,350	
V 45cm	1,366	1,555	1,918	3,459	2,930	4,230	3,880	2,930	2,670	0,429	0,538	2,230	
VII 5cm	3,604	4,897	3,095	2,761	2,680	3,420	3,600	2,450	2,740	0,000	2,848	2,390	
VII 15cm	5,493	3,982	3,183	2,994	2,580	3,090	3,570	2,500	2,740	0,406	2,659	2,480	
VII 25cm	7,222	4,665	-	3,386	2,710	3,260	3,520	2,500	2,740	1,171	2,776	2,440	
V 45cm	2,848	4,200	3,778	3,270	2,610	3,370	3,340	2,280	2,750	1,956	1,744	2,480	
FW N	2,659	3,924	2,296	2,485	2,460	3,220	3,640	2,450	5,800	0,000	0,116	2,190	

Tab. A.2.26: Tabellarische Darstellung der Nitritkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA) im Probenahmezeitraum 1999-2001.

NO₂-N [mg l⁻¹]														
	6.7.99	21.9.99	16.11.99	22.3.00	19.5.00	26.6.00	10.7.00	24.7.00	14.8.00	4.9.00	26.9.00	1.5.01	3.7.01	16.10.01
FW V	0,128	0,018	0,062	0,042	0,234	0,083	0,096	0,048	0,037	0,052	0,073	0,094	0,140	0,012
I 5cm	0,046	0,008	0,037	0,011	0,155	0,032	0,055	0,015	0,012	0,029	0,050	0,005	0,084	0,001
I 15cm	0,019	0,032	0,032	0,001	0,099	0,027	0,034	0,012	0,010	0,026	0,038	0,016	0,118	0,001
I 25cm	0,040	0,062	0,020	0,001	0,068	0,022	0,041	0,012	0,006	0,015	0,147	0,015	0,126	0,000
I 45cm	0,083	0,012	0,023	0,000	0,064	0,028	0,034	0,012	0,007	0,016	0,147	0,008	0,043	0,001
III 5cm	0,051	0,002	0,016	0,001	0,035	0,033	0,030	0,024	0,016	0,011	0,098	0,000	0,064	0,000
III 15cm	0,088	0,022	0,022	0,000	0,020	0,022	0,057	0,017	0,017	0,014	0,112	0,011	0,082	0,000
III 25cm	0,069	0,012	0,018	0,001	0,028	0,033	0,025	0,020	0,019	0,016	0,084	0,011	0,080	0,000
III 45cm	0,019	0,001	0,017	0,001	0,026	0,024	0,048	0,017	0,020	0,022	0,072	0,013	0,094	0,000
KA	0,047	0,046	0,118	0,076	0,320	0,417	0,192	0,123	0,101	0,088	0,117	0,231	0,088	0,015
V 5cm	0,014	0,031	0,098	0,002	0,155	0,085	0,058	0,028	0,017	0,020	0,149	0,197	0,207	0,017
V 15cm	0,179	0,316	0,301	0,001	0,146	0,047	0,043	0,023	0,020	0,018	0,274	0,064	0,370	0,035
V 25cm	0,085	0,317	0,231	0,001	0,137	0,061	0,050	0,022	0,018	0,015	0,246	0,174	0,370	0,028
V 45cm	0,085	0,378	0,238	0,001	0,112	0,065	0,051	0,024	0,015	0,014	0,234	0,224	0,472	0,032
VII 5cm	0,249	0,101	0,067	0,020	0,126	0,034	0,042	0,020	0,012	0,010	0,008	0,003	0,054	0,000
VII 15cm	0,156	0,010	0,026	0,005	0,136	0,053	0,064	0,028	0,017	0,022	0,004	0,006	0,053	0,000
VII 25cm	0,255	0,091	n.d.	0,001	0,108	0,058	0,054	0,035	0,022	0,038	0,003	0,028	0,118	0,000
VII 45cm	0,017	0,018	0,027	0,000	0,072	0,061	0,047	0,010	0,030	0,012	0,014	0,082	0,206	0,000
FW N	0,126	0,033	0,074	0,040	0,237	0,116	0,095	0,060	0,045	0,058	0,084	0,115	0,133	0,012

Tab. A.2.27: Tabellarische Darstellung der Sauerstoffkonzentration der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm 25 cm und 25 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenablaufes und des Klärwassers (KA) im Probenahmezeitraum 1999-2001.

Sauerstoff [mg l⁻¹]														
	6.7.99	21.9.99	16.11.99	22.3.00	19.5.00	26.6.00	10.7.00	24.7.00	14.8.03	4.9.00	26.9.00	1.5.01	3.7.01	16.10.01
FW V	8,21	8,64	12,47	11,30	8,30	10,50	8,80	9,30	9,60	9,80	10,67	11,20	15,10	10,30
I 5cm	6,49	-	10,90	9,20	6,80	7,70	6,70	6,30	7,00	8,50	5,33	6,10	10,17	7,60
I 15cm	4,45	5,70	8,37	8,60	5,60	7,10	5,90	6,00	6,80	8,00	5,73	3,90	8,53	6,51
I 25cm	3,55	5,03	7,83	8,80	4,50	7,50	6,30	6,20	5,80	7,00	4,57	3,93	7,93	6,07
I 45cm	3,37	5,21	10,17	8,60	4,60	7,80	6,10	5,80	6,60	7,80	4,13	4,77	10,30	6,56
III 5cm	4,40	4,19	9,00	4,10	2,20	2,40	4,90	1,60	1,20	1,50	3,58	3,20	7,23	3,81
III 15cm	4,52	3,56	8,70	4,20	3,10	2,10	6,80	1,30	1,10	2,20	3,02	3,50	7,13	3,94
III 25cm	4,07	3,99	8,13	3,70	3,70	1,30	3,70	1,40	1,00	1,50	3,23	3,73	7,17	3,59
III 45cm	4,04	3,78	8,87	3,60	3,30	1,10	6,20	1,40	0,70	1,40	3,44	3,83	6,83	3,73
KA	5,15	4,04	6,73	5,00	6,90	4,90	5,70	6,00	5,80	6,50	6,97	13,10	12,50	6,87
V 5cm	7,20	5,97	6,47	7,50	6,90	7,80	6,20	7,20	7,10	7,40	2,80	4,27	8,63	6,57
V 15cm	6,68	4,54	4,67	7,00	6,90	6,40	5,30	6,30	8,40	8,00	3,07	5,17	7,60	6,16
V 25cm	6,12	5,48	4,30	7,30	6,10	7,10	5,90	6,60	8,10	7,50	4,33	4,13	7,20	6,17
V 45cm	6,70	4,23	4,77	7,40	5,40	7,80	6,30	6,90	8,40	7,50	2,87	4,67	7,80	6,21
VII 5cm	6,89	6,31	7,93	9,50	7,10	7,00	6,80	6,40	5,70	6,80	9,23	2,93	6,17	6,83
VII 15cm	5,54	3,89	4,33	7,80	6,90	7,60	7,80	7,50	7,40	8,40	6,63	2,47	5,87	6,32
VII 25cm	6,60	5,80	-	6,20	5,20	6,90	7,20	6,80	7,40	8,60	7,37	2,63	5,67	6,36
VII 45cm	5,70	3,51	4,77	6,80	4,30	2,10	2,20	3,20	2,50	3,20	6,00	3,17	5,63	4,08
FW N	7,70	7,01	11,90	10,25	8,90	9,40	9,00	9,10	8,80	9,00	10,45	6,90	15,35	9,52

Tab. A.2. 28: Tabellarische Darstellung des pH-Wertes der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, der Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts des Kläranlagenabflusses (FW N) und des Klärwassers (KA) im Probenahmezeitraum 1999-2001.

pH-Wert													
	6.7.99	21.9.99	16.11.99	22.3.00	19.5.00	26.6.00	10.7.00	24.7.00	14.8.00	26.9.00	1.5.01	3.7.01	16.10.01
FW V	7,7	7,8	7,2	7,5	7,4	7,3	7,5	7,5	7,8	7,9	8,1	6,7	7,5
I 5cm	7,6	7,9	6,9	7,1	7,3	7,3	7,1	7,2	7,5	8,1	6,8	6,6	7,3
I 15cm	7,5	7,5	7,0	7,2	7,3	7,3	7,1	7,2	7,4	7,4	6,7	6,7	7,2
I 25cm	7,4	7,5	7,0	7,1	7,2	7,3	7,2	7,2	7,3	7,3	6,7	6,7	7,2
I 45cm	7,3	7,4	7,0	7,2	7,2	7,3	7,2	7,2	7,3	7,2	6,8	6,9	7,2
III 5cm	6,9	7,4	7,1	7,3	7,3	7,0	7,1	7,1	6,9	7,1	6,5	6,6	7,0
III 15cm	7,0	7,5	7,1	7,2	7,0	7,0	7,2	7,0	6,9	7,1	6,5	6,6	7,0
III 25cm	7,0	7,4	7,1	7,0	6,9	7,0	7,1	7,0	6,9	7,0	6,6	6,7	7,0
III 45cm	7,0	7,3	7,1	7,0	7,0	7,0	7,2	7,1	6,9	7,0	6,6	6,7	7,0
KA	7,4	7,4	7,0	7,6	6,9	6,9	6,8	6,8	6,8	7,1	6,7	6,9	7,0
V 5cm	7,5	7,4	7,0	7,4	6,9	7,1	6,9	7,0	7,2	7,2	6,3	6,7	7,1
V 15cm	7,4	7,4	7,0	7,4	7,2	7,2	7,0	7,1	7,3	7,3	6,4	6,8	7,1
V 25cm	7,4	7,4	7,2	7,3	7,3	7,2	7,0	7,1	7,3	7,3	6,5	6,8	7,1
V 45cm	7,4	7,3	7,0	7,3	7,2	7,2	7,1	7,1	7,3	7,2	6,5	6,9	7,1
VII 5cm	7,5	7,5	7,3	7,5	7,4	7,2	7,2	7,2	7,2	7,6	6,8	6,5	7,2
VII 15cm	7,4	7,4	7,3	7,3	7,5	7,3	7,3	7,3	7,4	7,4	6,8	6,6	7,2
VII 25cm	7,4	7,4	-	7,1	7,4	7,3	7,3	7,2	7,4	7,4	7,0	6,7	7,2
VII 45cm	7,4	7,4	7,3	7,1	7,4	7,2	7,1	7,1	7,1	7,3	6,8	6,7	7,2
FW N	7,6	7,5	7,0	7,3	7,4	7,1	7,4	7,4	7,6	7,8	7,3	6,9	7,4

Tab. A.2.29: Tabellarische Darstellung der elektrische Leitfähigkeit der Interstitialwasserproben der vier Transekte I, III, V und VII, jeweils mit den vier untersuchten Tiefen 5 cm, 15 cm, 25 cm und 45 cm, Wasserproben der fließenden Welle flußaufwärts (FW V) und flußabwärts (FW N) des Kläranlagenabflusses und vom Klärwasser (KA). Mittelwerte (Balken) und Standardabweichung (senkrechte Linien) aus 13 Messungen im Probenahmezeitraum 1999-2001.

Elektrische Leitfähigkeit [$\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$]														
	6.7.99	21.9.99	16.11.99	22.3.00	19.5.00	26.6.00	10.7.00	24.7.00	14.8.03	4.9.00	26.9.00	1.5.01	3.7.01	16.10.01
FW V	406	440	433	198	399	387	260	313	328	254	277	272	339	331
I 5cm	411	-	469	198	396	383	275	316	339	255	309	277	338	331
I 15cm	412	447	461	196	393	382	276	314	329	258	419	273	341	346
I 25cm	413	446	452	196	393	382	275	312	328	258	579	266	334	356
I 45cm	403	446	439	196	392	380	275	313	325	259	589	280	339	357
III 5cm	411	449	446	196	353	386	289	305	307	312	603	273	336	359
III 15cm	408	447	439	197	350	387	277	303	309	303	576	275	332	354
III 25cm	394	432	426	197	352	387	296	305	308	314	573	262	334	352
III 45cm	376	414	431	198	354	388	280	305	308	320	575	270	326	350
KA	636	725	920	605	718	604	496	662	635	554	559	980	943	695
V 5cm	442	476	509	231	443	417	280	391	369	288	305	321	445	378
V 15cm	430	467	467	228	440	415	282	389	368	287	312	325	410	371
V 25cm	431	467	489	226	440	414	281	389	365	288	310	324	399	371
V 45cm	429	467	496	228	441	417	280	390	366	289	310	321	390	371
VII 5cm	448	490	510	215	422	407	271	361	357	279	287	295	374	363
VII 15cm	446	479	483	217	425	410	270	362	361	274	286	300	375	361
VII 25cm	447	486	-	212	423	407	270	363	360	273	285	295	372	349
VII 45cm	441	478	496	214	422	407	296	363	355	273	294	285	367	361
FW N	450	488	473	231	429	410	269	363	360	292	296	304	375	365

Tab. A.2.30: Tabellarische Darstellung der Restriktionsfragmentlängen der durch die vier verschiedenen Enzyme DdeI, MspI, Sau3AI und HhaI geschnittenen 16S rDNA der 95 isolierten denitrifizierenden Bakterien.

Isolat-ID	DdeI					MspI					Sau3AI				HhaI						
M00-25FWV	698	533	269			701	531	269			1298	271			526	359	199	131			
N01-7KA	523	319	284			504	313	247	173	141	121	1069			535	358	158	140	100		
M00-44FWN	499	308	157	137	115	506	288	222	163	120		1231	191	165	540	368	214	166			
M00-13FWN	502	309	159	135	112	507	287	224	164	118		1219	207	173	536	367	211	162			
M00-54KA	497	445	157	109		505	317	285	163	118		1360	186		543	357	211	156			
M00-71KA	503	452	223	160	133	508	345	281	103			1281	118		545	341	207	165			
J01-3VIIb	698	530	156	110		554	501	160	135			933	175	110	526	358	206				
S00-X7VC	695	530	159	114		536	477	159	128	109		937	186	118	538	365	211				
A00-100ID	549	499	173	131	115	454	405	278	97			987	284	242	459	365	290	259	232		
A00-101ID	545	510	172	130	112	458	404	269	97			982	276	233	455	363	288	258	231		
M00-2KA	540	498	161	126	117	435	305	260				1222	268		859	378					
A00-135VA	448	381	291	254	158	479	448	179	155			830	422	364	740	354	216	159			
M00-29VIIC	440	372	281	249	150	439	374	281	247	147		849	424		730	350	207	154			
M00-4KA	799	439				792	512	288				755	434	265	726	213	162				
C97-6IB	444	375	280	149		659	475	169				729	319	206	180	733	361	236	163	101	
C97-5ID	447	377	285	151		657	476	168				724	321	204	179	735	361	235	163	102	
C97-17VD	439	370	280	150		656	477	172				659	324	184	712	357	231	159	100		
C97-11VB	445	373	282	148		664	518	174				709	303	192	174	734	362	239	165	103	
N01-5IC	440	371	277	146		668	492	171				659	326	199	180	724	357	237	165	100	
C97-11A	442	373	281	149		658	479	168				717	323	196	179	732	358	235	160	100	
C97-10VA	442	372	283	147		658	516	173				700	305	190	174	736	362	238	164	103	
C97-8VA	436	366	272	145		660	515	173				685	310	198	178	732	360	233	160	101	
C97-7ID	443	373	277	148		660	482	172				704	315	204	177	734	359	235	161	101	
C97-9VA	441	370	276	146		658	514	173				692	308	196	180	735	362	237	163	101	
A00-106VA	438	368	278	147		680	475	174				719	356	297	190	733	353	231	156	100	
A00-198IID	440	374	277	148		690	480	176				684	339	284	185	732	353	234	160	101	
J01-6IIIA	450	379	284	252	155	673	473	160				652	327	199	181	748	361	217	160		
N01-11ID	444	376	271	153		650	490	180				657	328	277	184	727	453	360	95		
N01-12IIIA	443	377	275	157		677	508	175				657	326	275	177	731	455	360	100		
N01-13-VIID	439	368	273	155		683	490	175				657	322	259	180	725	452	354	100		
N01-6ID	440	373	288	147		667	499	175	127			653	320	246	180	582	451	354	101		
N01-16IIIC	437	380	269			511	494	171				674	325	280	182	742	364	244			
C97-16VD	448	378	282	164	143	656	497	387	170			651	322	183	113	490	439	273	253		
C97-14VC	438	369	278	159	140	658	497	387	172			643	321	184	111	496	441	278	252		
C97-12VB	441	286	157	139		608	508	396	169			1113	286	234	170	104	507	452	281	260	188
C97-13VC	439	286	163	140		609	510	397	175			1113	291	228	172	509	451	283	258	188	
N01-4IIIB	801	439				822	517	184	141	104		592	326	265	235	189	644	460	280	254	
N01-8VIIB	800	447	174			653	522	175	101			599	331	272	182	643	455	253	101		
M00-14IIIA	808	455				797	492	156				589	331	183		436	282	249	204	160	
M00-4IIIA	818	459				802	490	154				595	332	212		438	283	250	207	156	
M00-10IB	816	457				794	494	154				954	594	329		438	356	280	251	206	
J01-2VB	782	440	112			818	505	166				596	330	179	115	439	286	254	205	160	
C97-4IB	720	429	279			603	295	172	103			674	638			454	418	228	165	105	
C97-3IA	723	431	281			599	298	170	100			681	645			454	415	237	164	106	
S00-X3VC	506	440	274			542	493	161				672	456	203		532	432	366			
S00-X2FWN	539	450	382			482	298	217	153	131		612	462			497	371	198			
S00-X1FWN	666	467	284			496	303	224	157	132		601	445	298	208	495	441	386			

Tab. A.2.30 (Fortsetzung):

Isolat-ID	Ddel				Mspl				Sau3AI				Hhal						
N01-3IIIA	519	438	279	102	514	284	167	136	112	661	430	275	178	538	393	224	202	137	104
N01-9VIIA	519	439	281	102	521	288	175	140	115	652	430	275	179	536	394	223	198	138	102
N01-10KA(ST)	521	440	286	103	517	297	175	140	113	650	430	274	178	531	393	220	199	136	
M00-77VIID	805	441	278		498	288	161	139	111	722	469	297	186	526	371	217	197	135	
M00-76VIID	799	436	278		494	286	160	138	111	757	479	305		526	371	218	197	133	
M00-85FWV	451	309	186	160	629	392	213	156		997	393	311	215	562	441	353	187		
M00-66FWV	449	291	174	148	437	289	174	152		964	357	277	192	560	437	350	184		
J01-4KA	440	289	170	146	608	397	219	157		819	322	251	184	570	438	348	185		
N01-1IIIA	442	294	174	148	600	395	214	170		835	308	247	180	588	453	348	186		
C97-15VD	441	284	176	150	595	298	166			825	310	246	177	436	324	257	182		
N99-61VC	444	393	329	295	152	604	542	397	344	848	455	272	242	573	440	352			
N99-25IIIB	453	410	286	107	536	479	156	128	111	910	275	238		447	362	287	257	212	
N99-89IIID	446	404	281	103	540	484	157	132	112	937	289	250	101	441	361	286	254	210	
M00-15IIIA	435	389	271		545	490	155	129	111	950	267	230		439	356	284	251	208	
J01-8VIIC	444	398	275		547	495	157	133		934	278	239		433	352	280	249	205	
J01-7VIIC	443	397	275		552	497	159	134		937	278	237		432	353	282	249	207	
A00-124ID	439	415	278	101	547	505	172	128	114	940	285	242		451	360	299	262	232	
N99-3IC	442	408	274		556	500	161	132	112	921	272	235		448	365	290	257	214	
S00-X5VB	442	397	270		545	488	156	128	111	923	280	245		444	365	286	254	211	
S00-X4VB	436	393	270		546	489	156	128	109	917	274	240		446	365	288	257	212	
N00-1KA	431	390	365	270	553	497	160	136	110	904	272	235		434	354	283	249	207	
N00-3KA	436	395	366	273	555	499	160	132	109	917	268	236		436	359	286	250	205	
N00-6KA	442	394	373	275	553	500	163	141	109	912	269	237		441	362	288	254	212	
J01-1VB	439	390	366	266	548	494	161	133		990	277	236		439	356	281	252	206	
N99-35KA	440	398	274		488	388	159	132	112	464	464	273	239	443	363	284	252	210	
N01-14IIIA	430	419	287		568	525				949	271	241		462	364	287			
J01-5FWN	446	307	264	100	549	506	160	132		908	197	178	111	845	350	255			
J01-9FWV	441	306	262	100	544	499	157	135		923	201	185	113	825	343	249			
J01-10FWV	438	303	260	100	538	496	160	131		919	198	187	100	825	344	251			
A00-175IIID	392	326	157	113	540	346	156	108		491	252	204		437	408	281	251	156	
A00-174IIID	392	329	156	113	538	347	151	112		528	270	220		432	409	284	251	152	
A00-115IIID	399	331	159	116	550	348	155	111		483	246	201		431	404	300	266	155	
A00-112IIIB	410	327	155	112	545	348	168	131	110	472	250	196		453	410	299	250	175	
A00-107VB	408	329	158	112	557	343	167	131	110	494	255	203		456	409	292	258	176	
A00-114IIIB	411	328	156	112	552	349	169	132	110	496	287	193		448	402	297	264	172	
A00-133IIID	411	332	159	115	538	343	171	131	116	494	256	204		452	406	298	264	176	
A00-155VB	411	330	157	113	101	542	347	171	131	114	485	250	206	449	409	295	260	174	
A00-181IIID	411	328	156	114	544	346	168	136	111	491	250	202		446	403	288	257	174	
A00-142VB	411	330	158	115	540	345	169	131	114	482	248	201		453	412	297	264	175	
A00-113IIIB	413	329	156	113	554	347	170	132	111	494	247	193		451	404	299	264	172	
N99-52VIID	407	339	160	122	538	343	155	113		477	247	212	100	445	364	287	256	215	
N99-63VC	402	334	162	103	539	342	147	114		458	231	194		428	286	251	153		
A00-91IB	540	344	167	132	114	410	329	158	113	500	261	204		460	411	288	248	172	
A00-95VA	541	345	168	130	113	567	345	155	116	491	254	211		459	416	286	251	171	
A00-105VA	404	337	165	121	109	555	349	160	115	91	575	308	233	424	289	261	157		
A00-119IIID	415	331	158	119	550	352	170	131	114	536	275	240		446	404	299	262	171	
N01-2FWN	433	277	146	94	546	348	172	106		317	318	234	197	133	457	415	287	254	174
S99-57FWV	422	379	255	153	121	540	391	225	157	122	980	200	102	329	283	173	136	117	107

Danksagung

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. D. Werner für die Betreuung der Arbeit, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die großzügige finanzielle Unterstützung, die mir u.a. die Teilnahme an nationalen und internationalen Kongressen ermöglichte.

Herrn PD. Dr. D. Borchardt danke ich für die Denkanstöße bei den Lahntreffen und die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank geht auch an die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG), mit deren Förderung sowohl des Forschungsprojektes „Ökosystemare Zusammenhänge im Hyporhithral anthropogen belasteter Fließgewässer“ als auch des Sonderforschungsbereiches 395 meine Arbeit finanziert wurde.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Werner gilt mein Dank für die tatkräftige Unterstützung, stete Hilfsbereitschaft und das positive Arbeitsklima. Insbesondere möchte ich Heidemarie Thierfelder, Lucette Claudet und Ingrid Meinhard für die unzähligen Hilfen im Labor-, Büro- und Lebensalltag danken. Gedankt sei auch Andrea Buchholz, Danny Stingel und Felix Kirchner und den vielen Studenten für die Unterstützung bei den Probenahmen im Freiland sowie bei der Laborarbeit.

Mein besonderer Dank geht an Dr. Bernd Ulrich Becker, der mit seiner Zuversicht und Hilfe diese Arbeit und besonders den Verfasser aus manchen Tiefen herausgeholt hat.

Ganz herzlich sei auch Detlev Ingendahl gedankt für die kompetente Unterstützung während und nach der Zeit in der Arbeitsgruppe sowie für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei den ehemaligen Mitarbeitern Melanie Meier, Olaf van der Most und Dr. Suresh Babu, die nicht unwesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben und dafür gesorgt haben, daß die Arbeit leicht von der Hand geht.

Dr. Helen Steel danke ich für die kompetente und herzliche Labor- und Englischunterstützung.

Dr. Pablo Vinuesa danke ich für die Einführung in molekulargenetische Methoden.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern des Forschungsprojektes „Ökosystemare Zusammenhänge im Hyporhithral anthropogen belasteter Fließgewässer“ für die fruchtbaren und ausgiebigen Diskussionen im Rahmen der Lahntreffen.

Frau Dr. Christina Bolaños danke ich für die Bereitstellung der ARDRA-Daten und Dr. Xiong für die Primer zur *hsdA*-Amplifizierung und den *Comamonas testosteroni* Teststamm.

Herrn Zöfel sei herzlich gedankt für die kompetente Beratung in statistischen Fragen.

Den Mitarbeitern der Kläranlage Sarnau danke ich für die Bereitstellung der Stickstoffdaten.

Meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich für eine rege, auch finanzielle Anteilnahme, die stets verbunden war mit aufbauenden Worten und für die orthographischen Korrekturen dieser Arbeit.

Am meisten danke ich meiner Frau Marja für die verständnisvolle und tatkräftige Unterstützung sowie meinem Sohn Jonah, der mir tagein, nachtaus vor Augen geführt hat, was im Leben neben der Wissenschaft wesentlich ist.

Erklärung

Ich versichere hiermit, daß ich meine Dissertation „Verbreitung und Diversität denitrifizierender Bakterien im Oberflächenwasser und hyporheischen Interstitial der Lahn unter dem Einfluß von Kläranlagenabwässern“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 3.10.2004

(Eike ter Haseborg)