

Bewilligungsempfänger

MaxFlow Membran Filtration GmbH (MMF)

Kooperationspartner

Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau,  
Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA)

Tierärztliche Hochschule Hannover, Zentrum für Infektionsmedizin,  
Fachgebiet Fischkrankheiten (TiHo)

**Entwicklung einer umwelt- und fischgesundheitsfreundlichen  
Technologie zur Verringerung der Stickstoff- und Mikropartikelfracht in  
Aquakultur-Kreislaufanlagen**

**– Phase 2 –**

**Abschlussbericht**

Verfasser: Angela Boley, Verena Jung-Schroers, Steffen Richter,  
Dieter Steinhagen, Mikolaj Adamek, Ganna Korshun

Stuttgart, September 2014

Gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt  
im Rahmen der Förderinitiative Aquakultur AZ: 28092

Projektlaufzeit

12.06.2012 - 30.06.2014





**Projektkennblatt**  
der  
**Deutschen Bundesstiftung Umwelt**



<b>AZ</b>	<b>28092/02</b>	<b>Referat</b>	<b>23</b>	<b>Fördersumme</b>	<b>225.163 €</b>
-----------	-----------------	----------------	-----------	--------------------	------------------

**Antragstitel** Förderinitiative "Nachhaltige Aquakultur": Entwicklung einer umwelt- und fischgesundheitsfreundlichen Technologie zur Verringerung der Stickstoff- und Mikropartikelfracht in Aquakultur-Kreislaufanlagen (halbtechnische Phase)

**Stichworte** Wasser, Aquakultur, Verfahren, Stickstoff, Membran

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
<b>24,5 Monate</b>	<b>12.06.2012</b>	<b>30.06.2014</b>	<b>1</b>

Zwischenberichte

<b>Bewilligungsempfänger</b>	MMF MaxFlow Membran Filtration GmbH Magdeburger Str. 16 a 45881 Gelsenkirchen	Tel	0209-98099-860
		Fax	0209-98099-865
		Projektleitung Steffen Richter	
		Bearbeiter Steffen Richter	

**Kooperationspartner** Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft (ISWA)  
Zentrum für Infektionsmedizin, Abteilung Fischkrankheiten und Fischhaltung  
Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover (TIHO)

### ***Zielsetzung und Anlass des Vorhabens***

Ziel des Vorhabens war die Entwicklung und Realisierung eines einfachen und wirksamen Verfahrens zur Wasseraufbereitung in der Aquakultur. Ein biologisches Hochleistungs-Verfahren zur Denitrifikation wurde verknüpft mit einer Membraneinheit zur Entfernung von Feststoffen (z.B. Bakterien, Mikropartikel), dem „Membran-Deni-Reaktor“ (MDR). Neben einer Erhöhung der Biomassen-Konzentration im Denitrifikationsreaktor und damit einer Steigerung der Denitrifikationsrate, war die Erwartung, dass mit dieser Entwicklung Wasser und Energie eingespart und gleichzeitig eine Verbesserung der Fischgesundheit durch das Herausfiltern von Pathogenen aus dem Prozesswasser erreicht werden kann.

### ***Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden***

In der zweiten Phase des Projektes sollten die Erfahrungen und Versuchsergebnisse aus der ersten Phase (Laborphase) in einer halbtechnischen Versuchsanlage umgesetzt werden. Der neue Reaktortyp des Membran-Denitrifikations-Reaktors (MDR) und das zugehörige Membranmodul mussten zunächst weiter entwickelt und gebaut werden.

Zwei Kreislauf-Anlagen mit gleichem Aufbau und gleicher Masse an Fischen wurden zunächst parallel betrieben. Dann wurde eine Anlage mit dem Funktionsmuster des MDR erweitert, die andere (ohne Membran- und Denitrifikationsstufe) diente als Referenz. Bei Langzeituntersuchungen wurde die Wasserqualität mit Laboruntersuchungen und umfangreicher Messtechnik beobachtet.

Da eine schlechte Wasserqualität das Wachstum der Fische beeinträchtigen und Infektionserkrankungen hervorrufen kann, wurden neben einer Beobachtung der Fische und der Messung des Zuwachses auch tierärztliche Untersuchungen der Fische auf Bakterien und Stress-Parameter durchgeführt. Zusätzlich wurde die bakterielle Mikroflora in beiden Anlagen auf Ihre Menge und Zusammensetzung untersucht.

## **Ergebnisse und Diskussion**

Einen vollständig durchsichtigen Reaktor zu bauen, war eine schwierige Aufgabe, die sich jedoch im Nachhinein als eine gute und wichtige Entscheidung herausstellte, denn sie erlaubte Strömung und Schaumstoffwürfel zu beobachten und unvorhergesehene Probleme zu beseitigen. Die Realisierung einer ausreichenden Rezirkulationsströmung war ebenfalls eine Herausforderung, die sich jedoch lösen ließ.

Um eine möglichst hohe Packungsdichte im Membranmodul zu erreichen, wurde das Modul mit dünneren Trägerplatten konzipiert, um so eine größere Membranfläche bei gleicher Stellfläche des Moduls zu ermöglichen. Eine Testreihe ergab, dass die Verwendung dünnerer Trägerplatten keinen negativen Einfluss auf die Filtrat-Ableitung innerhalb des Moduls hat.

Wir konnten nachweisen, dass sich die beiden Prozesse Partikelelimination und Denitrifikation erfolgreich miteinander kombinieren lassen. Da das Volumen des MDR relativ groß war, die Futterrate und damit der N-Eintrag durch die Fische andererseits begrenzt, waren die volumenbezogenen Denitrifikationsraten mit  $0,5 \text{ mg}/(\text{L h}) \text{ NO}_3^- \text{-N}$  in den ersten 116 d der Untersuchung des MDR vergleichsweise niedrig, aber für den Betrieb dieser halbtechnischen Anlage hinreichend. Daher wurde in einem weiteren Versuchsabschnitt über 170 d Nitrat-Lösung in den Reaktor zudosiert und damit eine Denitrifikationsrate bis zu  $6 \text{ mg}/(\text{L h}) \text{ NO}_3^- \text{-N}$  erreicht. Die Fische wurden dabei keinen erhöhten Nitrat- oder Nitritkonzentrationen ausgesetzt. Dennoch konnte die maximale Leistungsfähigkeit des Denitrifikationsprozesses noch nicht erreicht werden, da es immer wieder zu Problemen mit der Zulaufpumpe zum MDR kam. Insgesamt lässt sich sagen, dass die Denitrifikation relativ problemlos ablief, mit nur seltenen Konzentrationsspitzen von Nitrit.

Während der gesamten Versuchsdauer blieb der Transmembrandruck gering und die Membran intakt. Der Permeatfluss war dennoch zunächst niedrig. Da im MDR durch die Denitrifikation eine Übersättigung des Wassers mit Gasen ( $\text{N}_2$  und  $\text{CO}_2$ ) erfolgte und sich ein niedrigerer Druck im Ablauf des Reaktors einstellte, entstanden Gasblasen im Ablaufschlauch und erzeugten einen erheblichen Widerstand im Ablaufsystem. Dies erhöhte den Reaktor-Innendruck und verhinderte damit einen höheren Volumenstrom. Erst nach Umbau des Ablaufsystems stieg der Volumenstrom auf  $130 \text{ L/h}$  und der Permeatfluss erreichte Werte zwischen  $10 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$  und  $15 \text{ L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ , was dem üblichen Wert eines solchen Moduls entspricht.

Das Membranmodul musste während der gesamten Betriebsdauer nicht zusätzlich mit Chemikalien gereinigt werden. Dies ist als Zeichen dafür zu werten, dass dem Fouling auf den Membranen mit Hilfe der Reinigungswirkung der Schaumstoffwürfel erfolgreich Einhalt geboten wurde.

Durch den Einsatz des MDR ließ sich der tägliche Frischwasserbedarf auf  $5 \text{ L/d}$  im Vergleich zu  $109 \text{ L/d}$  bei der Referenz-Anlage vermindern. Für die Denitrifikation im ersten Versuchsabschnitt errechnete sich ein Bedarf von ca.  $2,1 \text{ g Ethanol/g NO}_3^- \text{-N}$ , was sich mit Erfahrungen aus der Abwassertechnik deckt. Im zweiten Versuchsabschnitt mit erhöhter Nitratfracht (durch zusätzliche Nitratdosierung) wurden nur ca.  $1,5 \text{ g Ethanol/g NO}_3^- \text{-N}$  verbraucht.

Teil des Projektes war, die Auswirkung des Verfahrens auf die Fischgesundheit zu erkunden. Dabei wurde die Mikroflora im Wasser und auf den Fischen beurteilt. Die Gesamtkeimzahl im Wasser konnte durch den Einsatz des Denitrifikationsreaktors auf einem niedrigeren Niveau im Vergleich zur Referenz gehalten werden. Dabei blieb die bakterielle Diversität jedoch weiterhin hoch, was zu einer Besetzung vieler ökologischer Nischen führt und somit die Etablierung neu hinzukommender, möglicherweise pathogener Bakterien erschweren kann. Unter den identifizierten Bakterienspezies konnten aus der Anlage mit MDR weniger potentiell pathogene Keime und weniger "Schmutzkeime" isoliert werden. Auch dies ist als sehr günstig im Hinblick auf die Fischgesundheit zu bewerten. Der positive Eindruck ließ sich anhand der Messungen von Cortisol, einem Parameter für akute und chronische Stressbelastung, im Blut der Fische und im Wasser der Haltungssysteme bestätigen. Die Fische, die in der Anlage mit angeschlossenem Membran-Denitrifikations-Reaktor gehalten wurden, erschienen signifikant geringer gestresst als die im Vergleichsbecken ohne MDR. Diese Stressverminderung kann vermutlich auf die bessere chemische und mikrobiologische Wasserqualität zurückgeführt werden.

Insgesamt kann man schließen, dass der Betrieb eines Membran-Denitrifikations-Reaktors einen positiven Einfluss auf die Fischgesundheit und das Tierwohl in einer Aquakultur-Kreislaufanlage hat.

## **Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation**

Ein Vortrag und ein Poster auf der Fischpathologen-Tagung in Starnberg (8-10.10.2014), weitere Veröffentlichungen sind in naher Zukunft geplant.

## **Fazit**

Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass die Projektidee technisch umsetzbar ist. Der Wasserverbrauch wird vermindert, die Wasserqualität und die Fischgesundheit verbessert. Allerdings bleiben noch Fragen offen, zu denen ein weiterer Forschungsbedarf besteht.

## Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung .....	1
2	Einleitung.....	3
3	Vorwort, Projektverlauf .....	7
4	Material und Methoden .....	9
4.1	Aquakultur-Kreislaufanlagen für die halbtechnischen Versuche .....	9
4.1.1	Wasseraufbereitung - Übersicht	9
4.1.2	Fischbecken und Sauerstoffversorgung der Fische	10
4.1.3	Nitrifikationssäulen (NF)	10
4.1.4	Membran-Deni-Reaktor (MDR)	11
4.1.5	Messgeräte und Technik	16
4.1.6	Datenerfassung und Steuerung	17
4.1.7	Labor-Analytik (JI,HH, GK)	18
4.1.8	Fischbesatz und Fischfutter	19
4.1.9	Frischwasser	20
4.1.10	Wartung	20
4.1.11	Berechnungen	20
4.2	Stickstoffströme in Aquarien .....	24
4.2.1	Versuchsreihe 2: Ammoniumexkretion der Fische	24
4.3	Beurteilung von Fischen und Wasser (TiHo) .....	25
4.3.1	Untersuchungen zur Stressbelastung der Karpfen in den unterschiedlichen Haltungssystemen	25
4.3.2	Analyse der Mikroflora im Haltungswasser und auf der Haut und auf den Kiemen der Fische	26
5	Ergebnisse und Diskussion .....	31
5.1	Halbtechnische Anlagen .....	31
5.1.1	Vorversuche zur Konstruktion des Membranmoduls (MMF)	31
5.1.2	Fische vor dem Start	32
5.1.3	Einfahren der Anlage ohne Fische ohne MDR (Einfahrphase)	32
5.1.4	Betrieb der Anlagen mit Fischen ohne MDR	33
5.1.5	Betrieb der Anlagen mit Fischen mit MDR	35
5.2	Stickstoffströme in Aquarien .....	43
5.2.1	Versuche zur Ammoniumexkretion von Einzel-Fischen	43
5.3	Beurteilung von Fischen und Wasser (TiHo) .....	44
5.3.1	Blutuntersuchungen von Fischen	44
5.3.2	Wasseruntersuchungen	46
5.3.3	Bakteriologische Untersuchungen der Fische	53
6	Fazit .....	61
6.1	Vergleich der Ergebnisse mit den ursprünglichen Zielen .....	61
6.2	Weiterführende Fragestellungen.....	62
6.3	Möglichkeiten der Umsetzung oder Anwendung .....	62
7	Literatur, Software .....	63

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Vereinfachtes Schema der Anlagen A u. B mit Sensoren/Messgeräten. Grün: nur Anlage A; Alles andere: Anlagen A u. B Zeichenerklärung s. Tab. 1 .....	9
Abb. 2: Sauerstoffversorgung: Normalversorgung mit Druckluft von LFKW, Notversorgung 1: Autobatterie-Ladegerät (Ladeg), Autobatterie (Autob), Stromkonverter 12 V → 230 V (Konv), Luftpumpe (Luftp), Notversorgung 2: Sauerstoff-Druckgasflasche .....	10
Abb. 3: Erste Version des Reaktors (li) u. Ausführung (re) .....	11
Abb. 4: Fertiges Modul .....	12
Abb. 5: Draufsicht (li), Gestaltung Anschluss (re), Sondermodul U20-002-FischAW1 .....	12
Abb. 6: Aufbau des Versuchsstandes .....	13
Abb. 7: MDR, li: CAD-Konstruktion, Mitte: Foto, Start des Reaktors, re: Versuchende .....	14
Abb. 8: Schema Wasserkreislauf MDR .....	15
Abb. 9: Schaumstoff-Würfel (Kantenlänge 10 mm) .....	15
Abb. 10: Screenshot MULTIMESS .....	17
Abb. 11: Steuerungsoptionen MULTIMESS. Li: Druckbegrenzung MDR, Wasserstandsregelung MDR, Ethanol dosierung MDR. Re: Einstellungen für flexible Ethanol dosierung n. Nitrat- u. Sauerstofffrachten („Nitratfracht“) .....	18
Abb. 12: Ankunft der Fische im ISWA (n. Transport) .....	19
Abb. 13: Beispiel für Ermittlung der Steigung m der NO <sub>3</sub> --N Konz. über Zeit in Becken B. Hier m = 3,7362 mg/(L d) NO <sub>3</sub> --N .....	23
Abb. 14: Aufbau Versuchsreihe „Ammoniumexkretion“ mit Einzel-Karpfen, Filter (Pumpe), Heizstab, "Aircurtain", Wasservol. im Becken 80 L, Biofilter (leer) 7,5 L .....	25
Abb. 15: Vergleich Volumenströme bezogen auf jeweilige Plattenfläche. Ord. (li): Unbespannte u. mit Vlies bespannte Platten: Ord. (re) Platte mit Membran u. Vlies .....	31
Abb. 16: Vergleich Permeabilitäten. Ord. (li): Unbespannte u. mit Vlies bespannte Platten: Ord. (re) Platte mit Membran u. Vlies .....	32
Abb. 17: Nitratproduktion in Anlagen A u. B, Betriebstag 0...62 .....	33
Abb. 18: Nitratkonzentrationen in Anlagen A u. B, Betriebstag 67...108 .....	34
Abb. 19: NO <sub>3</sub> --N-Konz. in beiden Anl. im Zeitraum vor der Reaktorinbetriebnahme (Analytikwerte). LA = Lamellenabscheider .....	34
Abb. 20: Verlauf Nitratkonz. im Becken A, B, Ablauf MDR, Symbole = Analytik-Werte, Linien = Online-Messwerte (Sensoren). Pfeile: s. Legende re. Rand Diagr. ....	35
Abb. 21 Verlauf der NO <sub>2</sub> --N-Konz. im Ablauf aus MDR, in Becken A u. Referenzbecken B. Laboranalytik-Werte. Achtung: Skalierungen der Y-Achsen unterscheiden sich! .....	36
Abb. 22: Verlauf der Denitrifikationsraten bei pH 7,3...8,1; (24...28) °C sowie der Ethanol dosierung, hier ebenfalls auf Wasservolumen MDR bezogen. ....	37
Abb. 23: Vergleich von pH-Werten u. Säurekapazität; Anlage A (mit MDR) u. B (Referenz) .....	38
Abb. 24: Verlauf von Permeatfluss, Permeabilität u. TMP, T= (27 bis 30) °C. Online-Messwerte ..	39
Abb. 25: Fischmasse während gesamter Betriebszeit in Becken A u. B. Fisch-Verluste durch Stromausfälle (schwarze Pfeile). Umsetzen der Fische vor Start des MDR. ....	40
Abb. 26: Täglicher Wasserbedarf in Anlage A (MDR) u. B (Referenz) 250 d...399 d .....	41
Abb. 27: Wasserverbrauch in L/kg Fischzuwachs (250 d...399 d) (Anl. A mit, Anl. B ohne MDR) .....	41
Abb. 28: Beispiel für NH <sub>3</sub> u. NH <sub>4</sub> + -N ges Akkumulation bei unterschiedl. Futterrationen, 287. d u. 330. d (n. Verminderung der Futtermenge). Li.: Becken A, re: Becken B. ....	42
Abb. 29: MDR mit Schaumstoffwürfeln im Kreislauf 3 d n. Inbetriebnahme (li), n. 287 d Betrieb (Versuchsende, re) .....	43
Abb. 30: Strömung mit Ableitblech (li) Bildung einer Totzone im Reaktor (re) .....	43
Abb. 31: NH <sub>4</sub> -N-Konz.-Verläufe aller Versuche mit Fischen über die Zeit. T=24 °C Die Legende zeigt die Masse des jeweils eingesetzten Fisches .....	44
Abb. 32: Cortisolgehalte im Blutplasma von Karpfen aus beiden Anlagen. Angabe von Medianen u. Quartilen der Gehalte in ng /mL Cortisol, Blut von jeweils 6 Karpfen. ....	45
Abb. 33: Cortisolgehalte im Wasser in ng/100 mL, Anlage A u. B. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. der Wasserproben aus Fischhaltungs-, Filter- u. Lamellenabscheider (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	46
Abb. 34: Entwicklung der Gesamtkeimzahl im Wasser Fischhaltungs-, Filter-, Sedimentabsetzbecken (=Lamellenabscheider) u. des Reaktors. Angaben von Werten jeder einzelnen Wasser-probe (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	47

Abb. 35: Proz. Verteilung Bakterienspezies identifiziert in Wasserproben aus Anlage A (mit MDR) .....	48
Abb. 36: Proz. Verteilung Bakterienspezies identifiziert in Wasserproben aus Anlage B (ohne MDR) .....	48
Abb. 37: Proz. Verteilung Bakterienspezies, in Wasserproben aus Reaktor identifiziert (Anl. A mit MDR) .....	49
Abb. 38: Proz. Verteilung Bakterienspezies, aus Biofilmen in Anlagen A u. B identifiziert (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	50
Abb. 39: Gesamtgehalt molekularbiologisch nachgewiesener Bakterien beider Anlagen je 3 mL Wasser. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. der Gehalte in Wasserproben aus Fischhaltungs-, Filter- u. Lamellenabscheider. (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	51
Abb. 40: Gehalt molekularbiologisch nachgewiesener, ubiquitär im Wasser vorkommender Bakterienspezies <i>Aeromonas</i> spp. u. <i>Pseudomonas</i> spp. in beiden Anlagen je 3 mL Wasser. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. der Gehalte in Wasserproben aus Fischhaltungs-, Filter- u. Lamellenabscheider. (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	51
Abb. 41: Gehalt molekularbiologisch nachgewiesener, für Fische fakultativ pathogener Bakterienspezies <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. u. <i>Vibrio</i> spp. in beiden Anlagen je 3 mL Wasser. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. der Gehalte in Wasserproben aus Fischhaltungs-, Filter- und Lamellenabscheider (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	52
Abb. 42: DGGE Gel Analyse u. auf Grundlage des DGGE Bandenmusters erstelltes Dendrogramm. Gezeigt sind Wasserproben aus Fischhaltungsbecken beider Anlagen zu unterschiedlichen Probenahme-Zeitpunkten vor bzw. n. Inbetriebnahme des MDR (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	53
Abb. 43: Semiquantitativer Gehalt an Bakterien auf Kiemen von je 6 Fischen aus beiden Anlagen zu unterschiedlichen Untersuchungszeiten. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. von jeweils 6 Fischen je Anlage u. Zeitpunkt (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	54
Abb. 44: Proz. Verteilung Bakterienspezies, in Kiemenproben von Karpfen aus beiden Anlagen identifiziert (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	56
Abb. 45: Gesamtgehalt molekularbiologisch nachgewiesener Bakterien aus 0,2 mg Kiemen-Mucus, Fische aus beiden Anlagen. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. von jeweils 6 Karpfen je Anlage u. Zeitpunkt. (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	57
Abb. 46: Gesamtgehalt molekularbiologisch nachgewiesener, ubiquitär im Wasser vorkommender Bakterienspezies <i>Aeromonas</i> spp. u. <i>Pseudomonas</i> spp. aus 0,2 mg Kiemen-Mucus, Fische aus beiden Anlagen. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. von jeweils 6 Karpfen je Anlage u. Zeitpunkt. (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	57
Abb. 47: Gesamtgehalt molekularbiologisch nachgewiesener für Fische fakultativ pathogene Bakterienspezies <i>Flavobacterium</i> spp., <i>Streptococcus</i> spp. u. <i>Vibrio</i> spp. aus 0,2 mg Kiemen-Mucus, Fische aus beiden Anlagen. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. von jeweils 6 Karpfen je Anlage u. Zeitpunkt (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	58
Abb. 48: DGGE Gel Analyse u. auf Grundlage des DGGE Bandenmusters erstelltes Dendrogramm. Gezeigt sind Proben des Kiemen-Mucus von jeweils 6 Fischen zu unterschiedlichen Probenahmezeiten (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	59

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zeichenerklärung der Symbole für Sensoren in Abb. 1: .....	9
Tab. 2: Kennwerte der Anlagen A und B .....	10
Tab. 3: Nitrifikationssäulen Kennwerte .....	11
Tab. 4: Kennwerte Membranmodul .....	14
Tab. 5: Kennwerte der Schaumstoffwürfel .....	16
Tab. 6: Messgeräte und Sensoren, Anlagen A und B.....	16
Tab. 7: Weitere Geräte Anlagen A und B .....	17
Tab. 8 Analysenwerte mit Küvetten-Testsätzen (Hersteller: Hach-Lange).....	18
Tab. 9: Optimale Wasserparameter für Karpfen (veränd. n. Schreckenbach, 2002).....	19
Tab. 10: Primer, die in der Endpunkt-PCR für die DGGE eingesetzt wurden. Die GC-Klammer in der Primersequenz DGGE_f_cl ist grau hinterlegt.....	28
Tab. 11: Volumenbezogene Nitrifikationsraten, Anlage A.....	33
Tab. 12: Berechnung der maximal möglichen Denitrationsrate und des Verhältnisses von N (Exkretion) zu N (Futter) = A(N). N-Anteil im Futter K(N) = 0,0656.....	37
Tab. 13: Hämatokritwerte im Blut der Karpfen aus beiden Anlagen. Angaben: Mittelw. u. Standardabw. in Volumenanteil $\phi$ in % von jeweils 6 Karpfen (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	45
Tab. 14: Ergebnisse Blutuntersuchung der Karpfen aus beiden Anlagen (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) („Eiweiß“ = Gesamteiweiß) .....	45
Tab. 15: Isolierte Bakterienspezies aus den inneren Organen von je drei Karpfen aus Anlage A und Anlage B (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) .....	56

## Abkürzungen und Definitionen

Symbol	Beschreibung	Dim.
A(N)	Verhältnis N (Exkretion) zu N (Futter)	g/g
A (S)	Oberfläche der Schaumstoffwürfel	m <sup>2</sup>
Anl.	Anlage	
A <sub>m</sub>	Aktive Membranfläche	m <sup>2</sup>
b (M)	Breite Membranmodul	m
Be A, Be B	Becken Anl. A mit MDR, Becken Anl. B ohne MDR	
CT	gesamter, anorganisch gebundener Kohlenstoff	mmol/L
Diagr	Kurzform für Diagramm	
EtOH	Ethanol	
F	Faktor für Berücksichtigung von O <sub>2</sub> bei Ethanol dosierung	-
F(NFi)	Stickstoff-Exkretion der Fische	g/d
F(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N <sub>E</sub> )	Ammonium-Stickstoff Exkretion der Fische	g/d
F(Fu)	Tägliche Futtermenge	g/d
F(N)	N-Zugabe durch Futter	g/d
g	Erdbeschleunigung	m/s <sup>2</sup>
ggr	= geringgradig; mgr = mittelgradig; hgr = hochgradig, Terminologie zur semi-quantitativen Bewertung	
Gl.	Gleichung	
h (M)	(Äußere) Höhe Membranmodul	m
h <sub>1</sub>	Abstand Reaktorboden - Sensor p <sub>1</sub> unten	m
h <sub>2</sub>	Abstand Reaktorboden - Sensor p <sub>2</sub> Permeatleitung	m
h <sub>3</sub>	Abstand Reaktorboden - Sensor p <sub>3</sub> Deckel	m
Li, li	Links	
Jp	Permeatfluss(Flux) Membranmodul <sup>1)</sup>	L/(m <sup>2</sup> h)
K1	Spez. Ethanolbedarf bei Denitrifikation: mg Ethanol / mg NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N	mg/mg
K2	Anteil Ethanol in wässriger Lösung	g/g
k <sub>B</sub>	Basekonstante des Ammoniaks	-
KBE	Kolonie Bildende Einheit , auch KbE	
kw	Ionenprodukt des Wassers	-
K(N)	Konstante Massenanteil von Stickstoff im Futter	g/g
Konz.	Kurzform für Konzentration	
l (M)	Länge Membranmodul	m
LFKW	Lehr- und Forschungskläwerk, Universität Stuttgart	



Li, li	Links	
Lp	Permeabilität der Membran	L/(m <sup>2</sup> ·h·bar)
m	Steigung der Geraden NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N über Zeit	mg/(L d)
m (S)	Masse Schaumstoff-Würfel	G
m(E)	Masse der dosierten Ethanollösung	g
m(EtOH)	Ethanol-Dosierate	g/h
MDR	Membran-Denitrifikations-Reaktor	
Mittelw.	Mittelwert	
n.	nach	
NF	Nitrifikationssäule	
N (S)	Zahl Schaumstoffwürfel	-
ORP	Redoxpotential, Ablauf MDR	mV
O <sub>2</sub>	Sauerstoffkonzentration	mg/L
p <sub>1</sub>	Druck MDR unten	mbar
p <sub>2</sub>	Druck MDR Permeatleitung	mbar
p <sub>3</sub>	Druck MDR Deckel	mbar
pH	pH-Wert	
PP	Polypropylen	
ppi	Pores per inch	
Proz.	prozentual	
PVC	Polyvinylchlorid	
Q(MDR)	Volumenstrom, Ablauf MDR	L/h
Q(ges)	Volumenstrom gesamt durch Anlage (A, B)	L/h
Q(NF1)	Volumenstrom durch die Nitrifikationssäule 1 (A, B)	L/h
Q(NF2)	Volumenstrom durch die Nitrifikationssäule 2 (A, B)	L/h
Q <sub>p</sub>	Permeatvolumenstrom	L/h
r <sub>DVNi</sub> , r <sub>DVNa</sub>	Denitritations-, Denitratationsrate	mg/(L·h)
Re, re	Rechts	
r <sub>NVNa</sub> , r <sub>NVNi</sub>	Nitratationsrate. Nitritationsrate	mg/(L·h)
s.	siehe	
SK	Säurekapazität (KS4,3) bis pH 4,3	mmol/L
Standardabw.	Standardabweichung	
T	Temperatur	°C
TMP	Transmembrandruck: Druckdiff. zw. Innen- und Außenseite d.Membran	mbar
Tu	Trübung	mg/L
u.	und	
V(A)	Gesamt Wasservolumen der Anlage A (ohne MDR)	L
V(B)	Gesamt Wasservolumen der Anlage B (ohne MDR)	L
V(Ges) A, B	Wasservolumen der Anlage A, B	L
V(GNF)	Granulatschüttvolumen in Nitrifikationsreaktor	L
V(M)	Netto-Membranmodul-Volumen	L
V(MDR)	Wasservolumen MDR: Membran-Denitrifikations-Reaktor (Anl. A)	L
V(NF), V(NF1), V(NF2)	Volumen Nitrifikationssäule, NF-Säulen 1 bzw. 2	L
Vol.	Volumen	
VS (S)	Schüttvolumen Schaumstoff-Würfel	L
β(NH <sub>3</sub> )	NH <sub>3</sub> Konzentration (als NH <sub>3</sub> )	mg/L
β(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N Konzentration (als N)	mg/L
β(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N) Ges	Summe aus [NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N] + [NH <sub>3</sub> -N]	mg/L
β(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)zu	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N Konzentration im Zulauf MDR	mg/L
β(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)ab	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N Konzentration im Ablauf MDR	mg/L
Δβ(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N)	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N Konz. Änderung in einem best. Zeitabschnitt	mg/L
Δβ(NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N)	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N Konz. Änderung in einem best. Zeitabschnitt bzw. Konz. Differenz zwischen Zu- und Ablauf MDR	mg/L
Δβ(NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N Konz. Differenz zwischen Zu- und Ablauf MDR	mg/L
ρ	Dichte des Wassers	kg/ m <sup>3</sup>
Δt	Jeweils betrachteter Zeitabschnitt	d



## 1 Zusammenfassung

Die Fischproduktion in Kreislaufanlagen ist zurzeit die sicherste Methode um den steigenden Fischbedarf der Welt zu decken (Mayer-Tasch, 2007; Kunz & Graber, 2007). Da die Aquakultur weltweit einen Aufschwung erlebt, hat der Einsatz von innovativen Technologien in diesem Bereich ein gewaltiges Potential zur Minderung des Wasserverbrauchs bei gleichzeitiger Schonung der Umwelt.

In der Phase 2 des Projektes wurden der Membran-Denitrifikations-Reaktor (MDR) weiter entwickelt und diente dann als zusätzliche biologische und mechanische Stufe bei der Wasseraufbereitung in einer Aquakultur-Kreislaufanlage im halbtechnischen Maßstab. Der MDR bestand aus einem geschlossenen Behälter, in den ein Ultrafiltrations-Membranmodul integriert wurde. Polyurethan-Schaumstoff-Würfel dienten dabei als Trägermaterial für die Denitrifikation und gleichzeitig als Reinigungskörper für die Entfernung von Biofouling auf den Membran-Oberflächen. Als Substrat für die Denitrifikation wurde Ethanol eingesetzt. Dadurch konnten die beiden Wasseraufbereitungsstufen der Nitratelimination und der Entfernung von Mikropartikeln gleichzeitig in einem Reaktor durchgeführt werden.

Es wurden zwei Kreislauf-Anlagen mit gleichem Aufbau und gleicher Masse an Fischen betrieben. Zunächst erfolgte durch parallelen Betrieb der Nachweis, dass beide Anlagen vergleichbar waren. Danach wurde eine Anlage erweitert mit dem Membran-Deni-Reaktor (MDR), die andere – ohne Membran- und Denitrifikationsstufe - diente als Referenz. Durch den Vergleich der gewonnenen Messdaten aus den beiden Anlagen, konnte die Leistungsfähigkeit des MDR über eine Betriebsdauer von 286 d demonstriert werden. Es zeigte sich, dass sich die beiden Prozesse Partikelelimination und Denitrifikation erfolgreich miteinander kombinieren lassen. Da das Volumen des MDR relativ groß, die Futterrate und damit der N-Eintrag durch die Fische andererseits begrenzt war, waren die volumenbezogenen Denitrifikationsraten mit  $0,5 \text{ mg}/(\text{L h}) \text{ NO}_3\text{-N}$  vergleichsweise niedrig. Daher wurde in einem weiteren Versuchsabschnitt Nitrat-Lösung in den Reaktor zu dosiert und damit Denitrifikationsraten bis zu  $6 \text{ mg}/(\text{L h})$  erreicht. Der tägliche Wasserbedarf wurde durch den Einsatz des MDR von  $109 \text{ L/d}$  auf  $5 \text{ L/d}$  reduziert. Während der gesamten Versuchsdauer blieb der Transmembrandruck gering und der Permeatfluss ausreichend hoch. Daher musste das Membranmodul nicht zusätzlich mit Chemikalien gereinigt werden. Dies kann als Zeichen dafür gewertet werden, dass dem Fouling auf den Membranen mit Hilfe der Schaumstoffwürfel erfolgreich entgegengewirkt wurde.

Die bakteriologischen Untersuchungen der Fische und des Wassers zeigten, dass sich die Verwendung eines Denitrifikationsreaktors positiv auf die Mikroflora eines aquatischen Systems und damit auf die Fischgesundheit und das Tierwohl auswirken kann. Die Gesamtkeimzahl im Wasser konnte offenbar durch den Einsatz des Reaktors auf einem niedrigen Niveau gehalten werden. Dabei erschien die bakterielle Diversität jedoch weiterhin hoch, was zu einer Besetzung vieler ökologischer Nischen führt und somit die Etablierung von neu hinzukommenden, möglicherweise pathogenen Bakterien erschweren kann. Unter den identifizierten Bakterienspezies konnten aus der Anlage mit MDR weniger potentiell pathogene Keime und weniger Schmutzkeime isoliert werden. Auch dieser Umstand ist als sehr günstig im Hinblick auf die Fischgesundheit zu bewerten. Der positive Eindruck ließ sich anhand der Messungen von Cortisol im Blut und im Wasser bestätigen. Die Fische, die in der Anlage mit angeschlossenem MDR gehalten wurden, erschienen signifikant geringer gestresst als die Fische im Vergleichsbecken ohne MDR. Diese Stressminderung kann vermutlich auf die bessere chemische und mikrobiologische Wasserqualität zurückgeführt werden.

Insgesamt trägt der Einsatz eines MDR zur Verbesserung des Tierwohls in einer Aquakulturanlage bei.



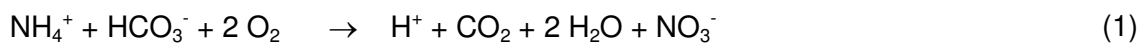
## 2 Einleitung

Aufgrund der Überfischung der Meere werden immer mehr Fische, Weichtiere und Krebse kontrolliert in Aquakultur-Anlagen produziert. Bei Süßwasserfischen liegt der Anteil aus Aquakultur inzwischen weltweit bei ca. 75 % (FAO, 2010).

Der Einsatz von Kreislaufanlagen ist besonders vorteilhaft, wenn geeignetes Frischwasser nicht in ausreichender Menge zur Verfügung steht, bei hohen Wasser- und Abwasserkosten, oder in der Nähe von Naturschutzgebieten. Aquakultur-Kreislaufanlagen haben im Vergleich zu konventionellen Durchlaufanlagen (z.B. Forellenzucht) einen relativ niedrigen Wasserbedarf (Kreislaufanlage: 0,5 m<sup>3</sup>/kg Fisch, prod. im Gegensatz zu einer Durchlaufanlage, Intensitätsstufe 1 mit 200 bis 400 m<sup>3</sup>/kg prod. Fisch, LAWA 2003). Um eine intensive Nutzung des eingesetzten Frischwassers zu ermöglichen, ist allerdings eine umfangreiche Wasseraufbereitung erforderlich mit Kohlenstoffabbau, Nitrifikation, Schlammmentnahme, CO<sub>2</sub>-Entfernung, Desinfektion, Anreicherung mit Sauerstoff und Temperierung des Wassers.

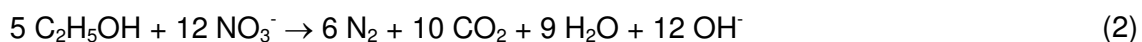
Eine weitere Verminderung des Wasserbedarfs ist nur über eine Nitratelimination zu erreichen. Mit einer (biologischen) Denitrifikationsstufe kann der Wasserbedarf einer Kreislaufanlage von 150 L/kg auf ca. 40 L/kg produzierten Fisch gesenkt werden (FAO Fisheries Report, 2001).

Ein Bedarf an Frischwasser entsteht u.a. dadurch, dass bei dem biologischen Prozess der Nitrifikation in der Wasseraufbereitung der Kreislaufanlage die Nitratkonzentration erhöht und gleichzeitig der pH-Wert gesenkt wird (s. Gl. (1)).



Um die entstandenen Nitratkonzentrationen zu senken und den pH-Wert konstant zu halten kann entweder ein Teil des Wassers ausgetauscht, oder ein Denitrifikationsreaktor eingesetzt werden. Der pH-Wert lässt sich auch unter Chemikalien-Einsatz, z.B. CaCO<sub>3</sub> oder NaHCO<sub>3</sub> weitgehend konstant halten.

Die heterotrophe Denitrifikation ist ein biologischer Prozess der Reduktion von Nitrat in der Reaktionsfolge NO<sub>3</sub><sup>-</sup> → NO<sub>2</sub><sup>-</sup> → N<sub>2</sub>O → N<sub>2</sub>, der bei Sauerstoffmangel durch Bakterienenzyme katalysiert wird. Als Elektronendonatoren können verschiedene organische Kohlenstoffverbindungen dienen, z.B. Ethanol (s. Gl. (2), vereinfacht ohne Berücksichtigung der Biomassenproduktion).



Ohne Denitrifikationseinheit müssen ca. 10 % bis 20 % des Kreislaufwasservolumens je Tag durch Frischwasser ersetzt werden. Dies führt neben dem Wasserbedarf zu hohem Energieaufwand, denn das Frischwasser muss vor der Einspeisung in die Anlage auf eine Betriebstemperatur von ca. 24 °C erwärmt werden.

Die Wasseraufbereitung für Aquakulturanlagen ist mit Blick auf die optimale Wasserqualität für Fischgesundheit und Wohlbefinden der Fische von entscheidender Bedeutung. Suboptimale Bedingungen können Gewebereaktionen der Kiemen mit der Folge von Hypoxie, Hyperkapnie und erhöhtem Ammoniakspiegel im Blut induzieren und Wachstum und die Qualität der Fische beeinträchtigen. Außerdem werden Stressreaktionen und Ausbrüche von Infektionserkrankungen begünstigt. Dies führt zu einer Beeinträchtigung der Produktivität, Lebensmittelqualität und der ökologischen Akzeptanz von Fischzuchten und behindert die weitere Entwicklung der Aquakultur (Verschure et al. 2000, Rana, 1997).

Der Einsatz von Desinfektionsmitteln oder Arzneimitteln führte in einigen Ländern zu einer Besorgnis erregenden Steigerung der Resistenz von fischpathogenen Bakterien gegenüber Antibiotika (Alcaide et al. 2005, Hoa et al. 2008). Außerdem wächst in der Öffentlichkeit die Besorgnis

über den Einsatz hoch wirksamer medikamentöser Substanzen, die damit nicht nur in die menschliche Nahrung, sondern auch aus solchen Anlagen in die Gewässer gelangen. Die WHO erklärte deshalb die Krankheitsvorbeugung an Stelle der Therapie zum Ziel für ein zeitgemäßes Gesundheitsmanagement in Aquakulturanlagen, nicht zuletzt, um dort den Verbrauch von Arzneimitteln einzuschränken (WHO, 2002).

Im Konzept eines vorbeugenden ökologischen Gesundheitsmanagements spielt die Wasserqualität und -aufbereitung eine herausragend wichtige Rolle. Stress-Faktoren für Fische wie schwankende pH-Werte und auch hohe Nitrit-Konzentrationen führen zu Reizungen des empfindlichen Kiemenepithels, zu vermehrter Schleimabsonderung mit Folge einer erschwerten Sauerstoffversorgung der Fische und einer Behinderung der Ausscheidung von Kohlendioxid und Ammoniak. Sehr hohe Nitratkonzentrationen erhöhen bei Fischen das Risiko von Infektionen mit fakultativ pathogenen Mikroorganismen. Eine Stabilisierung des pH-Wertes, sowie eine verlässliche Absenkung der Nitrit- und Nitratkonzentrationen lässt aus der Sicht des Gesundheitsmanagements eine wesentliche Verbesserung der Lebensbedingungen der Fische und somit eine verminderte Krankheitsanfälligkeit erwarten.

In der Aquakultur werden Denitrifikationsprozesse jedoch bisher nur sehr zurückhaltend eingesetzt. Zum einen wird Essigsäure, Methanol oder Ethanol als Kohlenstoffquelle für die Denitrifikation verwendet (z.B. Menasveta et al., 2001, Van Rijn et al., 2006), zum anderen wird eine anaerobe Vergärung des in der Fischproduktion anfallenden Schlamm vorgeschaltet, deren Abbauprodukte (meist ein Gemisch aus organischen Säuren und anderen Substanzen) dann als Substrat für die Denitrifikation verwendet werden (Aboutboul et al., 1995). Auch sogenannte „single-sludge“ Verfahren, die in etwa einer vorgeschalteten Denitrifikation bei der klassischen Abwasserbehandlung entsprechen, werden eingesetzt. Hierbei wird organischer Schlamm aus Futterresten und Faeces als C-Quelle verwendet (Klas et al., 2006).

Obwohl die beiden letztgenannten Verfahren den Vorteil bieten, ein kostenloses Substrat zu verwenden, sind sie in der praktischen Anwendung nur schwer zu handhaben und führen zu hohem technischen Aufwand, um möglichen negativen Auswirkungen auf die Fische (z.B. durch hohe  $H_2S$ -Konzentrationen) zu begegnen. Aufgrund der genannten Probleme und der nicht unerheblichen Investitionskosten wird die Stickstoffelimination in der Fischproduktion nur zögerlich umgesetzt.

Ein weiterer Stressfaktor für Fische bei Kreislaufanlagen ist die Anreicherung suspendierter Mikropartikel (Durchmesser  $< 20 \mu m$ ), die sich nicht durch Sedimentation oder Mikrosiebeinsatz entfernen lassen. Aus diesem Grund ist hier der Einsatz einer Membrantechnologie von besonderem Interesse. Die Ergebnisse eines von der DBU geförderten Projekts der Firma Busse (Az. 18579: „Entwicklung und Erprobung einer Versuchsanlage in zwei Phasen zur Biomembranfiltration in Kreislaufanlagen“) haben den Nutzen von Membranen in der Fischzucht aufgezeigt. Bei diesem Projekt wurde das ursprünglich für die Abwassertechnik eingeführte „Membranbelegungsverfahren“ angewendet, mit konventioneller Entfernung der Foulingschicht auf den Membranen durch Begasung mit Luft. Viadero & Noblet (2002) konnten mit einer 50 nm Hohlfaser-Membran eine Feststoff-Minderung um 94 % und eine Verringerung des  $BSB_5$  (Biochemischer Sauerstoffbedarf n. 5 d) um 76 % erreichen. Ein Verfahren der kontinuierlichen Reinigung von Polymermembranen mit verschiedenen Polymergranulaten unter Lufteintrag wurde von Krause et al. (2008 a, b) im Labormaßstab getestet. Die Widerstandsfähigkeit des Membranmaterials war zwar nicht optimal gewährleistet, da einige Kratzer in der Oberfläche zu beobachten waren, die aber nicht zu einem Integritätsverlust führten. Eine Weiterführung dieses Ansatzes wurde in einem von der DBU geförderten Projekt mit einer halbtechnischen Anlage untersucht (Helmus et al., 2014).

Ähnliche Versuche mit Laboranlagen wurden mit Polyurethan-Schaumstoffstückchen durchgeführt. Sie eignen sich gut für die kontinuierliche Reinigung von Membranen unter gleichzeitiger Nutzung als Aufwuchsfläche für Biofilme (Jun et al., 2003, Ngo, H. et al., 2008). Auch hier wurden die Turbulenz und damit die Reinigungswirkung mit einer Luft-Begasung erhöht.

Da bei einem Verfahren, das Denitrifikation mit einer Membranreinigung verbindet, ein Lufteintrag unerwünscht ist, sind alternative Verfahren zur Reinigung der Membranen gefordert. Eine Anwendung von getauchten keramischen Membranen bei der anaeroben Abwasserreinigung wurde von Borchmann & Rosenwinkel (2008) beschrieben. Zur Turbulenzerzeugung und Reinigung der Membranen wurde hier Biogas eingesetzt. Auch Versuche zur Reinigung durch abrasiv wirkende Kunststoffkörper wurden durchgeführt.

Diese Beispiele zeigen: der Bedarf an Alternativen zur Luft-Begasung zur Reinigung von Membranen ist groß. Dies gilt insbesondere für anaerobe und anoxische, aber auch für aerobe Verfahren, da die Belüftung energieaufwändig ist. Die Membranfiltrationstechnik wird heute zunehmend eingesetzt und könnte zukünftig als Ergänzung zur herkömmlichen Mikrosiebung in Aquakulturbetrieben verwendet werden. Daher ist es von Vorteil eine raum- und kostensparende Kombination von Denitrifikation und Membranreinigung zu entwickeln.

Ziel des Vorhabens war es daher, die Wasseraufbereitung in der Aquakultur durch Verringerung der Stickstoff- und Mikropartikelfracht zu verbessern. Dazu wurde ein biologisches Hochleistungssystem zur Reduktion von Nitrat mit einer Membraneinheit zur Entfernung von Biomasse, aber auch von Pilzen, Bakterien und Parasiten verknüpft. Mit dieser Prozessführung lassen sich Nitrat- und Mikropartikel-Konzentrationen im Fischproduktions-Kreislauf niedrig halten. Zur Minderung des Biofouling, und dem damit verbundenen Rückgang der Volumenströme, wurden zur Membranreinigung durch einen Wasserstrom bewegte Kunststoffkörper eingesetzt.

In der ersten Phase des Projektes wurde die Konzeption der zentralen Projektidee mit verschiedenen Abrasionskörper-Materialien geprüft. Ein wichtiger Punkt war dabei die Widerstandsfähigkeit der Membran gegenüber verschiedenen Granulaten bzw. Schaumstoffen. Mit Untersuchungen mit speziell dafür konstruierten Reaktoren sollte die Leistungsfähigkeit bezüglich Denitrifikation (Denitrifikationsrate) und Filtration (Permeatfluss, Transmembrandruck) in einem Aquarium mit Fischen ermittelt werden. Mit umfangreichen Analysen und Online-Messungen wurde die Wasserqualität (z.B. Ammonium, Nitrit, CSB, DOC) überwacht. Weiterhin wurden Methoden für die Untersuchung der Reaktionen von Fischen und Bakterien auf die Milieubedingungen entwickelt.

Nachdem die Labor-Versuche in Phase 1 erfolgreich waren, sollten nun in Phase 2 des vorliegenden Projektes Untersuchungen mit einem verbesserten Membran-Denitrifikations-Reaktor (MDR) im halbertechnischen Maßstab durchgeführt werden. Im Reaktor befanden sich Polyurethan-Schaumstoffwürfel, die an den Membranoberflächen vorbei geführt werden, um einen Abtrag der Deckschicht zu erreichen.

Ein Ziel war daher die Frage zu klären, ob eine längerfristige Membranfiltration unter den Bedingungen der Denitrifikation möglich ist. Eine Aufgabe bestand zunächst darin eine Rezirkulationsströmung mit ausreichender Strömungsgeschwindigkeit zu erzeugen, damit die Schaumstoffwürfel mitgeführt werden und ein Reinigungseffekt der Membranen eintritt. Diese Aufgabenstellung konnte nur mit einem transparenten Reaktor untersucht werden. In Phase 1 des Projektes wurden undurchsichtige Reaktoren aus Polypropylen verwendet, bei denen die Strömungsverhältnisse im „Dunklen“ blieben. Schließlich sollte untersucht werden wie leistungsfähig der Denitrifikationsprozess ist, wenn das Trägermaterial für die Biomasse gleichzeitig zur Reinigung der Membranen dient.

---

Neben der Beobachtung von Nitrat, Nitrit, Ammonium, Temperatur, pH-Wert und Sauerstoffeintrag und vielen weiteren Parametern, sollte als Auswirkung der Denitrifikation und Membran-Filtration auch der Frischwasserverbrauch, der Bedarf an  $\text{NaHCO}_3$  zur pH-Wert Anhebung bei der Referenzanlage, sowie der Verbrauch von Ethanol für die Denitrifikation erkundet werden.

Von zentraler Bedeutung für die Anwendbarkeit in der Praxis waren die Untersuchungen der Reaktionen von Fischen auf die Milieubedingungen. Neben der regelmäßigen Ermittlung der Fischmasse, sind hier besonders die von den Fischen in das Wasser abgegebenen Stresshormone (Cortisol) zu erwähnen.

Um die Rolle der in diesem Vorhaben neu entwickelten Filtersysteme auf die heterotrophe Mikroflora als mögliche Quelle für Infektionserreger mit zu erfassen, sollte auch die Interaktion der Mikroflora im Prozesswasser mit der adhärennten Mikroflora auf der Haut von Fischen untersucht werden.



### 3 Vorwort, Projektverlauf

Bei der Kontaktaufnahme mit Firmen, die den MDR-Reaktor bauen könnten, stellte sich schnell heraus, dass nur PMMA (Plexiglas®) als Material in Frage kam, da der Reaktor durchsichtig sein sollte. Aufgrund von Festigkeitsberechnungen musste eine weitaus größere Wanddicke vorgesehen und damit die Vor-Konstruktion in weiten Teilen überarbeitet werden. Dabei wurden Details verbessert, z.B. wurde der Deckelverschluss mit Schnellspannern statt Schraubverbindungen realisiert, die Schrauben wurden versenkt und eingeklebt und vieles andere.

Dennoch ergaben sich Probleme mit der Druckfestigkeit des Reaktors. Bei mehreren Tests, noch in der Fertigungshalle des Herstellers, entstanden Risse im MDR. Nach jedem erfolglosen Test wurden neue Verstärkungen konstruiert und gefertigt. Dies war sehr zeitaufwändig und führte zu einer Verzögerung des Projektplans. Ohne die Mithilfe von Steffen Boley, Sohn von Angela Boley, der sowohl die Konstruktion immer wieder den Herausforderungen anpasste, als auch die Edelstahl-Verstärkungen und Einsätze für den Reaktor am Institut für Strahlwerkzeuge der Universität Stuttgart (IFSW) in einem Laserschneidverfahren herstellte, wäre der Reaktor vermutlich nie fertig geworden.

Nachdem der Reaktor dann endlich im ISWA aufgebaut war, konnten die eigentlichen Versuche beginnen.

Dieser Bericht beinhaltet Ergebnisse aus den Bachelorarbeiten von Philipp Beyer, Johannes Irttenkauf und Hannes Heynhold, sowie der Diplomarbeit von Ganna Korshun, die im Rahmen des vorliegenden Projektes durchgeführt wurden. Aufgrund des begrenzten Umfangs dieses Berichts können nur wenige ausgewählte Ergebnisse aus diesen Arbeiten vorgestellt werden.

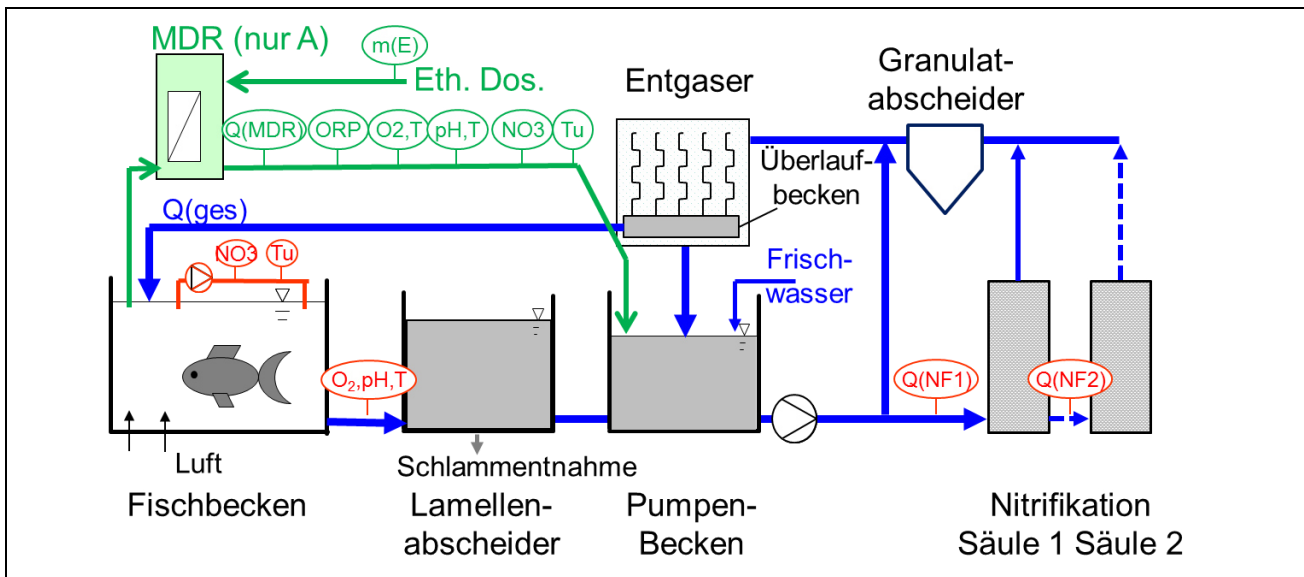


## 4 Material und Methoden

### 4.1 Aquakultur-Kreislaufanlagen für die halbtechnischen Versuche

#### 4.1.1 Wasseraufbereitung - Übersicht

Beide halbtechnischen Kreislaufanlagen bestehen jeweils aus einem mit Fischen besetzten Becken, einer konventionellen mechanischen und biologischen Wasseraufbereitung mit Schlammabtrennung (Lamellenabscheider), Nitrifikation und aerober Kohlenstoffabbau (Nitrifikation Säule 1 und Säule 2), Entgaser (s. Abb. 1). Die Anlage A wurde zunächst in der gleichen Weise wie die Anlage B betrieben, später mit dem Membran-Deni-Reaktor (MDR) erweitert. Die Anlage B ohne MDR diente dabei als Referenz.



**Abb. 1:** Vereinfachtes Schema der Anlagen A u. B mit Sensoren/Messgeräten. Grün: nur Anlage A; Alles andere: Anlagen A u. B Zeichenerklärung s. Tab. 1.

**Tab. 1:** Zeichenerklärung der Symbole für Sensoren in Abb. 1:

Symbol	Beschreibung	Dim.
m(E)	Masse der dosierten Ethanollösung	g
Q(MDR)	Volumenstrom, Ablauf MDR	L/h
ORP	Redoxpotential, Ablauf MDR	mV
O <sub>2</sub> , T	Sauerstoffkonz., Temperatur (Abl. MDR + Abl. Becken)	mg/L, °C
pH, T	pH-Wert, Temperatur (Abl. MDR + Abl. Becken)	mg/L, °C
NO <sub>3</sub>	Nitratkonzentration (Abl. MDR + Becken)	mg/L
Tu	Trübung (Abl. MDR + Becken)	mg/L
Q(ges)	Volumenstrom Gesamte Wasseraufbereitung	L/h
Q(NF1)	Volumenstrom durch die Nitrifikationssäule 1	L/h
Q(NF2)	Volumenstrom durch die Nitrifikationssäule 2	L/h

Die einzelnen Elemente der beiden Anlagen sind baugleich mit gleichen Volumina, mit Ausnahme des MDR (s. Tab. 2). Es wurde darauf geachtet, dass beide Anlagen immer mit nahezu gleichen Betriebsparametern betrieben wurden, um die Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Sauerstoff, pH-Wert und Temperatur wurden nicht direkt im Fischbecken gemessen. Wegen besserer Anströmung waren die Sensoren in das Auslaufrohr des Fischbeckens im Lamellenabscheider eingebaut.

**Tab. 2: Kennwerte der Anlagen A und B**

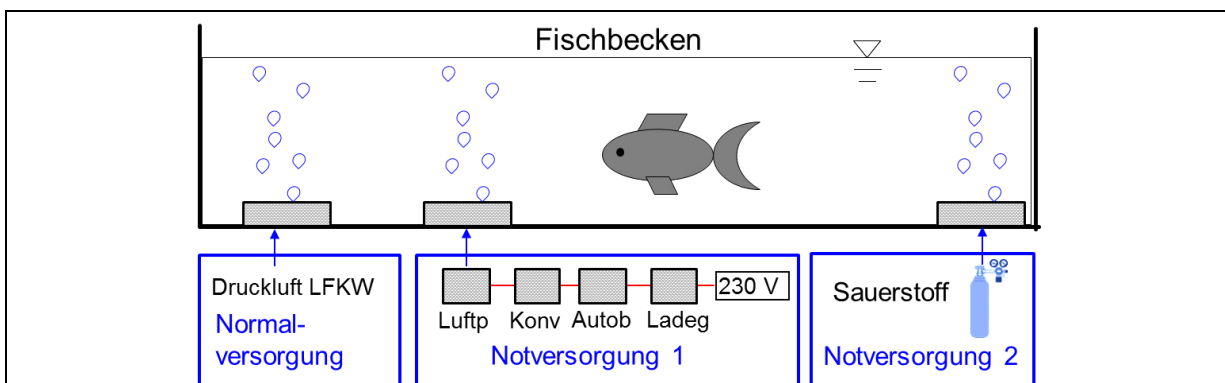
Parameter	Symbol	Wert	Dim.
Gesamt Wasservolumen der Anlage A (ohne MDR)	$V(A)$	1850	L
Wasservolumen des MDR (A)	$V(MDR)$	600	L
Gesamt Wasservolumen der Anlage A (mit MDR)	$V(A) + V(MDR)$	2450	L
Gesamt Wasservolumen der Anlage B (ohne MDR)	$V(B)$	1850	L
Volumen NF1 = Volumen NF2	$V(NF1) = V(NF2)$	99	L
Volumenstrom durch die Anlage (A, B)	$Q_{ges}$	780	L/h
Volumenstrom durch die Nitrifikationssäule 1 (A, B)	$Q(NF1)$	2100	L/h
Volumenstrom durch die Nitrifikationssäule 2 (A, B)	$Q(NF2)$	810	L/h
Volumenstrom durch MDR	$Q(MDR)$	0...150	L/h

<sup>1)</sup> Volumen des Granulats ist abgezogen

#### 4.1.2 Fischbecken und Sauerstoffversorgung der Fische

Die Fische wurden in rechteckigen Becken mit transparenten Abdeckungen gegen zufälliges Herausspringen gehalten. Die Becken waren teilweise mit schwarzen Folien abgedeckt, um dunklere Bereiche und damit Ruhezone für die Fische zu schaffen.

Um ausreichend Sauerstoff in das Wasser einzutragen, musste das Becken mit Druckluft von der Kläranlage belüftet werden. Zusätzlich wurde eine elektrische Luftpumpe zur Belüftung des Wassers eingesetzt. Diese wurde über eine Autobatterie versorgt, die immer an der Stromversorgung angeschlossen war und damit als Notversorgung (1) diente, wenn der Strom oder die Druckluftversorgung der Kläranlage ausfiel. Zusätzlich stand eine Druckflasche mit reinem Sauerstoff zur Verfügung. Bei Stromausfall wurde ein Magnetventil geöffnet und die Notversorgung (2) war vorübergehend gewährleistet (s. Abb. 2). Die Notversorgung 1 wurde erst im Laufe der Versuche nachgerüstet, da es zu einem Stromausfall kam, bei dem durch einen Defekt auch die Notversorgung 2 versagte. Im Zeitraum der Versuche fiel mehrmals für einige Stunden der Strom aus, wobei es in einem Fall zu größeren Verlusten an Fischen kam.



**Abb. 2: Sauerstoffversorgung: Normalversorgung mit Druckluft von LFKW, Notversorgung 1: Autobatterie-Ladegerät (Ladeg), Autobatterie (Autob), Stromkonverter 12 V → 230 V (Konv), Luftpumpe (Luftp), Notversorgung 2: Sauerstoff-Druckgasflasche**

#### 4.1.3 Nitrifikationssäulen (NF)

In den Nitrifikationssäulen erfolgt die mikrobielle Oxidation von Ammonium zu Nitrit und Nitrat, gleichzeitig wird organischer Kohlenstoff zu  $CO_2$  oxidiert. Die beiden Säulen werden im Fließbettverfahren betrieben, bei dem ein schwebendes PVC-Granulat (bzw. PP-Granulat in Anlage B, NF2) als Besiedlungsfläche für Mikroorganismen dient (s. Tab. 3)

**Tab. 3: Nitrifikationssäulen Kennwerte**

Granulat	Dim.	PVC	PP (mit CaCO <sub>3</sub> )
Schüttdichte	kg/L	0,708	*
Dichte	kg/L	1,275	*
Masse Granulat	kg	20	20
Schüttvolumen	L	28	*
Vol. spez. Oberfläche	m <sup>2</sup> /L	1,6...1,8	*
Mass. spez. Oberfläche	m <sup>2</sup> /kg	2,3...2,5	*

\* keine Daten verfügbar

#### 4.1.4 Membran-Deni-Reaktor (MDR)

##### 4.1.4.1 Vorüberlegungen, Vorversuche und Konstruktion des Membranmoduls (MMF)

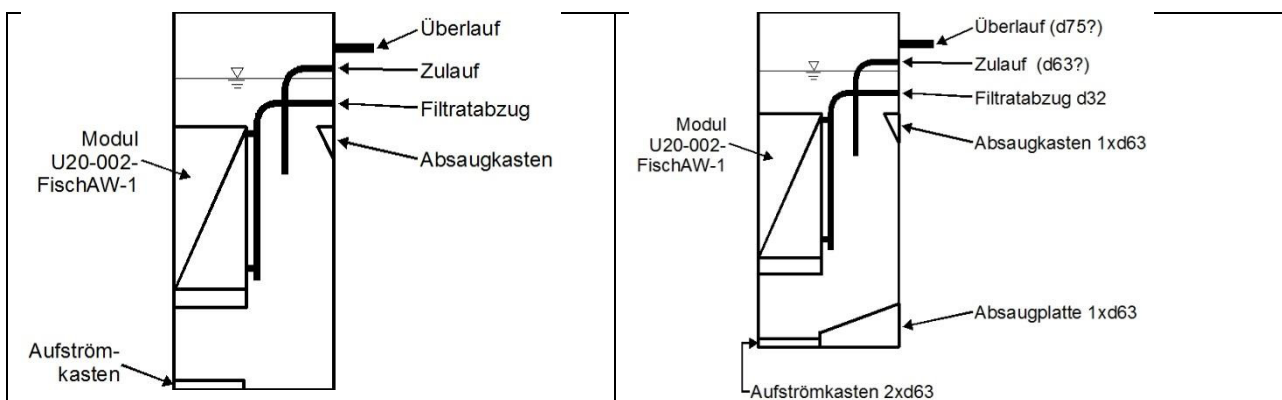
Für die halbtechnische Phase 2 sollte ein Modul UX20-002 von MMF verwendet werden. Im Normalfall mit einer Filtrationsfläche von ca. 20 m<sup>2</sup>, und einem Abstand zwischen den Filtrationsplatten von 7 mm. Da ein Lufteintrag hier nicht möglich ist und die Reinigung durch Aufwuchskörper erfolgt, muss der Plattenabstand auf ca. 20 mm erhöht werden, um ein Verkeilen der Aufwuchskörper zwischen den Platten zu vermeiden.

Übliche hydraulische Permeatflüsse eines UF-Membranmoduls liegen bei (15 bis 25) L/(m<sup>2</sup> h) bei einem TS-Gehalt (Belebtschlamm) von (8 bis 15) g/L. Hier sollten sie deutlich geringer ausfallen. Bei einer Filtrationsfläche von 12 m<sup>2</sup> können bei einem Permeatfluss von 5 L/(m<sup>2</sup> h) 60 L/h und bei 12 L/(m<sup>2</sup> h) bis zu 144 L/h aufbereitet werden.

##### Reaktorentwicklung

Der Membran-Denitrifikations-Reaktor (MDR) sollte in eine bereits bestehende Aufbereitungsanlage integriert werden (s. Abb. 1). Aufgrund der Gegebenheiten im Technikum des ISWA war der MDR so zu konzipieren, dass ein Einsetzen des Moduls von der Seite her möglich ist.

Die Entwicklungsstufen der Reaktorgestaltung finden sich in Abb. 3. Durch einen geschlitzten Aufströmkasten unterhalb des Membranmoduls sollen die Aufwuchskörper mit einem Wasserstrom möglichst gleichmäßig durch die Aufstellfläche des Moduls getragen werden. Ein Absaugkasten, im spitzen Winkel zur Strömungsrichtung der Körper soll ein Ansaugen weitgehend unterbinden. Die Dichte der Körper ist nahe 1 g/cm<sup>3</sup> und damit ihre Sinkgeschwindigkeit gering. Somit wird schon eine geringe Strömungsgeschwindigkeit am Absaugkasten die Körper ansaugen und die Öffnung ggf. verstopfen. Um dies zu verhindern wurde zusätzlich eine Absaugplatte am Boden geneigt angeordnet, damit die Körper „herabgleiten“, um dann in den Aufstrom zu gelangen



**Abb. 3: Erste Version des Reaktors (li) u. Ausführung (re)**

Für die Ausführung Abb. 3 (re), wurde die Konstruktion dahingehend verbessert, die Absaugung in zwei Teilströmen vorzunehmen. Sie erlaubt eine größere Variationsmöglichkeit im Versuchsbe-

trieb. Der Absaugkasten und die Absaugplatte können über Ventile unabhängig angesteuert werden. Die Schlitzbreite wurde mit 3,0 mm festgelegt und die Schlitz- auf die Plattenlänge abgestimmt. Der Schlitzabstand und ihre Anzahl wurde so variiert, bis sich mit dem angenommenen Volumenstrom von max. 47,0 m<sup>3</sup>/h eine Geschwindigkeit < 1 m/s ergab. Damit sollte sichergestellt werden, die Turbulenz möglichst gering zu halten.

### **Konstruktive Herausforderungen**

Die gewünschte Filtrationsfläche bei gefordertem Abstand von 20 mm zwischen den Platten ist aufgrund der Modulabmessungen und der Plattendicke so nicht erreichbar. Dünnere Absaugplatten oder eine Veränderung der Modulmaße wären erforderlich. Die Versuche sollten jedoch mit Standardmodulgrößen (ohne Umstellung des Fertigungsprozesses) durchgeführt werden. Daher wurde das Modul mit einer dünneren Trägerplatte konzipiert. Da die Flächenbelastung relativ gering und ein größerer Abstand (wg. Aufwuchskörper) zur Sicherstellung des störungsfreien Betrieb zu fordern war, wurde Version 1 gebaut und Version 2 vorbereitet. Das fertige Modul und die Maße der beiden Varianten sind in Abb. 4 dargestellt.

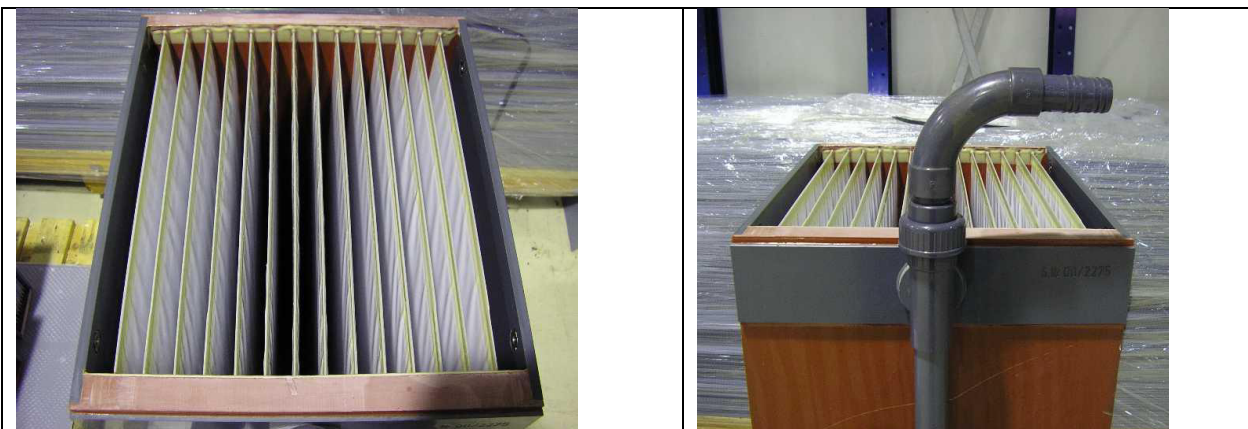
Weitere Details finden sich in Abb. 5: Zu erkennen ist der vergrößerte Plattenabstand, Anschluss über Verschraubung mit Übergang auf Schlauch. Richtung der Absaugung dadurch variabel, kann den Erfordernissen des Reaktors angepasst werden.



**Abb. 4: Fertiges Modul**

Es wurden zwei Module berechnet, welche jeweils eine Bedingung annähernd erfüllen konnte.

- UX20-002-FischAW-1:  
Filtrationsfläche 11,08 m<sup>2</sup> bei berechneten Abstand von 19,67 mm, 14 Filtrationsplatten
- UX20-002-FischAW-2:  
Filtrationsfläche 11,88 m<sup>2</sup> bei berechneten Abstand von 18,12 mm, 15 Filtrationsplatten

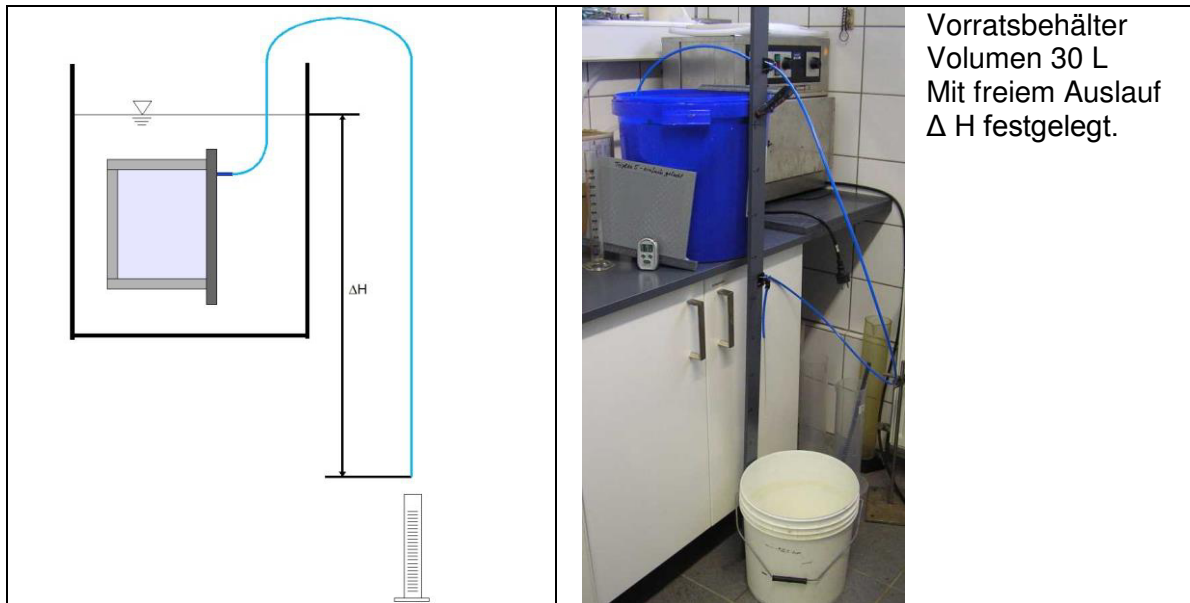


**Abb. 5: Draufsicht (li), Gestaltung Anschluss (re), Sondermodul U20-002-FischAW1**

### Ermittlung der Kenndaten für dünnere Trägerplatten

Versuchskörper mit 5 mm und 3 mm Trägerplatten wurden gefertigt. Die Platten wurden am Rand abgedichtet und in PVC-Halteklötze eingeklebt.

Die Versuche wurden im "Gravity Flow" durchgeführt, s. Abb. 6. Über den Wasserstand im Vorratsbehälter und die Position des freien Auslaufs lässt sich die Druckdifferenz  $\Delta H$  einstellen.



Vorratsbehälter  
Volumen 30 L  
Mit freiem Auslauf  
 $\Delta H$  festgelegt.

**Abb. 6: Aufbau des Versuchsstandes**

Eine unbespannte, eine mit Vlies und eine mit Membran und Vlies bespannte Platte, jeweils mit 5 mm und 3 mm dicker Trägerplatte wurden getestet. Der freie Auslauf von 10 cm unterhalb des Wasserspiegels jeweils um 10 cm je Versuch nach unten versetzt. Beim letzten Versuch war eine Druckhöhendifferenz von 100 cm  $\equiv$  100 mbar gegeben. Die Volumenmessung erfolgte mit Standzylinder, Volumen 100 mL.

Die Dauer der Messzeit wurde in Abhängigkeit vom Volumenstrom ausgewählt. Bei hohem Volumenstrom, unbespannte Platte, wurde mit einer Messzeit von 15 s gestartet. Bei einem neg. Überdruck von 70 mbar wurde die Zeit auf 10 s verkürzt. Bei Drücken von (-90 und -100) mbar wurde die Zeit abermals verkürzt auf 5 s. Bei der mit Vlies bespannten Platte musste die Messzeit bereits bei 50 mbar auf 10 s und bei 80 mbar auf 5 s verkürzt werden. Bei den Versuchen mit Membran und Vlies ließ sich die Messzeit bei 60 s halten.

Für jede einzelne Platte wurde die freie Filtrationsfläche ermittelt. Die Messwerte wurden in L/h umgerechnet und dividiert durch die Gesamtfiltrationsfläche in  $\text{m}^2$ , zur Bestimmung der Flussdichte in  $\text{L}/(\text{m}^2 \cdot \text{h})$ . Die Permeabilität wurde unter Berücksichtigung der Filtrationsfläche und des Drucks berechnet.

#### **4.1.4.2 Membranmodul für die halbtechnischen Versuche**

Bei den verwendeten Membranen handelte es sich um eine Ultrafiltrationsmembran aus PES (Polyethersulfon) mit der Porenweite 0,03...0,1  $\mu\text{m}$ , oder 150 kDa.

Tab. 4 zeigt die Kennwerte des eingesetzten Membranmoduls.

**Tab. 4: Kennwerte Membranmodul**

Parameter	Symbol	Wert	Dim.
Aktive Membranfläche	$A_m$	11,5	$m^2$
Netto-Membranmodul-Volumen	$V(M)$	64	L
Länge Membranmodul	$l (M)$	0,46	m
Breite Membranmodul	$b (M)$	0,385	m
Höhe Membranmodul	$h (M)$	1,058	m
Permeatfluss Membranmodul <sup>1)</sup>	$J_p$	15-30	$L/(m^2 \cdot h)$

1) Erfahrungswerte von MMF

#### 4.1.4.3 Bau, Funktionsweise MDR (MMF, ISWA)

Im MDR wird Nitrat zu gasförmigem Stickstoff reduziert und das Wasser anschließend membranfiltriert.

Der Reaktor wurde von der Firma Hans Keim (Leonberg) aus PMMA (Polymethylmethacrylat, Plexiglas®) gefertigt. Ein Seitenteil des Reaktors ist mit einer Türe versehen, um Einbau und Wartung des Membranmoduls zu ermöglichen. Weiterhin ist vorne unten eine Fensteröffnung für die Montage angebracht (s. Abb. 7). Der Deckel wird mit Schnellspannern mittels Silikondichtung luftdicht abgeschlossen.

Trotz sehr sorgfältiger, detaillierter Konstruktion des Reaktors und einer vorherigen Belastungsrechnung des Herstellers, ergaben sich Probleme mit der Druckfestigkeit. Bei den ersten Tests, noch in der Fertigungshalle des Herstellers, zeigten sich bereits bei Überdrücken von ca. 100 mbar Risse im Material. Daher wurden nach und nach Verstärkungen aus PMMA angebracht, ein weiterer Rahmen aus Edelstahl und Schraubzwingen an der Tür angebracht, bis bei der letzten Druckprüfung ein maximaler Überdruck von ca. 300 mbar erreicht wurde. Dies wurde für die Versuche als ausreichend angesehen.

Für die kontinuierliche Reinigung der Membranplatten und als Trägermaterial für den Denitrifikationsprozess werden PU-Schaumstoff-Würfel mit einer Kantenlänge von 10 mm eingesetzt (s. Abb. 9).



**Abb. 7: MDR, li: CAD-Konstruktion, Mitte: Foto, Start des Reaktors, re: Versuchende**

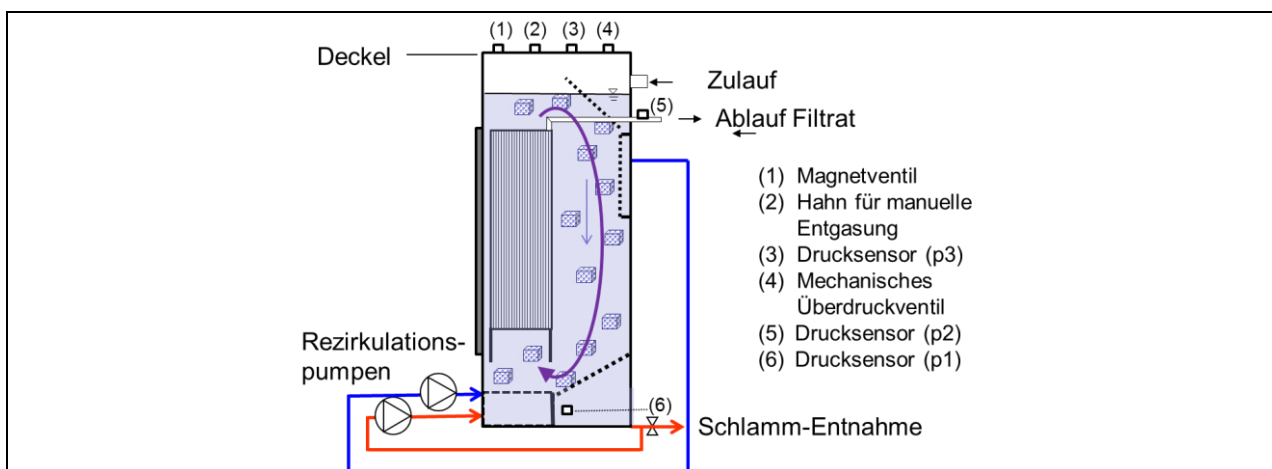
Die Reinigungswirkung der Schaumstoff-Würfel ist strömungsabhängig. Um die gewünschte starke Umwälzung zu erzeugen, wurden zwei Kreislumpen („Aqua Plus 8“, Aquatechnix) eingesetzt und zwei interne Kreisläufe erzeugt (s. Abb. 8). Es stellte sich heraus, dass eine Pause bei der Umwälzung dazu führte, dass die Kunststoff-Würfel aufschwammen und sich nur mit Schwierigkeiten wieder im Umlauf bringen ließen. Um das zu verhindern und gleichzeitig die Deckschicht-



bildung auf den Absauggittern zu vermeiden, wurden beide Pumpen im Wechsel in folgendem Intervall betrieben: 15 min Pumpe 1, 15 min Pumpe 2, 15 min beide Pumpen. Die Betriebszeiten der Pumpen werden vom Leitrechner mit der Software MULTIMESS gesteuert.

Das Magnetventil (1), s. Abb. 8, für die Computer-gesteuerte Entgasung wurde installiert, um den Wasserstand im Reaktor konstant zu halten. Sinkt der Wasserstand infolge der Gas-Produktion durch die Denitrifikation, wird das Magnetventil kurz geöffnet. Dadurch sinkt der Volumenstrom durch die Membran vorübergehend ab und der Reaktor wird durch die MDR-Pumpe weiter aufgefüllt.

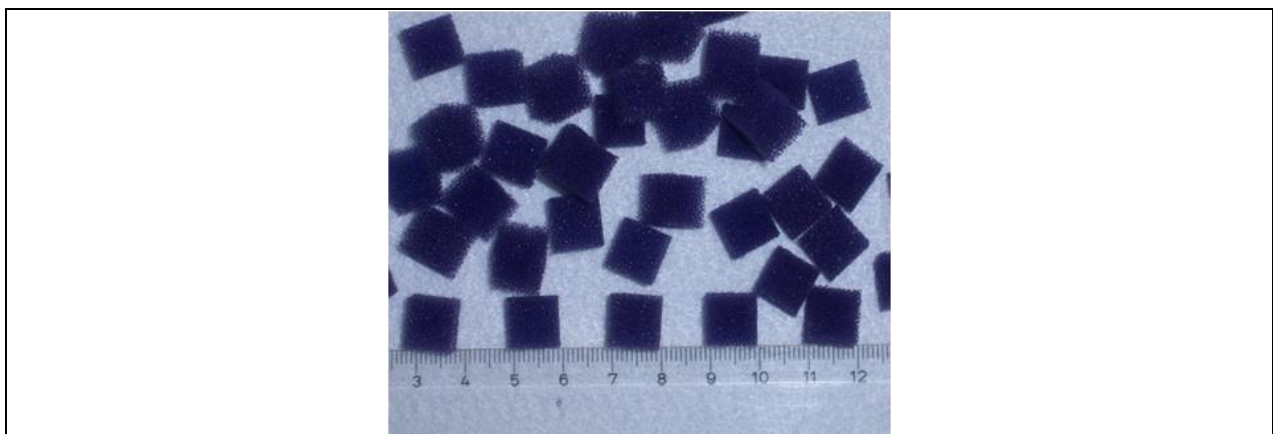
Der Hahn für die manuelle Entgasung (2) wird für die manuelle Druckentlastung, z.B. vor dem Öffnen des Deckels, verwendet. Zusätzlich wird die Anlage mit drei Drucksensoren (3), (5) und (6) überwacht. Die Daten der Drucksensoren sind Grundlage der Berechnungen von Wasserstand und TMP.



**Abb. 8: Schema Wasserkreislauf MDR**

#### 4.1.4.4 Schaumstoff-Würfel

Als Abrasionskörper und gleichzeitig als Trägermaterialien für Bakterien wurden offenporige Schaumstoff-Würfel aus PU (Polyurethan), Hersteller: EMW Filtertechnik, Diez mit der Bezeichnung „Poret Polyether Schaum PPI 45 lila“ eingesetzt (s. Abb. 9). Voruntersuchungen (s. Bericht zu Phase 1 des Projektes) haben gezeigt, dass dieses Material für den hier angestrebten Zweck gut geeignet ist (Schlussbericht Phase 1).



**Abb. 9: Schaumstoff-Würfel (Kantenlänge 10 mm)**

Die poröse Struktur der Schaumstoffwürfel erlaubt einerseits eine große Oberfläche für das Wachstum der Mikroorganismen. Andererseits wird der Biofilm im Porenraum vor Abreibung geschützt. Tab. 5 gibt Auskunft über die wesentlichen Parameter des Membranmoduls und der Schaumstoff-Würfel.

**Tab. 5: Kennwerte der Schaumstoffwürfel**

Parameter	Symbol	Wert	Dim.
Masse Schaumstoff-Würfel	m (S)	588	g
Schüttvolumen Schaumstoff-Würfel	VS (S)	40	L
Zahl Schaumstoffwürfel	N (S)	20560	1
(Äußere) Oberfläche der Schaumstoffwürfel	A (S)	12,3	m <sup>2</sup>

#### 4.1.4.5 Substratdosierung

Als Kohlenstoffquelle für die Denitrifikation wurde eine wässrige Ethanol-Lösung (0,1 g/g) verwendet. Die Flasche mit Ethanol-Lösung befand sich auf einer Waage, deren Masse alle 5 min im Rechner gespeichert wurde. Die Dosierung erfolgte intervallweise mit Hilfe einer Membran-Dosierpumpe mit Rückschlagventil. Die dosierte Menge an Ethanol-Lösung wurde über das Dosierintervall gesteuert und war von der aktuellen Nitratkonzentration und dem Sauerstoffgehalt im Reaktorlauf abhängig (s. Gl. (31)). Die Steuerung der Pumpe und damit der dosierten Menge erfolgte mit der Software MULTIMESS, die eine Relaischaltbox ansteuerte.

#### 4.1.4.6 Nitrat-Dosierung

Da die Kreislauf-Anlagen durch die Kapazität der Nitrifikationssäulen begrenzt waren, war es nicht möglich die Futtermengen so weit zu steigern, dass eine Aussage über die Grenzen der Denitrifikationsleistung möglich wäre. Um die Leistungsfähigkeit des MDR dennoch auszuloten, wurde ab dem 384. d eine wässrige NaNO<sub>3</sub>-Lösung (Massenanteil NO<sub>3</sub><sup>-</sup>-N 0,04 g/g) in den Zulauf zum Reaktor dosiert. Die Flasche mit der NaNO<sub>3</sub>-Lösung stand auf einer Waage, deren Daten (Masse der Lösung) an den PC übertragen wurden. Bei der Steuerung der Ethanol dosierung wurde diese zusätzliche Nitratmenge als konstante Nitratfracht berücksichtigt (und entsprechend mehr dosiert).

#### 4.1.5 Messgeräte und Technik

Die beim Betrieb der Anlage eingesetzten Geräte sind in Tab. 6 und

Tab. 7 aufgeführt. Die Positionen der Sensoren können Abb. 1 und Abb. 8 entnommen werden.

**Tab. 6: Messgeräte und Sensoren, Anlagen A und B**

Parameter	Bezeichnung	Messgerät
Volumenstrom	Q(NF1), (NF2) Q (MDR)	MAG 5000 MID (Siemens, Denmark) + VC820 (Conrad Electronic SE, Hirschau)
Druck MDR unten	p1	GMH 3156 (Greisinger, Regenstauf) + MSD 2,5 BAE
Druck MDR Permeatleitung	p2	
Druck MDR Deckel	p3	
Trübung	Tu	SC 100, SC 200 + Ultraturb (HACH LANGE GmbH, Düsseldorf)
Sauerstoff / Temperatur	O <sub>2</sub> , T	Multiline P4 + Cellox® 325, SenTix® 41, jeweils mit Temp.Sensor (WTW, Weilheim)
pH-Wert / Temperatur	pH, T	
Nitrat	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Spectrolyser (S::CAN, Wien) bzw. Nitratax plus + sc100 (HACH LANGE, Düsseldorf)
Masse Ethanol lösung (Waage)	m(E)	Kern FCB 24 K 1 (Kern & Sohn GmbH, Balingen-Frommern)
Redoxpotential	ORP	GMH 3530 (Greisinger, Regenstauf) mit Sensor GE 105 BNC

Tab. 7: Weitere Geräte Anlagen A und B

Gerät Type	Hersteller	Eingesetzt in der Anlage	Kennwerte
Kreiselpumpe „Aqua Plus 8“	Aquatechnik, Neunkirchen	Anlage A, Umwälz-pumpen im MDR	11 m <sup>3</sup> /h 0,6 kW
Membranpumpe Gamma Gala	ProMinent, Heidelberg	Anlage A, Substratdo-sierung	17 W; max. 7,1 L/h; 7 bar
Membranpumpe Gamma Gala	ProMinent, Heidelberg	Anlage A, Nitratdosierung	17 W; max. 7,1 L/h; 7 bar
Exzenter-Schneckenpumpe „NEMO“	Netzsch, Waldkraiburg	Anlage A, Zulauf MDR	0,37 kW,
Membranpumpe „Vario“	ProMinent, Heidelberg	Anlage A, Messstrecke	0,1 kW; 6,5 bar
Schlauchpumpe PSG 60	Seko, Italien	Anlage A, Anlage B Messstrecke	62 L/h, 0,1 bar
Gerät Type	Hersteller	Eingesetzt in der Anlage	Kennwerte
Kreiselpumpe Inno-Tec 1200-1 A	1 A-Profi-Handels GmbH, Wiesbaden	Anlage A, Anlage B, Nitri-fikationssäulen	1200 W 3500 L/h
Magnetventil MV1315	Riegler, Bad Urach	Anlage A, MDR	8 W; DN 2,5 mm; 14 bar
Niveauregler ALSCHU 485	Greisinger, Regenstauf	Anlage A Anlage B	1 W
Magnetisch-Induktiver-Durchflussmesser (MID) MAG 5000	Siemens, Denmark	Anlage A	-20 bis 50 °C
Luftpumpe Aqua-Forte HI-Flow V-30	Sibo, Holland	Anlage A, B Anlage B	25 W, <40 dB 30 L/min

Die Zulaufpumpe zum MDR, sowie die Schlauchpumpe in der Messstrecke des Permeats wurden von dem Niveauregler ein- bzw. ausgeschaltet, um ein Trockenlauf zu verhindern.

#### 4.1.6 Datenerfassung und Steuerung

Um die Wasserqualität zu erfassen und manuell kontrollieren zu können, wurden die Daten der Sensoren (s. Abb. 1) mit Hilfe der Software MULTIMESS (Eigenentwicklung in Visual Basic 6, Boley & Boley, 1999 – 2014) im Zeitintervall von 5 min erfasst und an einen PC übertragen. Auf dem Bildschirm erschienen die Online-Messungen in Form einer Tabelle und als Diagramm (Abb. 10). Gleichzeitig wurden die Messwerte zeitnah in einer Textdatei abgespeichert.

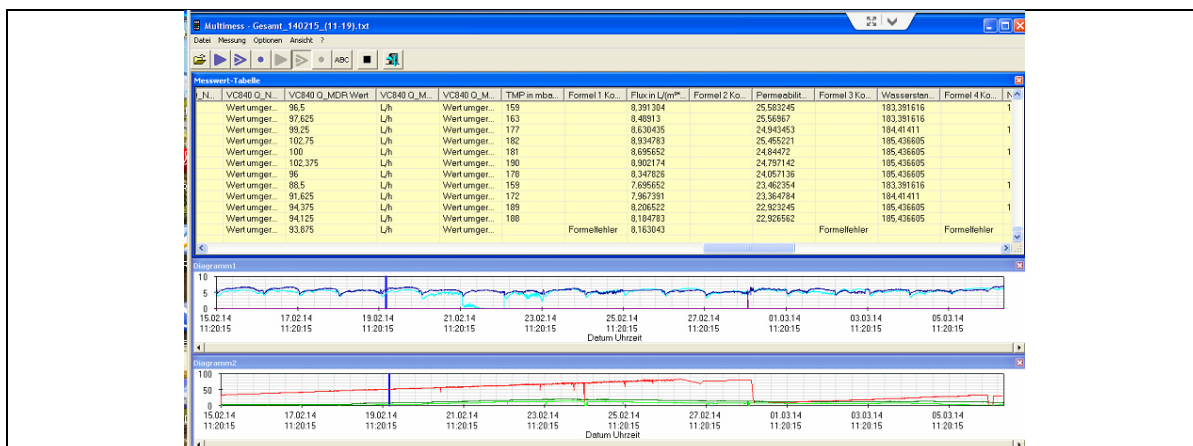
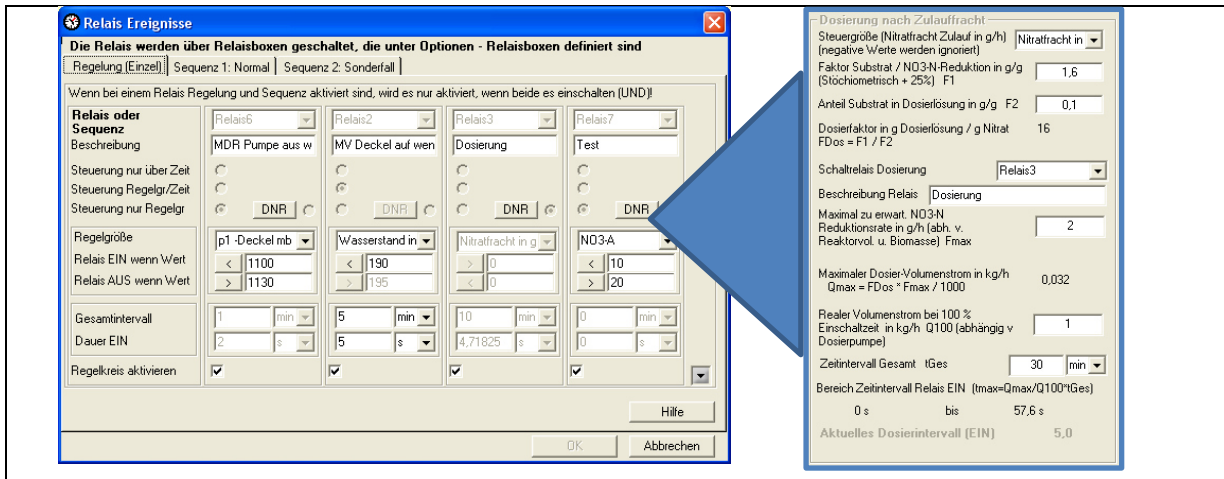


Abb. 10: Screenshot MULTIMESS

Mit der gleichen Software wurden Pumpen und Magnetventile gesteuert und damit die Kontrolle über das System mit definierten Schaltepunkten ermöglicht (s. Abb. 11).

Um Schäden an der Membran zu vermeiden, wurde der Wasserstand im MDR ständig überwacht, um ein teilweises Austrocknen der Membran zu verhindern. Beim Erreichen eines Wasserstandes von 175 cm (später 190 cm) wurde das Magnetventil am Deckel kurz geöffnet, damit der Reaktor entgast und der Wasserstand auf den Sollwert ansteigt.

Weiterhin wurde die Ethanol-Dosierpumpe zu Anfang nach einem festen Rhythmus (Dosierintervall) ein/ausgeschaltet entsprechend einem vorgegebenen Dosiervolumenstrom. Später wurde der Rhythmus auf Basis der gemessenen Nitrat- und Sauerstoffkonzentrationen angepasst.



**Abb. 11: Steuerungsoptionen MULTIMESS. Li: Druckbegrenzung MDR, Wasserstandsregelung MDR, Ethanol dosierung MDR. Re: Einstellungen für flexible Ethanol dosierung n. Nitrat- u. Sauerstofffrachten („Nitratfracht“)**

Um eine Beschädigung des Reaktors zu vermeiden, wurde die Zulaufpumpe zum MDR ausgeschaltet, wenn der Druck im Reaktor 1130 mbar (absolut) überstieg. Der äußere Luftdruck lag in diesem Zeitraum zwischen 950 und 990 mbar (absolut), so dass der Überdruck im Reaktor somit maximal auf 180 mbar steigen konnte.

#### 4.1.7 Labor-Analytik (JI,HH, GK)

##### 4.1.7.1 Küvetten tests

Die Online-Werte wurden durch regelmäßige Analysen im Labor ergänzt und überprüft. Die in der Routineanalytik verwendeten Küvetten-Testsätze (s. Tab. 8) wurden von Hach-Lange (Düsseldorf) bezogen. Die Bestimmung der Analysenwerte erfolgte täglich oder nach Bedarf.

**Tab. 8 Analysenwerte mit Küvetten-Testsätzen (Hersteller: Hach-Lange)**

Parameter	Küvetten tests / Schnelltests	Messbereich	Prinzip (ähnlich)
Nitrat	LCK339	0,23 - 13,5 mg/L $\text{NO}_3^-$ -N	DIN 38405-9 Entwurf; DIN 38405-9
	LCK340	5 - 35 mg/L $\text{NO}_3^-$ -N	
Nitrit	LCK341	0,015 - 0,6 mg/L $\text{NO}_2^-$ -N	DIN EN 26777
	LCK342	0,6 - 6,0 mg/L $\text{NO}_2^-$ -N	
Ammonium	LCK304	0,015 - 2 mg/L $\text{NH}_4^+$ -N	DIN 38406-5
Phosphat	LCK349	0,05 - 1,5 mg/L $\text{PO}_4^{3-}$ -P	DIN EN ISO 6878
	LCK348	0,5 - 5,0 mg/L $\text{PO}_4^{3-}$ -P	
Eisen	LCK521	0,01 - 1,0 mg /L Fe	DIN 38406-1
Chlorid	LCK311	1 - 70 mg/L $\text{Cl}^-$	DIN EN ISO 15682
CSB	LCK514	100 - 2000 mg/L $\text{O}_2$	DIN 38409-41
Wasserhärte = Gesamthärte	LCK327	1 – 20 °dH	Hach Lange, 1997
Sulfat	Cat. 21067-69	0 – 70 mg/L $\text{SO}_4^{2-}$	Hach Lange, 2001

Die Küvettentests wurden entsprechend der beiliegenden Anleitungen durchgeführt und fotometrisch ausgewertet (Photometer: CADAS 30, CADAS 50S und DR 5000, Hach Lange).

#### 4.1.7.2 Säurekapazität ( $K_{S4,3}$ ), SK

In Anlehnung an DIN 38409-7 wurde die Säurekapazität bis pH = 4,3 ( $K_{S4,3}$ ) und 8,2 ( $K_{S8,2}$ ) ermittelt. Die Wasserprobe wurde dazu zunächst mit 1 mL NaOH (Natronlauge 0,1 mol/L Titrisol, Merck) versetzt und anschließend mit einem Titrator (TitroLine alpha Plus, Schott) und 0,1 mol/L HCL (Salzsäure 0,1 mol/L Titrisol, Merck) titriert. Die Titrationsdaten und die verbrauchten Mengen Säure für  $K_{S4,3}$  und  $K_{S8,2}$  werden vom Gerät ermittelt und ausgegeben.

#### 4.1.7.3 Bestimmung von pH, O<sub>2</sub>, Temperatur und elektrische Leitfähigkeit

Die Bestimmung der physikalisch-chemischen Parameter pH, O<sub>2</sub>, Temperatur und elektrische Leitfähigkeit erfolgte mit dem tragbaren Mehrparameter-Gerät Multi 350i (WTW, Weilheim) und dazu passenden Sauerstoffelektroden (CellOx® 325), pH-Elektroden (SenTix® 41) und Leitfähigkeitssonden (TetraCon® 325), jeweils mit Temperatursensoren.

#### 4.1.8 Fischbesatz und Fischfutter

Becken A und B wurden mit je ca. 9,5 kg zwei-sömmerigen („K2“) Spiegel- und Schuppenkarpfen aus dem Teichgut Hammerschmiede, Abtsgmünd-Hammerschmiede besetzt (s. Abb. 12).

Kurz vor dem Start des MDR wurden die Fische gewogen und so verteilt, dass beide Becken nahezu die gleiche Fischmasse enthielten (je ca. 26 kg). Beim Wiegen wurden anfangs jeweils 3-4 Fische gleichzeitig gewogen, später einzeln.



**Abb. 12: Ankunft der Fische im ISWA (n. Transport )**

Um den Fischen eine möglichst gute Wasserqualität zu bieten und damit den Tierschutz zu gewährleisten, wurde bei allen Versuchen darauf geachtet, dass die empfohlenen Wasserparameter eingehalten werden (s. Tab. 9), was allerdings in Bezug auf O<sub>2</sub> und Nitrat nicht immer gelang.

**Tab. 9: Optimale Wasserparameter für Karpfen (veränd. n. Schreckenbach, 2002)**

Parameter	pH-Wert	NH <sub>3</sub> (NH <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)	HNO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> (NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> -N)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> -N)	CO <sub>2</sub>	O <sub>2</sub>
Einheit		mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L	mg/L
Optimaler Bereich	7,0-8,3	< 0,02 (< 0,016)	< 0,0004	< 1,0 (< 0,3)	< 200 (< 45)	7-18	5-30 (?)

Als Futter diente Milkivit F-2P B40 (4 mm) und F-3P B40 (6 mm) der Firma Trouvit Nutrition Deutschland GmbH, ein Alleinfuttermittel für Forellen, das auch für Karpfen geeignet ist. (Die beiden Typen unterscheiden sich nur durch die Größe der Pellets (Durchmesser in Klammern).

Der Packung kann man u.a. folgende Angaben entnehmen:

Inhaltstoffe: 41,0 % Rohprotein; 12,0 % Rohfett; 3,0 % Rohfaser; 6,0 % Rohasche; 0,2 % Natrium; 0,8 % Calcium; 0,7 % Phosphor.

Für die Berechnung des täglichen Futterbedarfs wurde der empfohlene Wert von 1...1,5 % der Fischmasse zu Grunde gelegt. Bei Start des MDR entsprach dies einer Futtergabe von 390 g Futter/d in beiden Anlagen.

#### 4.1.9 Frischwasser

Das Frischwasser (Trinkwasser, Leitungswasser der Bodenseewasserversorgung Stuttgart) wird über ein Schwimmerventil automatisch nachgefüllt, wenn der Wasserstand im Pumpenbecken zu weit absinkt. Eine handelsübliche Wasseruhr dient dabei zur Dokumentation der verbrauchten Frischwasser-Volumina.

#### 4.1.10 Wartung

Um einen zuverlässigen und störungsfreien Betrieb der Anlage zu gewährleisten, wurden die O<sub>2</sub>- und pH-Elektroden täglich gereinigt und alle 14 d kalibriert. Nitratsonden und Trübungsmessgeräte wurden ca. alle 14 d gereinigt. Die Schläuche von Messstrecke, Zu- und Ablauf MDR wurden bei Bedarf gereinigt, um Biofilme zu entfernen. Im Lamellenabscheider wurde täglich die Biomasse von der Oberfläche abgeschöpft und das Sediment durch kurzzeitiges Öffnen der beiden Hähne abgelassen.

In Anlage B (ohne MDR) musste alle 2-3 Wochen ein Wasserwechsel durchgeführt werden, um die hohen Nitratkonzentrationen zu verdünnen. Dazu wurde teilweise vorgewärmtes Leitungswasser verwendet. Eine komplette Reinigung der Anlage (Fischbecken, Lamellenabscheider, Rohre) wurde insgesamt nur dreimal im Versuchszeitraum durchgeführt

Eine Membranreinigung mit NaOCl und/oder Zitronensäure war vorgesehen, falls die Permeabilität der Membranen zu weit absinken würde. Dies war jedoch während der gesamten Betriebsdauer nicht erforderlich.

#### 4.1.11 Berechnungen

##### 4.1.11.1 Nitrifikationsraten

Bei der Berechnung der Nitrifikationsraten wird eine vereinfachte Reaktionsfolge  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$  angenommen.

Bei der Berechnung der Nitritationsrate  $r_{\text{NVNi}}$  der Reaktion  $\text{NH}_4^+ \rightarrow \text{NO}_2^-$  mit den Laboranalytik-Werten wurden nur die Ammonium-Konzentrationen zur Berechnung eingesetzt, s. Gl. (3).

$$r_{\text{NVNi}} = \frac{\Delta\beta(\text{NH}_4^+-\text{N}) \cdot V_{\text{ges}}}{\Delta t \cdot V(\text{NF})} \quad \text{in mg}/(\text{L}\cdot\text{h}) \quad (3)$$

Bei der Berechnung der Nitratationsrate  $r_{\text{NVNa}}$  für den Reaktionsschritt  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO}_3^-$  mit den Laboranalytik-Werten (AN) wurden die Nitritkonzentrationen mit heran gezogen (Gl. (4)).

$$r_{\text{NVNa}} = \frac{(\Delta\beta(\text{NH}_4^+-\text{N}) - \Delta\beta(\text{NO}_2^--\text{N})) \cdot V_{\text{ges}}}{\Delta t \cdot V(\text{NF})} \quad \text{in mg}/(\text{L}\cdot\text{h}) \quad (4)$$

Mit:  $\Delta\beta(\text{NH}_4^+-\text{N})$  =  $\text{NH}_4^+-\text{N}$  Konzentrationsänderung in mg/L über die Zeit  
 $\Delta\beta(\text{NO}_2^--\text{N})$  =  $\text{NO}_2^--\text{N}$  Konzentrationsänderung in mg/L über die Zeit  
 $V(\text{NF})$  = Festbettvolumen Nitrifikationssäulen in L  
 $V(\text{Ges})$  = Wasservolumen der Anlage in L

##### 4.1.11.2 Ammonium und Ammoniak Konzentrationen

Bei der Analyse von Ammonium mit Küvettentests (s. Kap. 4.1.7.1) wird Ammoniak zusammen mit Ammonium als Gesamt-Ammonium erfasst (Gl. (5)).

$$\sum \beta (\text{NH}_4^+\text{-N}) \text{ Ges} = \beta (\text{NH}_4^+\text{-N}) + \beta (\text{NH}_3\text{-N}) \quad \text{in mg/L} \quad (5)$$

Die Ammoniak Konzentration kann nach folgender Formel aus den Dissoziationskonstanten berechnet werden (Anthonisen et al, 1976), Gl. (6), (7)).

$$\beta(\text{NH}_3) = \frac{17}{14} \frac{\Delta\beta(\text{NH}_4^+\text{-N})\text{Ges} \cdot 10^{\text{pH}}}{\frac{k_B}{k_w} + 10^{\text{pH}}} \quad \text{in mg/L} \quad (6)$$

$$\frac{k_B}{k_w} = e^{\frac{6344}{273 + T}} \quad (7)$$

mit  $\beta(\text{NH}_3)$ : Ammoniakkonzentration in mg/L  
 $\beta(\text{NH}_4^+\text{-N}) \text{ Ges}$ :  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  Konzentration (Summe  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  und  $\text{NH}_3\text{-N}$ ) in mg/L  
 $k_B$ : Basekonstante des Ammoniaks ( $k_B = 1,79606 \cdot 10^{-5}$ ) (CRC Handbook, 2014)  
 $k_w$ : Ionenprodukt des Wassers ( $k_w = 1,01 \cdot 10^{-14}$ ) (CRC Handbook, 2014)  
 $T$ : Temperatur in °C

#### 4.1.11.3 Ethanolbedarf für die Denitrifikation

Nach Gl. (2) kann der stöchiometrische Ethanolbedarf zu 1,37 g Ethanol / g  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  berechnet werden. Unter Berücksichtigung der Biomassenproduktion erhöht sich der Ethanolbedarf auf bis zu 2 g Ethanol / g  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  (Rheinheimer et al., 1988, Hamon & Fustec, 1991, Roennefahrt, 1992). Die tatsächlich dosierten Ethanol-Mengen wurden niedriger eingestellt und sollten nach Bedarf gesteigert werden, um eine Überdosierung mit der Gefahr von anaeroben Bedingungen und einer Belastung des Wassers in den Fischbecken zu vermeiden. Ein zusätzlicher Ethanolbedarf von 0,48 g Ethanol / g  $\text{O}_2$  (stöchiometrisch) entsteht durch die Zehrung des mit dem Wasser eingetragenen Sauerstoffs. Nach Roennefahrt, 1992 ist der spezifische Ethanolbedarf mit Biomassebildung für die Sauerstoffzehrung mit ca. 0,58 g Ethanol / g  $\text{O}_2$  anzusetzen. Dieser zusätzliche Bedarf wurde ebenfalls berücksichtigt und dem Bedarf angepasst.

Die Ethanol-Dosierung wurde nach der Formel (8) gesteuert:

$$\dot{m}_{(\text{EtOH})} = \frac{K1}{K2} * ((\beta (\text{NO}_3^-\text{-N})_{\text{zu}} + F * \beta (\text{O}_2)_{\text{zu}}) * Q(\text{MDR})) / (1000 \text{ mg/g}) \quad \text{in g/h} \quad (8)$$

mit:  $\dot{m}_{(\text{EtOH})}$  = Ethanol-Dosierrate in g/h  
 $\beta (\text{NO}_3^-\text{-N})_{\text{zu}}$  = Konz.  $\text{NO}_3^-\text{-N}$  im Zulauf in mg/L  
 $Q(\text{MDR})$  = Volumenstrom MDR in L/h  
 $K1$  = Spezifischer Ethanolbedarf = 1,5 ... 1,7 mg Ethanol / mg  $\text{NO}_3^-\text{-N}$   
 $K2$  = Anteil Rein-Ethanol in Lösung = 0,1  
 $\beta (\text{O}_2)_{\text{zu}}$  = Sauerstoffkonz. im Zulauf zum MDR in mg/L  $\text{O}_2$   
 $F$  = Faktor für Berücksichtigung von  $\text{O}_2$  = 0...0,46 (theor. 0,35 g/g)

Eine Begrenzung der dosierten Menge durch die maximal zu erwartende Nitrat-Reduktionsrate war eine weitere Sicherungsmaßnahme.

Der „theoretische“ Ethanolbedarf wurde aufgrund der Stöchiometrie der Denitrifikationsgleichung (ohne Berücksichtigung der Biomasse Produktion und ohne zusätzlichen Bedarf durch Sauerstoff) nach der Formel (9) berechnet:

$$\dot{m}_{(\text{EtOH})} = 1,37 * (\beta (\text{NO}_3^-\text{-N}) * Q(\text{MDR})) / 1000 \text{ mg/g} \quad \text{in g/h} \quad (9)$$

#### 4.1.11.4 Kumulierter Ethanolbedarf und Nitratstickstoff

Die folgende Formel erlaubt es den gesamten reduzierten Stickstoff ( $m(\text{NO}_3^- \text{-N})$  kumuliert) während der Betriebszeit (264. – 394. Tag) zu ermitteln (s. Gl. (10)):

$$m(\text{NO}_3^- \text{-N})_{\text{kumul.}} = \sum_{264 \text{ d}}^{394 \text{ d}} (\Delta\beta(\text{NO}_3^- \text{-N}) \cdot Q(\text{MDR}) / (1000 \cdot \Delta t)) \quad \text{in g} \quad (10)$$

$\Delta\beta(\text{NO}_3^- \text{-N})$  =  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  Konzentrationsdifferenz zwischen Reaktor-Zu- u. -Ablauf in mg/L

$Q(\text{MDR})$  = Volumenstrom MDR in L/h

$\Delta t$  = betrachteter Zeitabschnitt in h

Die verbrauchte Menge an reinem Ethanol (kumuliert) zwischen den Tagen 264 und 394 ergibt sich zu (s. Gl. (11)):

$$m(\text{EtOH})_{\text{kumul.}} = \sum_{264 \text{ d}}^{384 \text{ d}} \dot{m}_{(\text{EtOH}, t)} \cdot \Delta t \quad \text{in g} \quad (11)$$

Mit:  $\dot{m}_{(\text{EtOH}, t)}$  = täglicher Verbrauch an reinem Ethanol zum Zeitpunkt  $t$  in g/d

$\Delta t$  = betrachteter Zeitabschnitt in d

#### 4.1.11.5 Denitrifikationsraten

Bei der Berechnung der Denitrifikationsraten wird die Reaktionsfolge

$\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{NO} \rightarrow \text{N}_2\text{O} \rightarrow \text{N}_2$  vereinfacht zu  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$  angenommen.

Bei der Berechnung der **Denitrationsrate**  $r_{\text{DVNi}}$  ( $A_n$ ) für den Reaktionsschritt  $\text{NO}_2^- \rightarrow \text{N}_2$  mit den Laboranalytik-Werten ( $A_n$ ) wurden die gebildeten Nitritkonzentrationen im MDR zur Berechnung eingesetzt s. Gl. (12).

$$r_{\text{DVNO}_2} = \frac{\Delta\beta(\text{NO}_3^- \text{-N}) - \Delta\beta(\text{NO}_2^- \text{-N})}{V(\text{MDR})} \cdot Q(\text{MDR}) \quad \text{in mg/(L}\cdot\text{h)} \quad (12)$$

Mit:  $\Delta\beta(\text{NO}_3^- \text{-N})$  =  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  Differenz zw. MDR Zu- und Ablauf in mg/L

$\Delta\beta(\text{NO}_2^- \text{-N})$  =  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  Differenz zw. MDR Zu- und Ablauf in mg/L

$V(\text{MDR})$  = Wasservolumen MDR in L

$Q(\text{MDR})$  = Volumenstrom MDR in L/h

Die Denitrationsrate  $r_{\text{DVNO}_3}$  für die Reaktionsfolge  $\text{NO}_3^- \rightarrow \text{NO}_2^-$  berechnet sich entsprechend nach Gl. (13).

$$r_{\text{DVNO}_3} = \frac{\Delta\beta(\text{NO}_3^- \text{-N})}{V(\text{MDR})} \cdot Q(\text{MDR}) \quad \text{in mg/(L}\cdot\text{h)} \quad (13)$$

Mit:  $\Delta\beta(\text{NO}_3^- \text{-N})$  =  $\text{NO}_3^- \text{-N}$  Konz.-Differenz zwischen MDR Zu- und Ablauf in mg/L, On-Line Messwerte (Mittelwerte)

Ist die Denitrationsrate höher als die Denitrifikationsrate, läuft die Denitrifikation nicht vollständig ab und es entsteht Nitrit.



#### 4.1.11.6 Stickstoffbilanz Futter

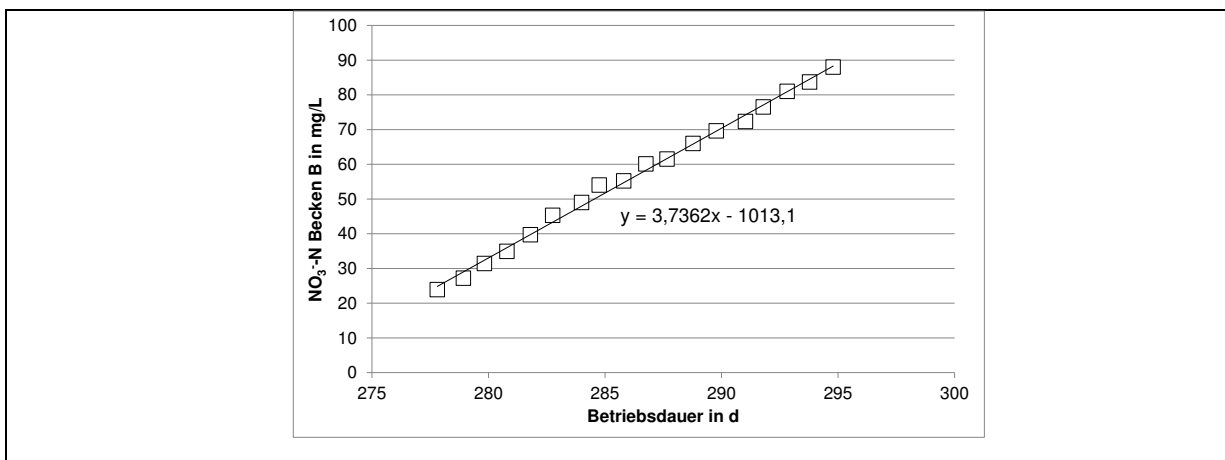
Die Steigung der Geraden aus dem Diagramm der  $\text{NO}_3^-$ -N Konzentrationen über der Zeit im Becken B (s. Abb. 13, m in  $\text{mg}/(\text{L d})$ ) dient zur Ermittlung der N-Exkretion der Fische  $F(\text{NFi})$ , s. Gl. (14).

$$F(\text{NFi}) = m \cdot V(\text{Ges}) \cdot B \cdot 0,001 \quad \text{in g/d} \quad (14)$$

Mit  $V(\text{Ges}) \cdot B =$  Wasservolumen der Anlage B in L

Unter Annahme einer vergleichbaren N-Exkretion in Anlage A (bei gleicher Fischmasse und Futtergabe), lässt sich daraus die maximal mögliche Denitrationsrate  $r_{\text{DVNO}_3}$  (max.) berechnen (Gl. (15):

$$r_{\text{DVNO}_3}(\text{max}) = \frac{F(\text{NFi}) \cdot 1000}{24 \cdot V(\text{MDR})} \quad \text{in mg}/(\text{L} \cdot \text{h}) \quad (15)$$



**Abb. 13: Beispiel für Ermittlung der Steigung m der  $\text{NO}_3^-$ -N Konz. über Zeit in Becken B. Hier  $m = 3,7362 \text{ mg}/(\text{L d}) \text{ NO}_3^-$ -N**

Mit dem Proteinanteil des Futters von 0,41 g/g und einem N-Anteil im Protein von 0,16 g/g ergibt sich der Faktor  $K(\text{N}) = 0,41 \cdot 0,16 = 0,0656 \text{ g N} / \text{g Futter}$ . Daraus kann der Anteil des Stickstoffs aus dem Futter bestimmt werden, der als  $\text{NH}_4^+$ -N ausgeschieden und per Nitrifikation zu  $\text{NO}_3^-$ -N oxidiert wird (Verhältnis N (Exkretion) zu N (Futter) =  $A(\text{N})$ , s. Gl. (16)).

$$A(\text{N}) = \frac{F(\text{NFi})}{F(\text{Fu}) \cdot K(\text{N})} \quad \text{in g/g} \quad (16)$$

$F(\text{Fu}) =$  tägliche Futterration in g/d

#### 4.1.11.7 Wasserstand und Transmembrandruck

Die Druck-Messwerte der Drucksensoren  $p_1$ ,  $p_2$  und  $p_3$  (s. Abb. 8), werden von der Software MULTIMESS für die Berechnung des Wasserstandes und des TMP (Transmembrandruck) verwendet.

##### Wasserstand im Reaktor:

Der auf den unteren Drucksensor wirkende Druck (s. Gl. (17):

$$p_1 = p_3 + \rho \cdot g \cdot (h_3 - h_1) \quad \text{in Pa} \quad (17)$$

Durch Umformen der Formel ergibt sich die Wasserstandhöhe  $h_3$  (s. Gl. (18))

$$h_3 = \frac{(p_1 - p_3)}{\rho \cdot g} + h_1 \quad \text{in m} \quad (18)$$

$\rho$  = Dichte des Wassers (998,2 kg/ m<sup>3</sup> bei 20 °C)  
 $g$  = Erdbeschleunigung (9,81 m/s<sup>2</sup>)  
 $h_1, h_3$  = Abstand Reaktorboden - Sensor  $p_1$  bzw.  $p_3$  in m  
 $p_1, p_3$  = gemessener Druck (s. Abb. 8) in Pa = kg/(m·s<sup>2</sup>)

### Transmembrandruck (TMP)

Der TMP ist die treibende Kraft des Filtrationsvorgangs und wird hier durch Überdruck auf der Seite des Retentates erzeugt. Er berechnet sich aus der Differenz zwischen dem mittleren Druck an der äußeren und inneren Seite der Membran (s. Gl. (19))

$$\text{TMP} = [p_1 - p_2 + \rho \cdot g \cdot (h_1 - h_2)] \cdot \frac{1 \text{ mbar}}{100 \text{ Pa}} \text{ in mbar} \quad (19)$$

Mit:  $h_1, h_2$  = Abstand Reaktorboden - Sensor  $p_1$  bzw.  $p_2$  in m  
 $p_1, p_2$  = gemessener Druck (s. Abb. 8) in Pa = kg/(m·s<sup>2</sup>)

#### 4.1.11.8 Permeatfluss und Membranpermeabilität

Eine maßgebliche Größe zur Beschreibung der hydraulischen Leistungsfähigkeit der Membran ist der Permeatfluss  $J_p$ , das Verhältnis von Permeatvolumenstrom  $Q_p$  (L/h) zur Membranfläche  $A_m$  (m<sup>2</sup>) (s. Gl. (20)):

$$J_p = \frac{Q_p}{A_m} \text{ in } \frac{\text{L}}{\text{m}^2 \cdot \text{h}} \quad (20)$$

Die Permeabilität ( $L_p$ ) kennzeichnet die Durchlässigkeit der Membrane und gibt einen Hinweis darauf, ob die Durchlässigkeit der Membran durch Biofilme vermindert wird (s. Gl. (21)).

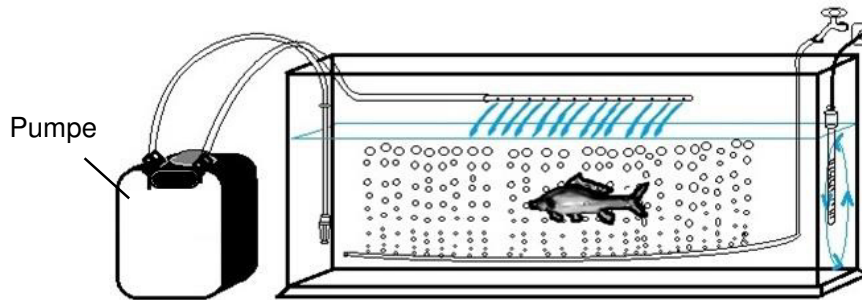
$$L_p = \frac{J_p}{\text{TMP}} \text{ in } \frac{\text{L}}{\text{m}^2 \cdot \text{h} \cdot \text{bar}} \quad (21)$$

## 4.2 Stickstoffströme in Aquarien

### 4.2.1 Versuchsreihe 2: Ammoniumexkretion der Fische

Für die Versuche zur Ammoniumexkretion wurde jeweils ein einzelner Karpfen in ein gereinigtes Aquarium ohne Bodengrund gesetzt (s. Abb. 14). Der Biofilter wurde vorher gereinigt, das Filtermaterial entfernt, und damit "funktionslos" nur als Pumpe (gemeinsam mit dem „Aircurtain“, einer Belüftereinheit) zur Durchmischung des Wassers eingesetzt. Um das Aquarium wurde eine schwarze Folie gelegt, da die Karpfen in der Natur eher an schwaches Licht gewohnt sind.

Damit die NH<sub>3</sub>-Konzentration den Grenzwert von 0,02 mg/L nicht überschreitet, wurde ein NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N Ges Grenzwert von ca. 1 mg/L (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> + NH<sub>3</sub>)-N bei pH<7,5 mit HCl eingestellt. Jeder Fisch wurde vor dem Einsetzen gewogen und dann, zum Feststellen des Ammoniumgrundumsatzes, einen Tag ohne Fütterung gehalten und am Beginn des zweiten Tages gefüttert. Während eines Versuchs fanden keine Wasserwechsel statt. Das leere Aquarium wurde vor einem Versuch mit frischem Leitungswasser befüllt und die Temperatur eingestellt. Während der Versuche wurden pH, O<sub>2</sub>, Temperatur, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N Ges bestimmt.



**Abb. 14: Aufbau Versuchsreihe „Ammoniumexkretion“ mit Einzel-Karpfen, Filter (Pumpe), Heizstab, "Aircurtain", Wasservol. im Becken 80 L, Biofilter (leer) 7,5 L**

(Versuchsreihe 1 und 3: Nitrifikation des Biofilters und 3: Nitrifikation in der Aquariumsumgebung können hier aus Platzgründen nicht präsentiert werden)

### 4.3 Beurteilung von Fischen und Wasser (TiHo)

#### 4.3.1 Untersuchungen zur Stressbelastung der Karpfen in den unterschiedlichen Haltungssystemen

Um den Gesundheitszustand und eine mögliche Stressbelastung der Karpfen in dem Haltungssystem mit angeschlossenem Denitrifikationsreaktor (MDR) und im Kontrollhaltungssystem ohne Reaktor beurteilen zu können, wurden Proben der Fische und des Wassers untersucht. Da der Cortisolgehalt im Blut einer der besten Indikatoren zur Abschätzung einer Stressbelastung ist, wurde dieser als Parameter herangezogen. Der Gehalt an Cortisol kann aufgrund von akuten als auch chronischen Stresseinwirkungen erhöht sein. Klassischerweise wird er im Blut bestimmt. Bei Fischen kann alternativ oder zusätzlich auch der Cortisolwert im Haltungswasser bestimmt werden. In diesem Fall wird die Menge an Cortisol gemessen, die von den Fischen über die Kiemen abgegeben wurde. Im Rahmen dieses Projektes wurde sowohl der Gehalt an Cortisol im Blut der Karpfen als auch im Haltungswasser bestimmt.

#### Blutentnahme

Zu vier Zeitpunkten (8 d vor Inbetriebnahme des Reaktors, sowie 24 d, 52 d und 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors) wurden Proben entnommen. Da zum ersten Probenahmezeitpunkt der Reaktor noch nicht an Anlage A angeschlossen war; stellen die Ergebnisse dieser Probenahme die Ausgangsdatenlage vor Inbetriebnahme des Denitrifikationsreaktors dar und dienen als Kontrolle. Zu jedem Probenahmezeitpunkt wurden aus jedem Haltungssystem (Anlage A und B) 6 Karpfen entnommen und mittels eines Tricains (MS222, Pharmaq, UK, Dosis: 1,5 g / 10 L Wasser) in einem separaten Becken, das 30 L Wasser enthielt, einzeln nacheinander anästhesiert. Sobald die Fische das Narkosetoleranzstadium erreicht hatten, wurden je Fisch ca. 4 mL Blut aus der Kaudalvene mittels eines Blutentnahmeröhrchens mit Heparin und einer aufgesetzten Kanüle entnommen. Das Blut wurde zunächst für mindestens 30 min gekühlt. Im Anschluss wurde der Hämatokritwert bestimmt, indem eine kleine Menge Blut mittels einer Hämatokritkapillare aufgezogen und für 5 min bei  $1500 \cdot 9,81 \text{ m/s}^2$  zentrifugiert wurde. Der Wert wurde mittels einer Schablone abgelesen. Das restliche Blut wurde in den Entnahmeröhrchen für 5 min bei  $1500 \cdot 9,81 \text{ m/s}^2$  zentrifugiert, das Plasma abpipettiert und bis zur weiteren Bearbeitung bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gelagert. Im Blutplasma wurden im Anschluss im Labor der Cortisolgehalt sowie der Gehalt an Gesamteiweiß, Glukose, Calcium, Magnesium, Natrium, Kalium und Laktat bestimmt.

#### Blutuntersuchung

Die Blutuntersuchungen wurden im Labor der Rinderklinik der TiHO durchgeführt. Die Messung der Elektrolyte wurde dabei im Rahmen der Routinediagnostik untersucht, während die Bestimmung des Cortisolgehaltes mittels eines nicht routinemäßig eingesetzten ELISA Testsystems

durchgeführt wurde. Bei einem ELISA (Enzyme linked immunosorbent assay) handelt es sich um ein antikörperbasiertes Nachweisverfahren, welches auf einer enzymatischen Farbreaktion basiert. Die Intensität der Färbung wird photometrisch gemessen.

### **Entnahme von Wasserproben**

Zu den genannten Zeitpunkten wurden Wasserproben aus beiden Haltungssystemen (Anlage A und B) entnommen. Es wurden 500 mL Wasser jeder Anlage jeweils aus dem Fischhaltungsbecken, aus dem Filterbecken und aus dem Lamellenabscheider entnommen. Das Wasser wurde sofort gekühlt und im Labor der Abteilung Fischkrankheiten der TiHO bis zur weiteren Bearbeitung gefroren bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### **Bearbeitung der Wasserproben und Bestimmung des Cortisolgehaltes im Wasser**

Das Wasser wurde aufgetaut und über einen Papierfilter filtriert. Das in einer definierten Wassermenge von 100 mL enthaltene Cortisol wurde über eine Festphasenextraktionseinheit (Oasis HLB Extraction Cartridge) angereichert. Dazu wurden die Cartridges zunächst mit 5 mL Methanol und mit 5 mL destilliertem Wasser konditioniert und anschließend mit der Wasserprobe beschickt. Nachdem die Wasserproben durch die Cartridges gelaufen waren, wurden diese mit 5 mL destilliertem Wasser gewaschen und gebundene Steroide mit 5 mL Methanol eluiert. Das Methanol wurde im Anschluss unter  $\text{N}_2$  Bedampfung eingedampft und die Steroide wurden in einem Puffer aufgenommen. Die Messung der Cortisolkonzentration erfolgte mittels eines kommerziell erhältlichen ELISA Testsystems.

### **4.3.2 Analyse der Mikroflora im Haltungswasser und auf der Haut und auf den Kiemen der Fische**

Fische sind in ihrer Umwelt ständig der Einwirkung von Bakterien ausgesetzt. Diese Bakterien kommen frei im Wasser vor, besiedeln alle mit Wasser in Kontakt stehenden Gegenstände und Oberflächen in Form von Biofilmen und siedeln ebenfalls auf der Haut und den Kiemen der Fische. Dabei kommen auf der Kiemenschleimhaut der Fische bis zu  $10^6$  koloniebildende Einheiten (KBE) je g Kiemenmaterial vor, auf der Haut  $10^2$ - $10^4$  KBE je  $\text{cm}^2$  und im Darm etwa  $10^5$ - $10^8$  KBE je g Darmgewicht. In der Regel spiegelt sich die Bakterienflora des Wassers auf der Schleimhaut der Fische wider. Im Rahmen dieses Projektes wurde die Gesamtkeimzahl im Wasser der Haltungsbekken, der Filterbecken, des Lamellenabscheiders und im Reaktor zu vier verschiedenen Zeitpunkten (8 d vor Inbetriebnahme des Reaktors (MDR), sowie 24 d, 52 d und 126 d nach seiner Inbetriebnahme) bestimmt. Mittels klassischer kultureller und molekularbiologischer Methoden wurde differenziert, welche Bakterienspezies als Bestandteil der Mikroflora vorkommen und wie sich Zusammensetzung und Diversität der Mikroflora im Zuge des Einsatzes des Denitrifikationsreaktors (MDR) änderten. Zudem wurden Proben der Haut und der Kiemen der Fische auf Bakteriengehalt und -Zusammensetzung untersucht, um den Einfluss des MDR auf die Mikroflora des Gesamtsystems und insbesondere auch auf die Fischgesundheit beurteilen zu können.

#### **4.3.2.1 Klassische Untersuchungen von Kulturen**

##### **Bestimmung der Gesamtkeimzahl**

Zur Gesamtkeimzahlbestimmung in den Wasserproben wurde eine Verdünnungsreihe in Dezimalschritten angelegt. Als Verdünnungsmedium wurde sterile physiologische Kochsalzlösung verwendet. Die Verdünnungsreihen wurden nach dem Spatelplattenverfahren weiterbearbeitet, wobei für jede Verdünnungsstufe zwei Blutagarplatten verwendet wurden. Aus jeder Verdünnungsstufe inklusive der unverdünnten Probe wurden jeweils 0,1 mL entnommen, auf die Blutagarplatten pipettiert und mittels eines sterilen Drigalski Spatels ausgestrichen. Danach wurden die Platten für 48 h unter aeroben Bedingungen bei  $25^{\circ}\text{C}$  bebrütet. Die Anzahl der Kolonien pro Platte wurde nach der Bebrütung gezählt. Die Berechnung der Keimzahl erfolgte nach folgender Gleichung (22):

$$m = \frac{10^x}{v} \cdot x \frac{\sum c_x + \sum c_{x+1}}{n_x + 0,1n_{x+1}} \quad (22)$$

- m : gewogener Mittelwert der Lebendkeimzahl in 1 mL der unverdünnten Probe, angegeben in KBE/mL  
 $10^x$  : Verdünnungsfaktor für die niedrigste ausgewertete Verdünnungsstufe  
 v : je Platte eingesetztes Volumen der verdünnten Probe in mL  
 $\sum c_x$  : Gesamtzahl der Kolonien auf allen ( $n_x$ ) Platten der niedrigsten ausgewerteten Verdünnungsstufe  
 $\sum c_{x+1}$  : Gesamtzahl der Kolonien auf allen ( $n_{x+1}$ ) Platten der nächsthöheren ausgewerteten Verdünnungsstufe

### **Zusammensetzung der Mikroflora im Wasser, Biofilmen, auf Haut u. Kiemen der Fische**

Zur Bestimmung der Zusammensetzung der Bakterien im Wasser wurden jeweils 100  $\mu$ L jeder Wasserprobe (Beckenwasser, Wasser aus Filterbecken, Wasser aus Lamellenabscheider, Wasser aus dem Reaktor) auf jeweils zwei Blutagarplatten ausgestrichen. An der Anlage selbst wurden Tupferproben (mittels eines Abstrichbestecks mit Nährmedium) der unter Wasser befindlichen Oberflächen aus den genannten Bereichen entnommen, gekühlt und im Labor auf Blutagarplatten ausgestrichen. Von den für die Blutentnahmen narkotisierten Fischen wurden ebenfalls Tupferproben der Haut und der Kiemen entnommen, gekühlt und ebenfalls auf Blutagarplatten ausgestrichen. Zur Überprüfung der allgemeinen Fischgesundheit wurden am letzten Probennahmetag (126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors) je Anlage drei Fische euthanasiert. Leber, Milz und Niere der Fische wurden entnommen und auf Blutagarplatten ausgestrichen.

Alle Blutagarplatten wurden für 24 h bis 48 h bei 15 °C und 25 °C bebrütet. Anschließend wurden die gewachsenen Kolonien anhand der Menge identischer Kolonien semiquantitativ bewertet (ggr., mgr., hgr.), die Kolonien wurden makroskopisch beschrieben und Subkulturen auf frischen Blutagarplatten wurden angelegt. Die Subkulturen wurden für 24 h bei 25 °C bebrütet. Danach wurde Koloniematerial jeweils getrennt für jede morphologisch unterschiedliche Kolonie in Veal Infusion Medium überführt und bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung eingefroren.

Von den eingefrorenen Bakterienisolaten wurde mittels eines kommerziell erhältlichen Testkits (QIAamp DNA Mini-Kit, Qiagen, Hilden) DNA extrahiert. Die Quantität und die Reinheit der extrahierten DNA wurden photometrisch bestimmt. Mittels einer Endpunkt PCR wurde ein Fragment des bakteriellen 16S rRNA Gens amplifiziert. Das 16S Gen ist das meistgenutzte Gen für die bakterielle Klassifizierung. Für die Amplifizierung wurden Primer verwendet, die von Wilson et al., 1990 beschrieben wurden. Für die PCR wurden 0,2 U einer KAPA 2G Polymerase (PeqLab, Germany), 1x KAPA B Puffer, 200 nmol/L von jedem Primer, 200  $\mu$ M jedes Nucleotids (dNTP) und 5,0  $\mu$ L der Proben-DNA zusammen pipettiert und mittels nukleasefreiem Wasser auf ein Endvolumen von 25  $\mu$ L aufgefüllt. Das PCR Protokoll enthielt einen Denaturationsschritt bei 95 °C für 5 min, 5 Zyklen bei 95 °C für 30 s, 63 °C...58 °C für 30 s, 72 °C für 60 s (in jedem Zyklus wurde die Annealing Temperatur um 1 °C herabgesetzt) gefolgt von 35 Zyklen bei 95 °C für 30 s, 57 °C für 30 s, 72 °C für 60 s und einem letzten Extensionsschritt bei 72 °C für 7 min. Die PCR wurde in einem SensoQuest Thermocycler (SensoQuest, Germany) durchgeführt. Die erhaltenen PCR-Produkte wurden zur Sequenzierung an ein Labor (LGC Genomics) geschickt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mittels einer Datenbank, die auf 16S Gen Sequenzen von Bakterien spezialisiert ist (EzBiocloud).

Die Auswertung der Bakterienzusammensetzung erfolgte anhand des Gehalts der nachgewiesenen Spezies (ggr., mgr., hgr.). Dabei wurden für jede Anlage Mittelwerte aus den Daten der drei entnommenen Wasserproben bzw. aus den Daten der Fische gebildet. Der Gesamtgehalt der Bakterien je Probe wurde als 100 % angegeben; der prozentuale Gehalt der einzelnen Spezies konnte anhand dessen berechnet werden.

### 4.3.2.2 Molekularbiologische Untersuchungen

#### Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

Mittels der denaturierenden Gradienten Gel Elektrophorese ist es möglich, Änderungen von Bakterienspezies in einer Population zwischen verschiedenen Untersuchungsgruppen und verschiedenen Zeitpunkten zu untersuchen. Die Untersuchungen erfolgen über einen Nachweis der Bakterien anhand des 16S Gens. Dabei werden sowohl kultivierbare als auch nicht kultivierbare Bakterien detektiert. Abhängig von ihrer Sequenz werden die Spezies in einem Gel anschließend aufgetrennt und es entsteht ein für die einzelne Probe spezifisches Bandenmuster. Eine Identifizierung der einzelnen Spezies ist auf diesem Weg nicht möglich, jedoch können Aussagen über die Ähnlichkeiten und Unterschiede verschiedener Proben getroffen werden.

Die Bakterien aus den Wasserproben mussten zunächst angereichert werden. Dafür wurden die Wasserproben in einem ersten Schritt über einen Membranfilter (Teflon, 5 µm) filtriert, um größere Partikel zu entfernen. In einem zweiten Schritt wurden die Wasserproben über einen bakteriendichten Filter (0,45 µm) filtriert, wo sie anschließend als Rückstand vorlagen. Die bakterielle DNA wurde von den Filtern und aus den Proben der Fische mittels Standardmethoden (QIAamp DNA Mini-Kit, Qiagen, Hilden) extrahiert.

Die extrahierte DNA wurde in einer PCR eingesetzt, in der das 16S rRNA Gen amplifiziert wurde. Die verwendeten Primer sind in Tab. 10 aufgeführt.

**Tab. 10: Primer, die in der Endpunkt-PCR für die DGGE eingesetzt wurden. Die GC-Klammer in der Primersequenz DGGE\_f\_cl ist grau hinterlegt.**

Primer	Sequenz	Referenz
DGGE_f_cl	CGCCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGCGGG GCACGGGGGGGGCCTACGGGAGGCAGCAG	Muyzer, de Waal et al., 1993
DGGE677R	ATMACTACGCATTTACCGCTAC	Steinum, Sjastad et al., 2009

Für die Reaktion wurden 0,2 Einheiten hot-start KAPA 2G robuste Polymerase (PeqLab), 1x KAPA Puffer, 200 nmol/L jedes Primers, 200 µmol/L jedes Nukleotids und je 5 µl der DNA verwendet. Die Ansätze wurden mittels nukleasefreien Wassers auf ein Gesamtvolumen von 25 µl gebracht. Die PCR wurde in einem Thermocycler (SensoQuest) durchgeführt und beinhaltete einen Denaturierungsschritt bei 95 °C für 5 min, 5 Zyklen von je 30 s bei 95 °C, 30 s bei 63 °C...58°C und 60 s bei 72 °C. Daran schlossen sich 35 Zyklen von 30 s bei 95 °C, 30 s bei 57 °C und 60 s bei 72 °C an. Der letzte Schritt bestand in einem abschließenden Elongationsschritt für 7 min bei 72 °C.

Für die DGGE-Analyse wurde ein Gel gegossen, Massenanteil Polyacrylamid  $\omega = 8\%$  mit einem Harnstoffgradienten von 40 %...60 %. Nach dem Beladen des Gels mit den mittels eines Färbepuffers versetzten DNA Proben lief die Elektrophorese bei einer Temperatur von 60 °C für 18 h...20 h. Das Gel wurde anschließend mittels einer Silbernitratfärbung gefärbt, um die Banden sichtbar zu machen. Nach der Digitalisierung eines Fotos des Gels konnte aufgrund der An- und Abwesenheit spezifischer Banden für jede Probe ein Bandenprofil erarbeitet werden, welches binär codiert in Tabellenform übertragen wurde. Mittels des Programms DendroUPGMA wurde ein Dendrogramm erstellt.

#### Quantifizierung spezifischer Bakterienspezies mittels Real Time PCR

Anhand von 16S rRNA Sequenzen, die einer Datenbank entnommen wurden, wurden für unterschiedliche Bakterienspezies spezifische Primer entworfen. Diese Primer wurden in einer Real Time PCR eingesetzt. Die Reaktionen wurden mit einem Maxima SYBR Green 2x Mastermix (Fermentas) in einem ABI Prism 7000 Sequence Detection System durchgeführt. Der RT-q-PCR Mastermix bestand aus 1x Maxima SYBR Green, 2 x Mastermix (mit 10 nmol/L ROX), 200 nmol/L je-

---

des Primers, 5  $\mu\text{L}$  bakterieller DNA aus den Proben sowie nukleasefreiem Wasser. Das Endvolumen jedes Ansatzes betrug 25  $\mu\text{L}$ . Zunächst erfolgte eine Denaturierung für 10 min bei 95 °C, gefolgt von 40 Zyklen von je 30 s bei 95 °C, 30 s bei 60 °C und 30 s bei 72 °C. Nach jedem Durchgang wurde die entsprechende Dissoziationskurve des Amplikons aufgezeichnet. Die Fluoreszenzdaten dieser Untersuchungen wurden mit Hilfe des Sequence Detection Systems erhoben.



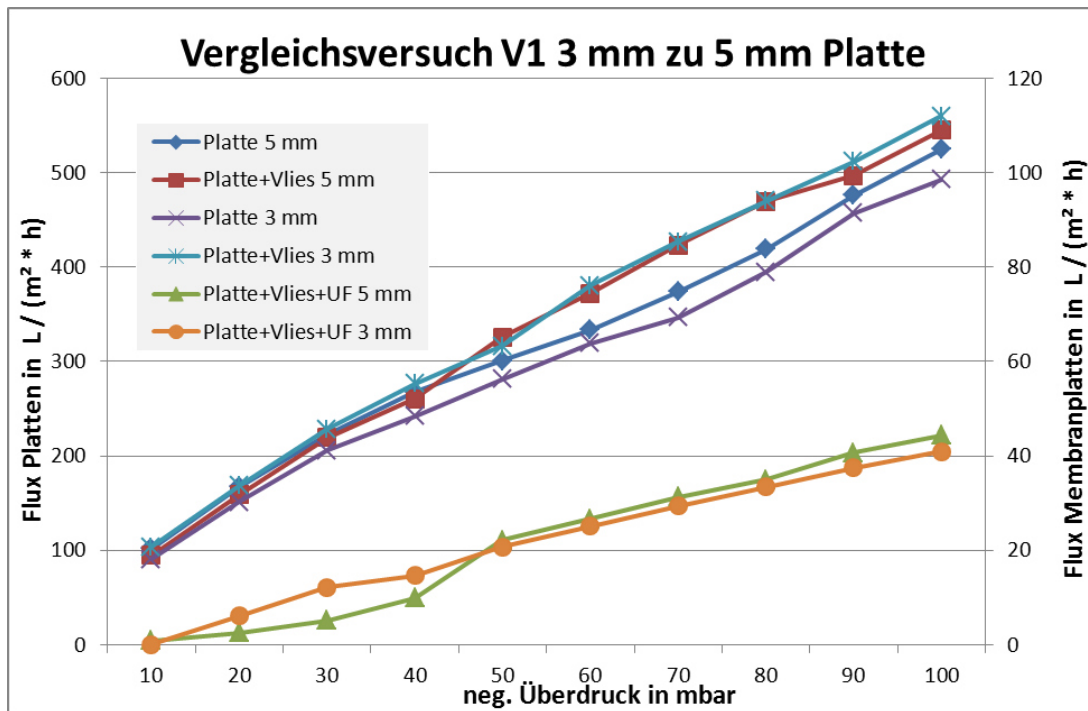


## 5 Ergebnisse und Diskussion

### 5.1 Halbtechnische Anlagen

#### 5.1.1 Vorversuche zur Konstruktion des Membranmoduls (MMF)

Da die Größen der Filtrationsflächen zwischen den einzelnen Probekörpern leicht unterschiedlich sind, wurden Werte für den Permeatfluss ( Flux) verglichen. Wie zu erwarten, liegt der Flux der dünneren Platte (3 mm) unterhalb des Wertes der dickeren Platte (5 mm), s. Abb. 15.

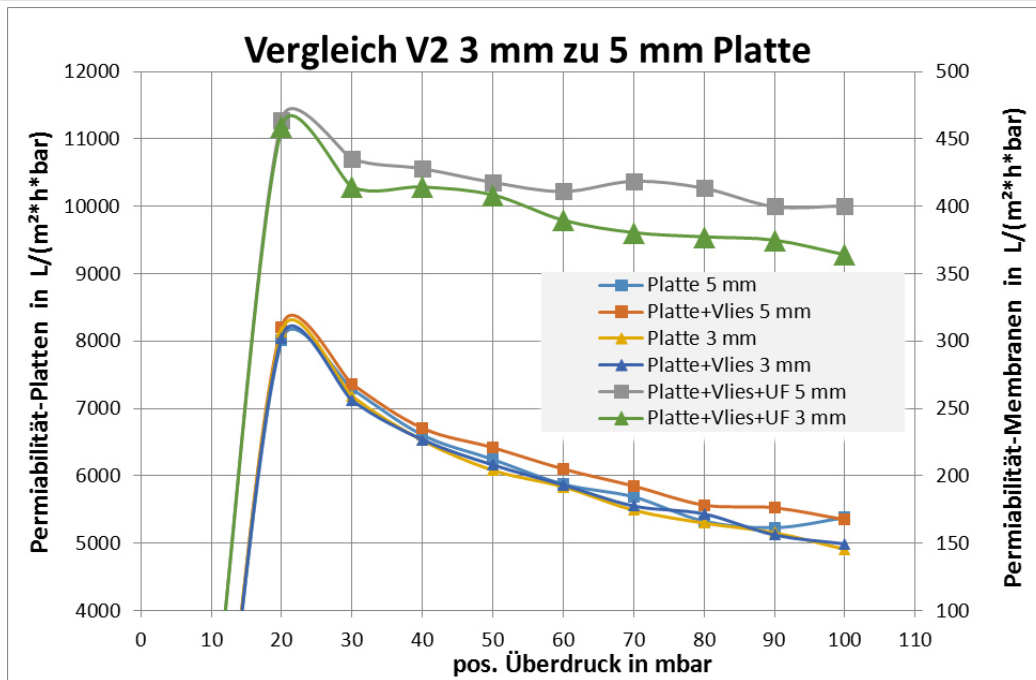


**Abb. 15: Vergleich Volumenströme bezogen auf jeweilige Plattenfläche. Ord. (li): Unbespannte u. mit Vlies bespannte Platten: Ord. (re) Platte mit Membran u. Vlies**

Die Permeatflüsse der beiden Platten (Vlies: 3 mm u. 5 mm) liegen nah beieinander. Teilweise wies die dünnere Platte (Dicke 3 mm) einen höheren Flux auf als die dickere (5 mm). Auffällig ist, dass die mit Vlies bespannten Platten höhere Volumenströme erreichen. Dies ist eigentlich überraschend, da eine Behinderung der Strömung durch das Vlies zu erwarten wäre. Eine Erklärung wäre, dass durch das Vlies eine Verringerung der Turbulenz im Zulauf erreicht wird.

Bedingt durch die geringen Volumenströme im Bereich mit niederen Druckwerten bei den Probekörpern (Vlies u. Membran), unterscheiden sich die Fluxwerte der beiden Plattentypen erheblich. Abweichungen von bis zu 133 % wurden berechnet. Deswegen wurden für die Auswertung dieser Ergebnisse nur Werte zwischen (50 u. 100) mbar berücksichtigt. In diesem Bereich liegen die Verlaufskurven fast parallel.

Die Permeabilität lag dabei i.Mi. bei 416 L/(m² h bar) (Platte + Vlies + Membran 3 mm) und 444 L/(m² h bar) (Platte + Vlies + Membran 5 mm), s. Abb. 16.



**Abb. 16: Vergleich Permeabilitäten. Ord. (li): Unbespannte u. mit Vlies bespannte Platten: Ord. (re) Platte mit Membran u. Vlies**

Diese Ergebnisse führten zur Wahl des Moduls (Platte + Vlies + Membran 3 mm), das eine höhere Packungsdichte erlaubte.

**5.1.2 Fische vor dem Start**

In der Vorphase, beim Aufbau der Anlagen, wurden die Fische in einem baugleichen Becken (Wasservolumen = 530 L) bei 14...15 °C gehalten (kontinuierliche Frischwasser Versorgung). Kurz nach dem Einsetzen wurde die Ammoniumexkretionsrate ohne Fütterung zu ca. 3,6...5,5 mg NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N / (kg Fisch · h) bestimmt. Bei 20 kg Fisch entspricht das ca. 1,7...2,6 g NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N / d.

Mit Fütterung konnte die Ammoniumexkretionsrate nicht bestimmt werden, daher wurde eine Schätzung durchgeführt. Nach Timmons & Losordo (1994) wurde die Ammoniumproduktion für die eingesetzte Fischmasse geschätzt (s. Gl. (23)).

$$F(\text{NH}_4^+\text{-N}_E) = F_M \cdot P_A \cdot 0,16 \cdot 0,8 \cdot 0,8 \tag{23}$$

Mit: F(NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N<sub>E</sub>) = NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N Exkretion der Fische in g/d  
 F<sub>M</sub> = Tägliche Futtermenge in g/d  
 P<sub>A</sub> = Proteinanteil des Futters in g/g  
 0,16 = N/Protein in g/g  
 0,8 = Assimilationsgrad von N  
 0,8 = Anteil des ausgeschiedenen N

Bei Fütterung von 150 g/d Futter und einem Proteinanteil von 0,41 g/g ergibt sich eine Ammoniumproduktion von 6,3 g/d NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N.

**5.1.3 Einfahren der Anlage ohne Fische ohne MDR (Einfahrphase)**

Das Einsetzen der Fische war erst ab einem stabilen Betrieb der Nitrifikation möglich, dazu mussten zu Beginn die Nitrifikationssäulen eingefahren werden. Ziel der Einfahrphase war es, Mikroorganismen anzureichern um eine vollständige Oxidation des NH<sub>4</sub><sup>+</sup> zu NO<sub>3</sub><sup>-</sup> zu gewährleisten und eine Nitritbildung möglichst zu vermeiden. Um den Aufwuchs der Nitrifikanten zu beschleunigen, wurden steigende Mengen Ammoniumhydrogencarbonat NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> in Wasser gelöst und den beiden Anlagen zugegeben. Dabei wurden alle relevanten Parameter kontrolliert und ggf. der pH-Wert mit NaHCO<sub>3</sub> erhöht, so dass ein Bereich von ca. pH 7 bis 8 eingehalten wurde.

### 5.1.3.1 Messung der Nitrifikationsraten (Einfahrphase)

Anschließend wurde die Nitrifikationsgeschwindigkeit anhand von drei Messungen innerhalb von ca. acht Stunden mittels Gl. (3) bzw. (4) gemessen (s. Tab. 11).

**Tab. 11: Volumenbezogene Nitrifikationsraten, Anlage A.**

Betriebstag Einfahrphase	T °C	NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> -N Start mg/L	Nitritations- rate <sup>1)</sup> mg/(L*h)	Nitratations- rate mg/(L*h)	Nitritations- fracht g/d	Nitratations- fracht g/d
23	21	12	50	9	34	6
41	24	6	39	31	27	21

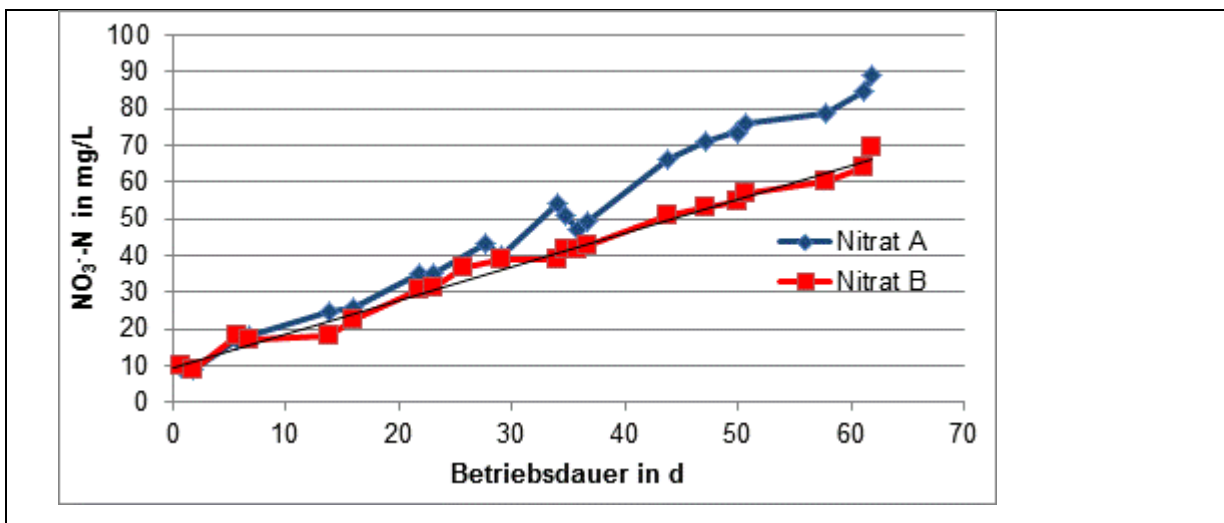
<sup>1)</sup>Nitritations- und Nitratationsrate sind auf das Granulat-Schüttvolumen als Festbett bezogen ( $V(\text{Ges}) = 1860$  L,  $V(\text{GNF}) = 28,3$  L)

Damit waren nach 41 d die Nitritations- und Nitratationsfrachten mit 27 g/d bzw. 21 g/d ausreichend hoch im Vergleich zur erwarteten Ammonium-Produktion der Fische von 6,3 g/d. Wichtig waren dabei auch die geringen Nitritkonzentrationen. Die Fische konnten nun eingesetzt werden.

### 5.1.4 Betrieb der Anlagen mit Fischen ohne MDR

Das Einsetzen der Fische in die beiden Becken nach 41 d der Einfahrphase wurde als Start der Hauptphase der Versuche (Betriebstag 0) definiert. Zu diesem Zeitpunkt war die Fischmasse 9578 g in Becken A bzw. 9706 g in Becken B.

Die beiden Anlagen wurden dann in der gleichen Weise betrieben, die Fische mit den gleichen Futtermengen zu gleichen Zeitpunkten gefüttert und sollten daher eine ähnliche Nitratentwicklung zeigen. Der Vergleich der Nitratkonzentrationen zeigt jedoch deutliche Unterschiede (s. Abb. 17).



**Abb. 17: Nitratproduktion in Anlagen A u. B, Betriebstag 0...62**

Die Frischwasser-Zufuhr im betrachteten Zeitraum lag bei Anlage A bei 30 L/d, bei Anlage B nur bei 26 L/d, so dass eine mögliche stärkere Verdünnung des Anlagenwassers bei Anlage ausgeschlossen werden konnte. Die Vermutung einer unkontrollierten Denitrifikation in einer der beiden Anlagen konnte durch Messungen der Nitratkonzentrationen an verschiedenen Stellen des Kreislaufs nicht bestätigt werden - die Nitratkonzentrationen waren überall gleich hoch. Eine weitere Vermutung war, dass die Fische in Anlage A und B unterschiedlich fressen oder dass ein Teil des Futters gleich durch das Überlaufrohr abgesaugt wird. Durch Wiegen der Fische konnte diese Annahme ebenfalls ausgeschlossen werden, da sich die Zunahmen der Fischmassen nicht unterschieden (s. Abb. 25).

Durch die Beobachtung, dass sich durch einen geringen Lichteinfall in den Nitrifikationssäulen der Anlage B Algen befanden, bestand die Möglichkeit, dass ein Teil des anorganischen Stickstoffs in Algenbiomasse festgelegt wurde. Daher wurden die Fenster vollkommen abgedunkelt. Außer-

dem wurden die Nitrifikationssäulen 2 (NF2) beider Anlagen abgeschaltet, weil das unterschiedliche Trägermaterial der beiden Säulen ebenfalls einen Unterschied bewirken könnte.

Wie in Abb. 18 deutlich wird, haben diese beiden Maßnahmen zum erwünschten Erfolg geführt. Die Nitratkonzentrationen der beiden Anlagen, sowie auch die anderen gemessenen Parameter verliefen von da an parallel. Damit kann die Eignung der Anlage B als Referenzanlage für die darauf folgenden Versuche mit Denitrifikation und Membranfiltration verifiziert werden.

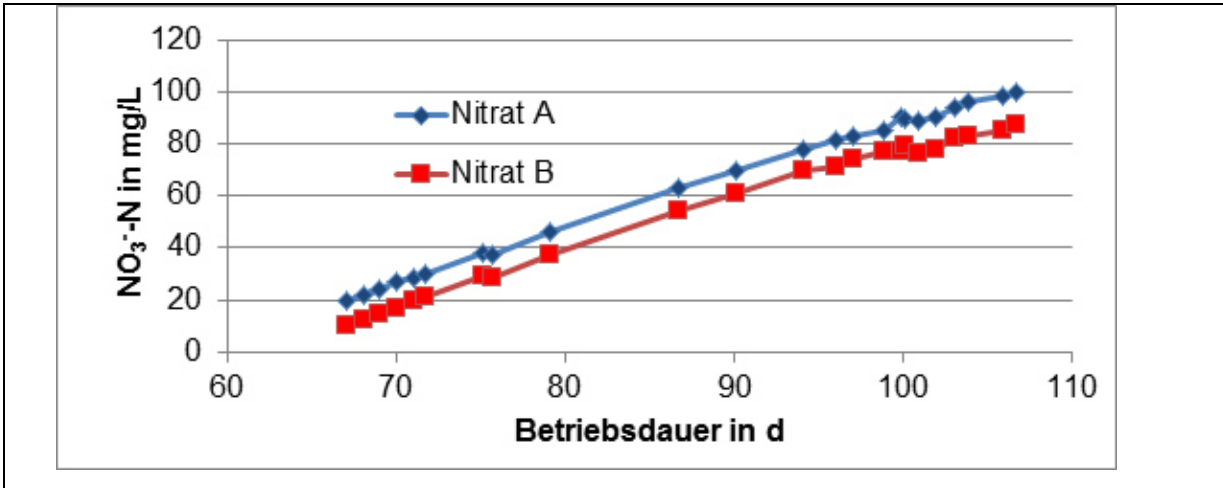


Abb. 18: Nitratkonzentrationen in Anlagen A u. B, Betriebstag 67...108

Aufgrund der in Kap. 4.1.4.3 beschriebenen Probleme konnte der MDR danach noch nicht in Betrieb genommen werden. Daher wurden die beiden Anlagen zunächst weiter parallel unter gleichen Bedingungen betrieben (Abb. 19). In diesem Zeitraum weist der Nitrat-Verlauf aufgrund der Wasserverluste zahlreiche Schwankungen auf, da im Sommer bedingt durch hohe Lufttemperatur und Pumpenabwärme die Wassertemperatur in beiden Anlagen fast bis 30 °C stieg. Zur Kühlung wurde das Wasser kontinuierlich mit Leitungswasser (10 °C) verdünnt. Die Temperaturen sanken auf 25 °C...26 °C und gleichzeitig die Nitratkonzentrationen. Dieser Zeitraum von 175. bis 212. Betriebstag ist auf dem Diagramm mit blau gepunkteten Linien gekennzeichnet.

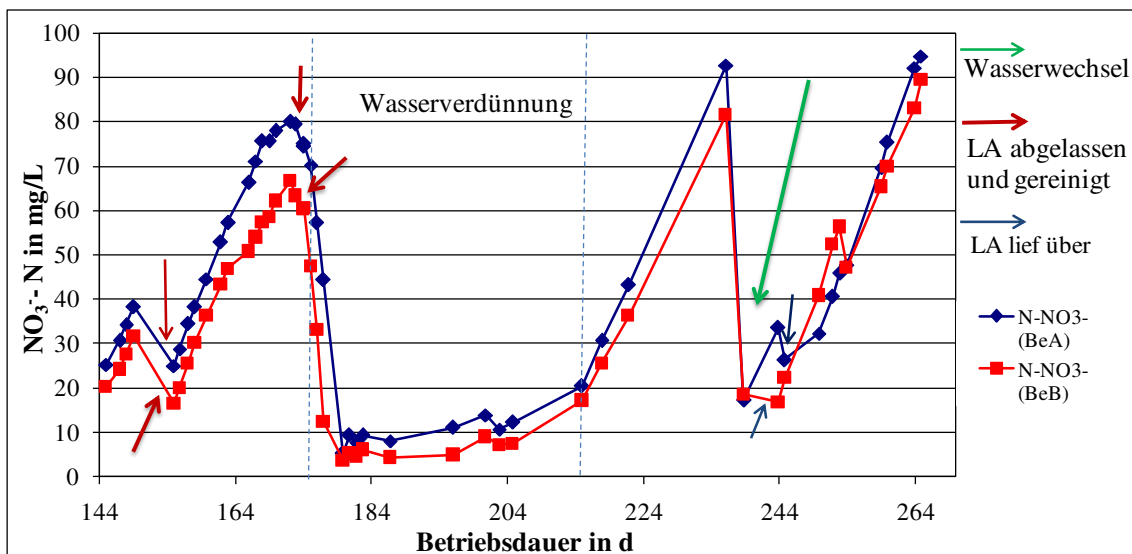


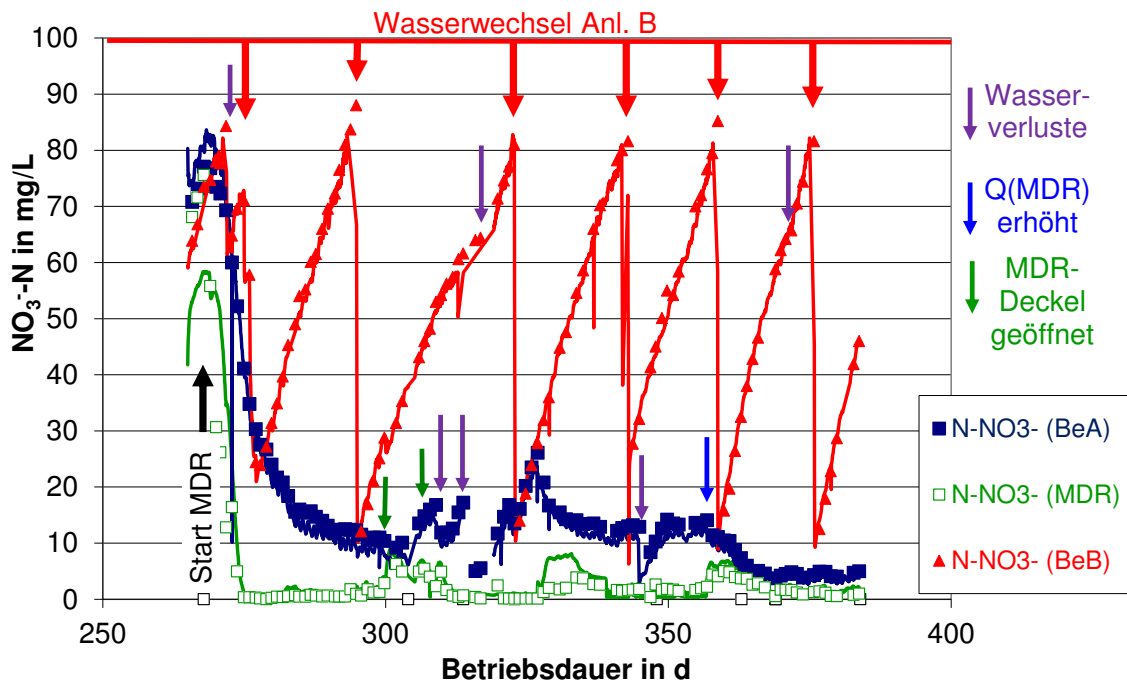
Abb. 19:  $\text{NO}_3^-$ -N-Konz. in beiden Anl. im Zeitraum vor der Reaktorinbetriebnahme (Analytikwerte). LA = Lamellenabscheider

Ansonsten stiegen die Nitratkonzentrationen nahezu linear und parallel an. Das bestätigt, dass das Verhalten der beiden Anlagen auch in diesem Zeitraum gut übereinstimmte. Nach einiger Zeit musste das Wasser in beiden Anlagen durch „Wasserwechsel“ verdünnt werden.

### 5.1.5 Betrieb der Anlagen mit Fischen mit MDR

#### 5.1.5.1 Nitrat

Die Anlage A wurde mit dem MDR erweitert (s. Abb. 1 und Kap. 4.1.4). Die Zudosierung von Ethanol, wurde am 267. d in Betrieb genommen und damit der Denitrifikationsprozess gestartet. Bereits am nächsten Tag begannen die Nitratkonzentrationen im Ablauf MDR und in Anlage A zu sinken (s. Abb. 20). Danach sanken die  $\text{NO}_3^-$ -N-Konzentrationen schnell weiter ab und erreichten nach 14 d ca. 11 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N im Becken A und zwischen 0,2 mg/L und 1 mg/L im Ablauf aus dem MDR.



**Abb. 20:** Verlauf Nitratkonz. im Becken A, B, Ablauf MDR, Symbole = Analytik-Werte, Linien = Online-Messwerte (Sensoren). Pfeile: s. Legende re. Rand Diagr.

Am 299. und 304. d wurde der Deckel des MDR geöffnet. Dadurch konnte Sauerstoff in den Luftraum über dem Wasser eindringen und die Denitrifikationsprozesse wurden gehemmt. Daher wurden in den folgenden Tagen sowohl im Becken A als auch im Reaktor steigende Nitratwerte beobachtet. Eine weitere Störung wurde durch einen Defekt an der MDR-Pumpe ausgelöst (315 d), was einen  $\text{NO}_3^-$ -N-Anstieg im Becken A bis auf 26 mg/L bewirkte. Zwischen 331.d und 357.d wurde durch einen konstanten Wasserdurchfluss ein stabiler Betrieb des MDR erreicht.

Am 358. Betriebstag wurde ein Entlüftungsschlauch in den Ablaufschlauch aus dem MDR eingebaut und damit der Widerstand im Ablauf des MDR verringert. Dadurch konnte der Durchfluss durch den Reaktor auf 170 L/h erhöht werden und die  $\text{NO}_3^-$ -N-Konzentrationen im Becken sanken auf ca. 4 mg/L.

Während im Becken A die Nitratkonzentrationen durch die Denitrifikation in einem akzeptablen Bereich, stieg sie im Becken B linear an. Um die Fische vor zu hohen Nitratkonzentrationen zu schützen und weil die Nitrat-Sonde höhere Nitrat-Werte nicht messen konnte, musste das Wasser bei  $\text{NO}_3^-$ -N-Konzentrationen über 80 mg/L gewechselt werden.

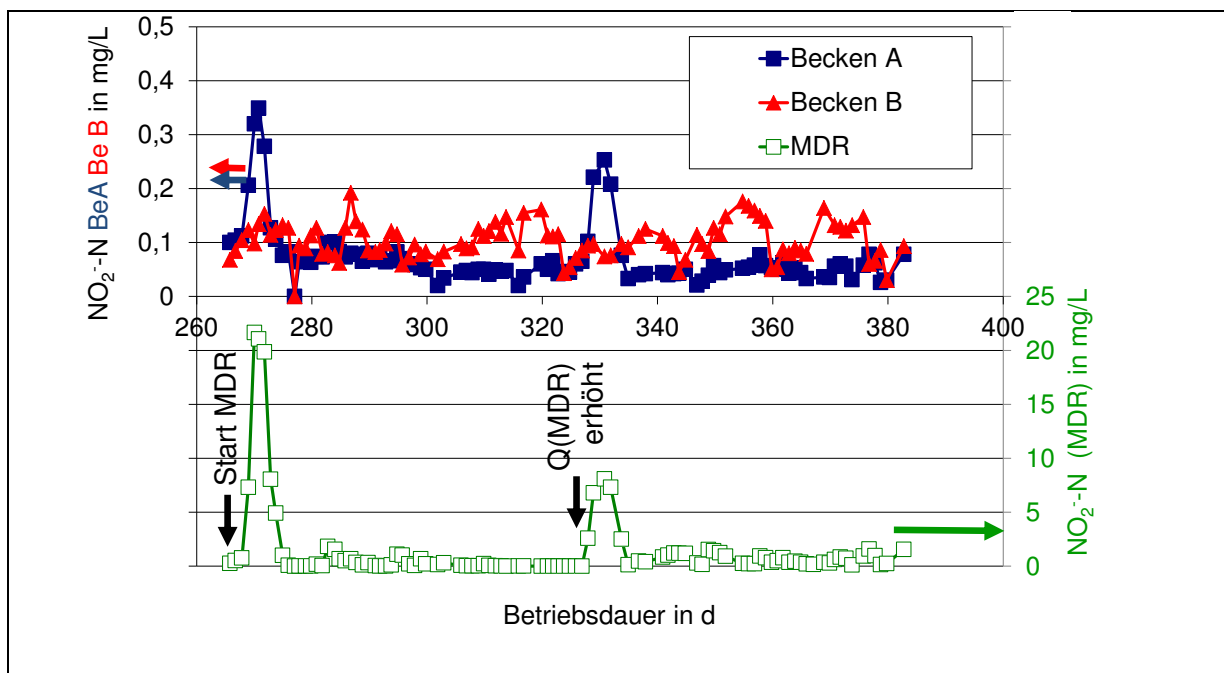
Beim Vergleich der Nitratkonzentrationen der Labor- Analytik mit den Daten aus den Online-Messungen, zeigt sich ein fast identischer Verlauf bei allen Messstellen (Abb. 20). Demzufolge liefern die Sensoren vertrauenswürdige Ergebnisse. Die einzige Ausnahme bilden die Werte von der

Nitratsonde im Ablauf des MDR zwischen dem 328 bis 333.d. Der Grund hierfür waren erhöhte Nitritkonzentrationen, die bei diesem Sensor mit Nitrat summarisch mitgemessen werden.

### 5.1.5.2 Nitrit

Abb. 21 zeigt, dass fast während der gesamten Versuchsdauer die Nitrit-Konzentrationen in beiden Fischbecken auf niedrigen Werten lagen und den empfohlenen Wert von  $0,3 \text{ mg/L NO}_2^- \text{-N}$  (s. Tab. 9) nicht überschritten.

Bei Betriebsstart des MDR mussten die denitrifizierenden Mikroorganismen erst aufwachsen, gleichzeitig waren hohe Nitratkonzentrationen im Zulauf zum MDR vorhanden, was zu einem Nitrit-Peak ( $21,6 \text{ mg/L NO}_2^- \text{-N. max.}$ ) nach 3 d (270. d) führte. Dies führte kurzfristig auch zu einer erhöhten Konzentration von  $0,35 \text{ mg/L NO}_2^- \text{-N}$  im Becken A, fiel dann aber sehr schnell wieder auf unter  $0,1 \text{ mg/L NO}_2^- \text{-N}$  ab. Der zweite Nitrit-Peak von  $8 \text{ mg/L NO}_2^- \text{-N}$  (330. d) wurde durch eine Veränderung im Ablaufsystem (T-Stück mit Entgasungsschlauch) verursacht. Dadurch wurde der Volumenstrom und damit die Nitrat- und Sauerstofffracht schlagartig erhöht, was dazu führte, dass die Kapazität der Bakterien zur vollständigen Reduktion des Nitrits nicht mehr ausreichte. Die beiden Peaks in  $\text{NO}_2^- \text{-N}$ -Verlauf vom Becken A an den Tagen 270 und 330 sind vermutlich eine Folge der erhöhten Konzentration von  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  im Ablauf aus dem MDR.



**Abb. 21 Verlauf der  $\text{NO}_2^- \text{-N}$ -Konz. im Ablauf aus MDR, in Becken A u. Referenzbecken B. Laboranalytik-Werte. Achtung: Skalierungen der Y-Achsen unterscheiden sich!**

Auffällig sind die allgemein etwas höheren  $\text{NO}_2^- \text{-N}$  Konzentration in der Anlage B im Vergleich zur Anlage A. Das könnte auf die allgemein höheren Nitratkonzentrationen in Anlage B zurück zu führen sein.

### 5.1.5.3 Stickstoffbilanz des Futters

Betrachtet man die Nitratkonzentrationen in Becken B (s. Abb. 20), so fällt auf, dass sie in den Zeiträumen zwischen den Wasserwechseln nahezu linear ansteigen. Das deutet darauf hin, dass die Exkretionsraten in diesen Bereichen nahezu konstant sind. Bestimmt man in diesem Zeitraum die Steigung der Geraden (z.B. Trendlinie, Excel), lässt sich daraus die N-Exkretion der Fische und das Verhältnis von als Futter zugeführten zu ausgeschiedenen Stickstoff A(N) berechnen (s. Tab. 12), Formeln s. Kap. 4.1.11.6).

Unter Annahme der gleichen N-Exkretion in Anlage A (bei gleicher Fischmasse und Futtergabe), lässt sich daraus die maximal mögliche Denitrationsrate  $r_{\text{DVNO}_3}$  (max) berechnen.

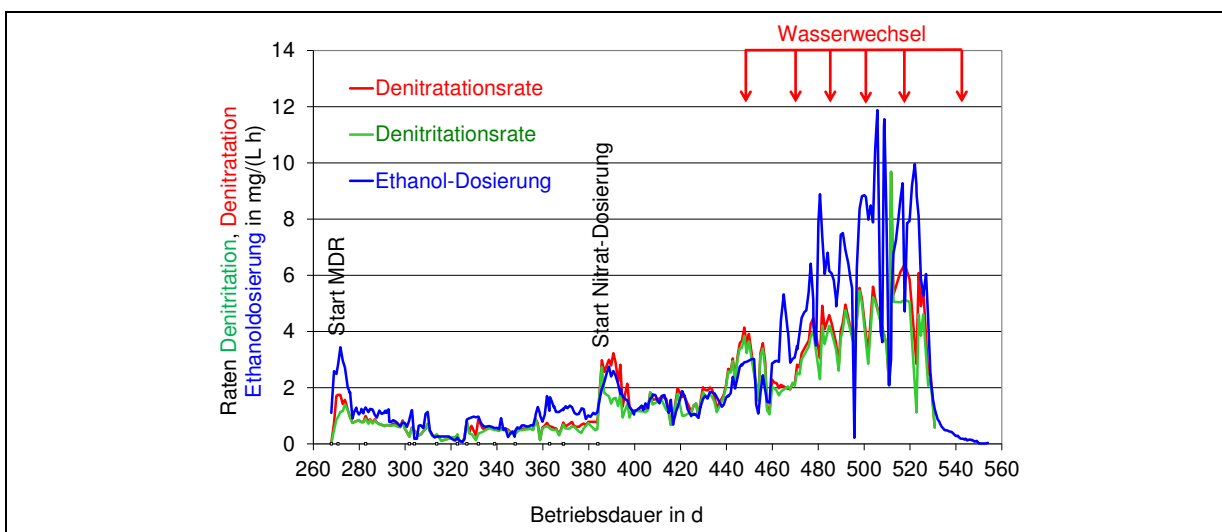
**Tab. 12: Berechnung der maximal möglichen Denitrationsrate und des Verhältnisses von N (Exkretion) zu N (Futter) = A(N). N-Anteil im Futter K(N) = 0,0656**

Betriebs- tag von...bis	Steigung d. Geraden aus Diagr. (Be B)	N-Exkre- tion d. Fi- sche	max. Denitra- tionsrate	Tägliche Futter- gabe	N (Futter) Zugabe je d	Verhältnis N (Exkre- tion) zu N (Futter)
Formelzei- chen	m	F(NFi)	$r_{\text{DVNO}_3}$ (max)	F(Fu)	F(N)	A(N)
d	mg/(L d)	g/d	mg/(L h)	g/d	g/d	%
265...271	3,1	5,7	0,4	390	25,6	22
277...294	3,7	6,8	0,4	390	25,6	27
295...307	2,8	5,2	0,3	300	19,7	26
323...340	3,8	6,9	0,4	300	19,7	35
359...375	4,1	7,4	0,5	300	19,7	38
376...392	4,4	8,0	0,5	300	19,7	41

Interessant sind die steigenden Stickstoffausscheidungsraten der Fische, obwohl die Futterrationen zwischen dem 295. und 392. d gleich blieben, also relativ zur steigenden Fischmasse sogar sanken.

#### 5.1.5.4 Denitrifikationsraten und Ethanolbedarf

Für die Beurteilung der Leistungsfähigkeit des MDR wurden die Denitrifikationsraten (=Denitrationsrate u. Denitrationsrate) aus den Labor-Analysenwerten aus Zulauf (Becken A) und Ablauf des MDR und den entsprechenden Online-Daten für den Volumenstrom aus dem Reaktor und dem jeweils aktuellen Wasservolumen im Reaktor bestimmt (s. Abb. 22). Die Denitrationsrate für die erste Teil-Reaktion  $\text{NO}_3^- \text{-N} \rightarrow \text{NO}_2^- \text{-N}$  wurde nach Gl. (13) aus den Differenzen der Nitratkonzentrationen im Zu- und Ablauf berechnet. Für den zweiten Teilschritt der Denitrifikation, der Reaktion  $\text{NO}_2^- \text{-N} \rightarrow \text{N}_2$ , wurde die Denitrationsrate unter Berücksichtigung der Nitritkonzentrationen nach Gl. (12) berechnet. Nach dem Start der Nitratdosierung wurden die Online-Daten der Waage mit der Nitrat-Lösung für die Berechnung mit einbezogen.



**Abb. 22: Verlauf der Denitrifikationsraten bei pH 7,3...8,1; (24...28) °C sowie der Ethanol-Dosierung, hier ebenfalls auf Wasservolumen MDR bezogen.**

Wie aus Abb. 22 ersichtlich ist, stiegen die Denitrifikationsraten nach Beginn der Dosierung schnell an, aber sanken dann nach dem Start der Ethanol-Dosierung auch schnell wieder ab, da

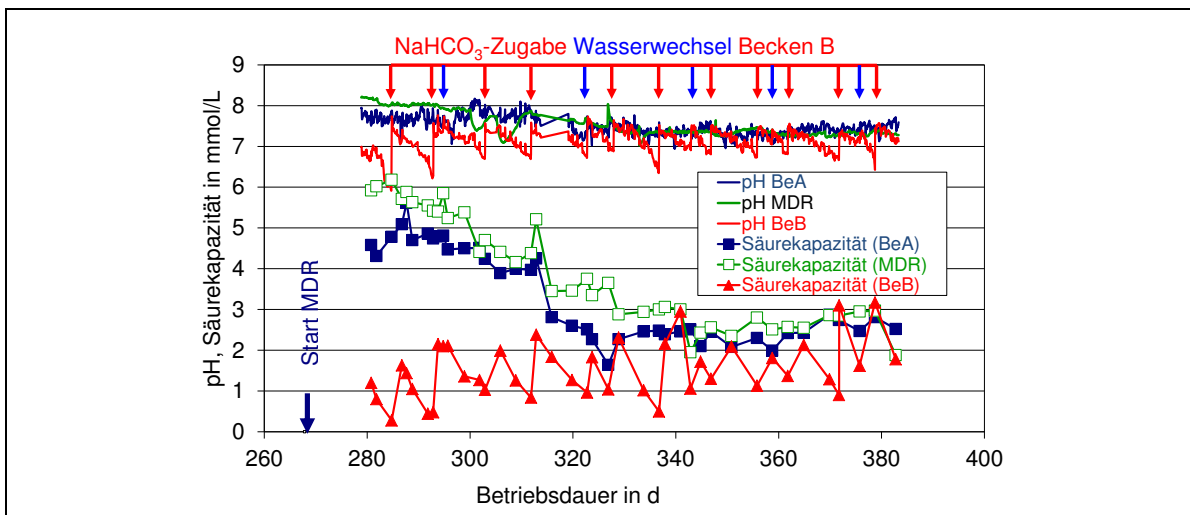
die Nitrat-Konzentrationen im Becken durch die Denitrifikation sanken. Da die Nitratkonzentrationen im Becken A sich dann zwischen 5...20 mg/L  $\text{NO}_3^-$ -N einpendelten, wurde die Denitrifikationsleistung vor allem vom Volumenstrom durch den MDR beeinflusst. Im Vergleich mit Tab. 12 lässt sich aber leicht erkennen, dass die Denitrifikationsraten bis zum 383. d vor allem durch die Stickstoff-Exkretionsraten der Fische limitiert waren.

Um die Leistungsfähigkeit in Bezug auf die Denitrifikation auszuloten, wurde daher ab dem 383. d Nitratlösung zu dosiert (s. Kap. 4.1.4.6). Ab diesem Tag stiegen die Denitrifikationsraten damit deutlich an (s. Abb. 22) und konnten bis auf 5...6 mg/(L h) gesteigert werden. Als Folge der  $\text{NaNO}_3$  Dosierung stieg der pH-Wert im Becken A sehr schnell an und musste durch manuelle Zugabe von Salzsäure in das Pumpenbecken ausgeglichen werden. Auch erhöhte sich damit die  $\text{NaCl}$ -Konzentration im Wasser der Anlage, so dass von Zeit zu Zeit mit Leitungswasser verdünnt werden musste. Deshalb wurde der Zeitraum, in dem Nitrat zu dosiert wurde, nicht für den Vergleich des Wasserbedarfs herangezogen.

Der gesamte Ethanol-Bedarf im Zeitraum ohne Nitratdosierung (267 d ...384 d) belief sich auf 2,1 g Ethanol / (g denitrifiziertem  $\text{NO}_3^-$ -N). Mit Nitratdosierung reduzierte sich der Bedarf auf ca. 1,5 g Ethanol / g denitrifiziertem  $\text{NO}_3^-$ -N. Insgesamt resultierte ein Ethanolbedarf von ca. 1,6 g Ethanol / g denitrifiziertem  $\text{NO}_3^-$ -N.

#### 5.1.5.5 Säurekapazität (SK) und pH

Abb. 23 zeigt den Vergleich zwischen Anlage A und B bezüglich pH und SK. In Anlage B sank der pH-Wert immer wieder bis 6,5 ab und wurde entweder durch Zugabe von  $\text{NaHCO}_3$  oder durch den aufgrund von hohen Nitratkonzentrationen erforderlichen Wasserwechsel (Leitungswasser mit SK 2,6...2,7 mmol/L) auf ca. pH 7,5 erhöht. Durch diese Maßnahmen erhöhte sich parallel zum pH-Wert auch die Säurekapazität immer wieder.



**Abb. 23: Vergleich von pH-Werten u. Säurekapazität; Anlage A (mit MDR) u. B (Referenz)**

In Becken A stellte sich ein annähernd konstanter pH-Wert zwischen 7,4 und 7,8 ein. Die hohen Werte für die Säurekapazität zwischen 280 und 323 d im Becken A und im Ablauf des MDR können darauf zurück geführt werden, dass bei der Reduktion der hohen Nitratkonzentrationen nach der MDR-Inbetriebnahme mehr  $\text{OH}^-$ -Ionen entstanden als bei der Nitrifikation  $\text{H}^+$ -Ionen frei wurden. Durch Verdunstung und Wasserverluste entstand eine kontinuierliche Verdünnung mit Leitungswasser. Dadurch hat sich die Säurekapazität allmählich an das zugeführte Leitungswasser angepasst.



Der pH-Wert im Ablauf aus dem Membran-Deni-Reaktor wies nur geringe Schwankungen im pH-Bereich von 7,3 bis 7,5 auf. Durch die Denitrifikation bildeten sich OH<sup>-</sup>-Ionen und gelöstes CO<sub>2</sub>. Beide Komponenten beeinflussen den pH-Wert. Sobald das Wasser mit der Raumluft in Kontakt kommt, entweicht ein Teil des CO<sub>2</sub> und der pH-Wert steigt. Daher liegen die pH-Werte im Ablauf des MDR teilweise über den Werten im Becken A. Die kleinen täglichen, regelmäßigen pH-Wert-Absenkungen in beiden Becken treten immer nach der Fütterung auf und sind Folge vermehrter CO<sub>2</sub> Ausscheidung der Fische nach der Fütterung.

Im Zeitraum zwischen dem 265. und 383. Betriebstag (insgesamt 118 Tage) wurde für die Anlage B 3,950 kg NaHCO<sub>3</sub> verbraucht. Für die Anlage A war innerhalb der gesamten Betriebszeit keine Zugabe von NaHCO<sub>3</sub> erforderlich.

### 5.1.5.6 Funktion der Membranreinigung

#### Transmembrandruck, Permeabilität und Volumenstrom

Bis zum 320. d sind starke Schwankungen im Volumenstrom zu erkennen (s. Abb. 24). Dies ist die Folge der ständigen Bemühungen den Durchfluss durch den Reaktor zu erhöhen, um die Leistungsfähigkeit der Membran zu untersuchen. Aber bei erhöhtem Zulauf stieg der Druck gleichzeitig im Reaktor so weit an, dass die MDR Pumpe durch die Regelung immer wieder abgeschaltet wurde, um den Druck im Reaktor aus Sicherheitsgründen auf 1130 mbar zu begrenzen. Die Vermutung, dass dies durch einen erhöhten Transmembrandruck, also durch Fouling auf der Membran verursacht wurde, bestätigte sich nicht, da der TMP teilweise nur bei ca. 2 mbar lag. Die Ursache lag in der Bildung einer Gasblase im Ablaufschlauch.

Daher wurden ab dem 327. d Veränderungen im Ablaufsystem vorgenommen (T-Stück mit Entgasungsschlauch), um die Gasblase aus der Strömung zu entfernen. Dadurch wurde erreicht, dass der Widerstand im Ablaufsystem sank, und damit der Volumenstrom erhöht wurde. Danach wurde ein stabilerer Betrieb erreicht. Über Nacht sankt der Volumenstrom immer auf unter 120 L/h ab, durch das tägliche Entgasen des Ablaufsystems (öffnen des Hahns) stieg der Durchfluss wieder auf 146 L/h an.

Nach erneuter Veränderung im Ablaufsystem an dem 368. Tag stieg der Volumenstrom auf 130 L/h und der Permeatfluss erreichte Werte zwischen 10 L/(m<sup>2</sup>\*h) und 15 L/(m<sup>2</sup>\*h), was in etwa dem für ein solches Modul üblichen Wert entspricht.

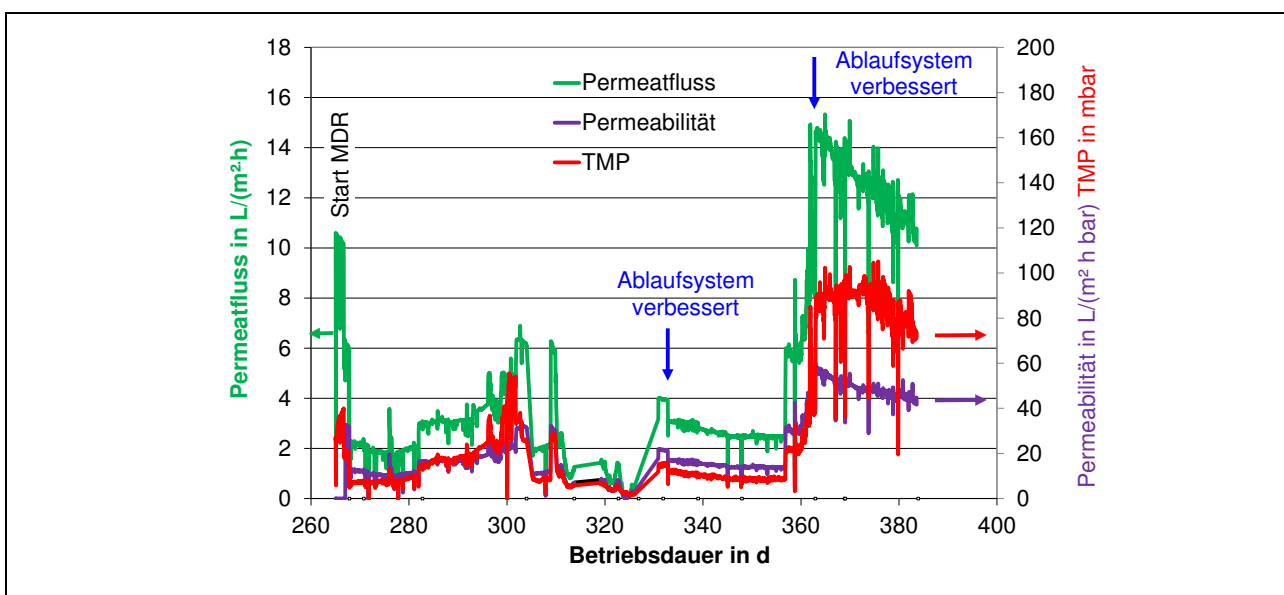


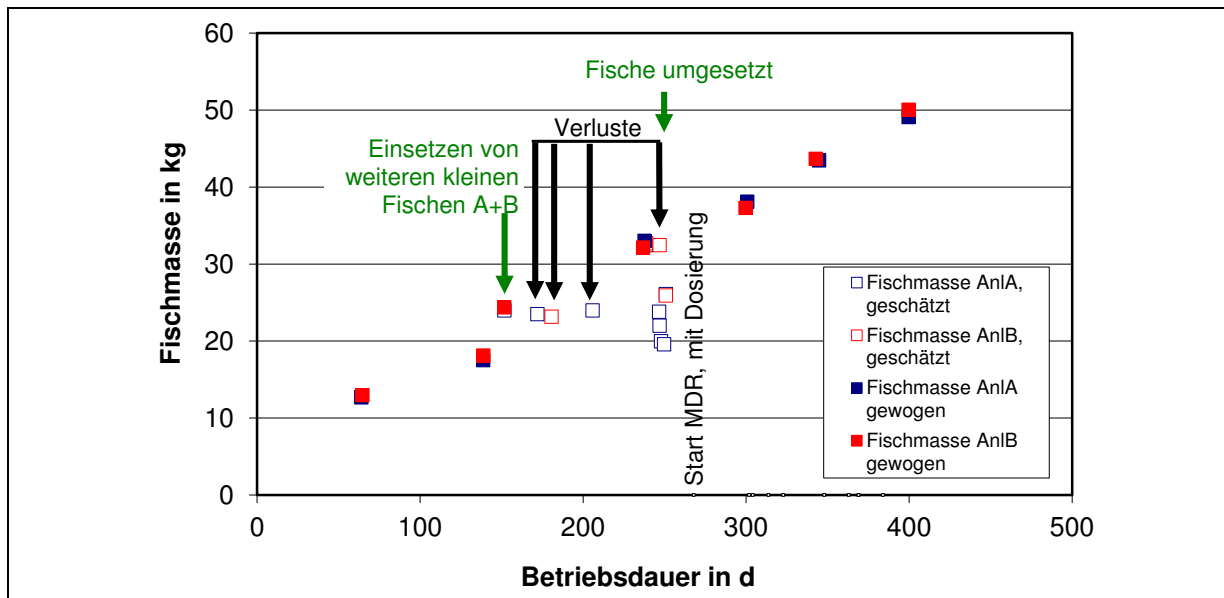
Abb. 24: Verlauf von Permeatfluss, Permeabilität u. TMP, T= (27 bis 30) °C. Online-Messwerte

Ab dem 365. Tag sanken der Volumenstrom, und damit auch der Permeatfluss, aufgrund eines abgenutzten Stators der MDR Pumpe.

Während der gesamten Betriebsdauer bestand kein Bedarf das Membranmodul zu reinigen. Offensichtlich war die Reinigung durch die Schaumstoffwürfel vollkommen ausreichend.

### 5.1.5.7 Fischwachstum

Da bei mehreren Stromausfällen längere Zeit keine Druckluft zur Verfügung stand, und das Notversorgungssystem in einem Fall ebenfalls ausgefallen war, waren einige Fischverluste zu beklagen (Abb. 25). Da diese Verluste in beiden Anlagen unterschiedlich waren, wurden danach 8 Fische aus Becken B in Becken A umgesetzt, um vor Start des MDR mit gleicher Masse und Zahl von Fischen zu beginnen. Danach ergaben sich keine Fischverluste mehr während der restlichen Betriebsdauer.



**Abb. 25: Fischmasse während gesamter Betriebszeit in Becken A u. B. Fisch-Verluste durch Stromausfälle (schwarze Pfeile). Umsetzen der Fische vor Start des MDR.**

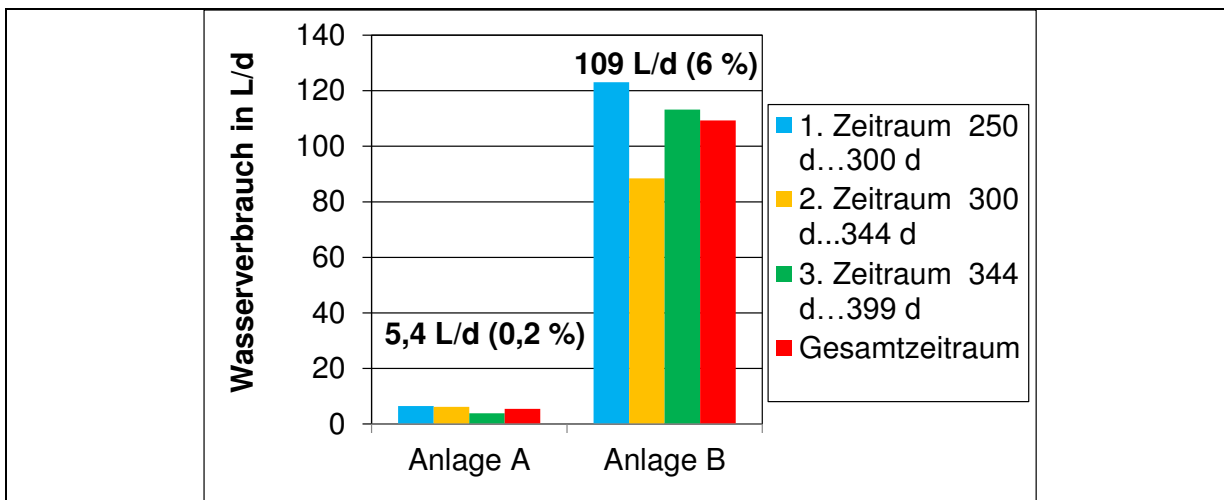
Bei den ersten Wägungen wurden 3 bis 4 Fische auf einmal, bei späteren Wiege-Aktionen wurden sie einzeln gewogen. Der Fisch wurde dabei mit einem Kescher aus dem Becken entnommen und in einen mit Wasser befüllten Behälter eingesetzt, der sich auf einer Waage befand. Die Unterschiede des Fischwachstums zwischen den Anlagen A und B waren sehr gering und sollten nicht überbewertet werden, da die Messgenauigkeit bei dieser Art von Messung naturgemäß nicht sehr hoch ist, da am Kescher und den Fischen eine unbekannte Menge Wasser haften bleibt.

Ab dem 294. d mussten die täglichen Futterrationen von 390 g auf 300 g je Becken reduziert werden, da die Spitzenwerte der Ammoniumkonzentrationen zu hoch lagen, was das Wachstum der Fische limitiert haben dürfte.

### 5.1.5.8 Täglicher Wasserbedarf

Der tägliche Wasserverbrauch bei der Anlage A (Abb. 26) ist sehr gering und liegt bei ca. 5,4 L/d oder 0,2 % des gesamten Wasservolumens der Anlage. Nur eine kleine Menge an Frischwasser wurde als Ausgleich für die Verdunstungsverluste und Wasserverluste durch Schlammaustrag benötigt. In der Anlage B wurde im Vergleich zu Anlage A viel mehr Wasser durch die regelmäßigen Verdünnungsaktionen verbraucht. Dabei wurde im 2. Zeitraum weniger verdünnt als im 1. und 3. Zeitraum. Insgesamt liegt der tägliche Wasserverbrauch innerhalb 149 Tagen bei 109 L/d, was etwa 6 % des gesamten Wasservolumens der Anlage B entspricht (s. Tab. 2). Erfah-

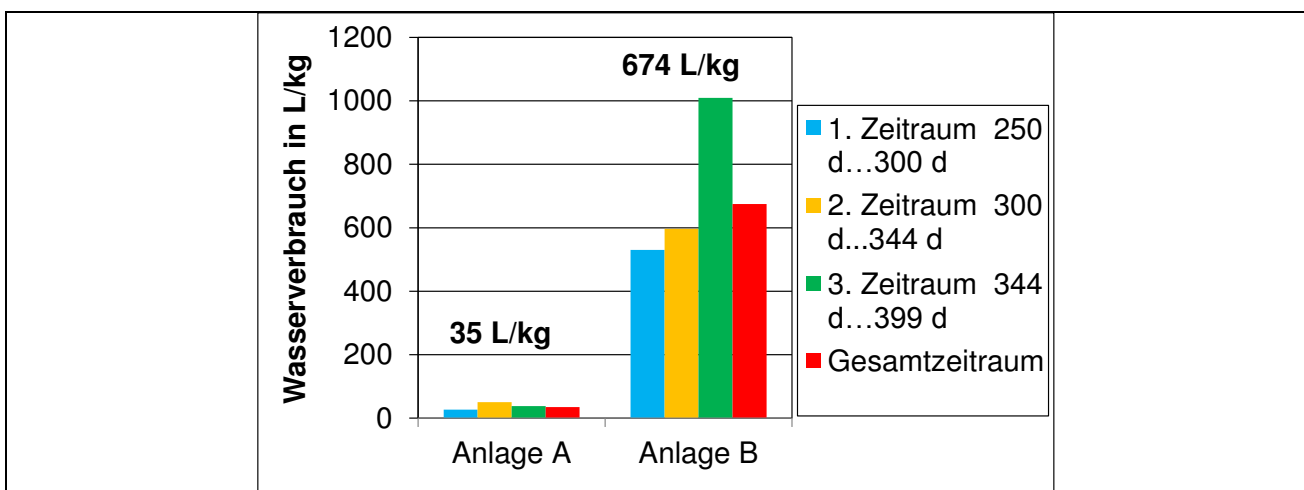
rungswerte für Kreislaufanlagen ohne Denitrifikation liegen bei ca. 3...15 % Wasserverbrauch bez. auf Gesamt-Wasser-Volumen (LAWA, 2003).



**Abb. 26: Täglicher Wasserbedarf in Anlage A (MDR) u. B (Referenz) 250 d...399 d**

Bezogen auf den Fischzuwachs unterscheidet sich der Wasserverbrauch ebenfalls (s. Abb. 27). In Anlage A ist der Wasserverbrauch während der gesamten Betriebsdauer fast konstant und liegt bei ca. 35 L/kg. Der geringere Wasserbedarf von 27 L/kg in 1. Zeitraum kann damit begründet werden, dass in diesem Zeitraum durch die höhere tägliche Futtermenge im Vergleich zu anderen Zeiträumen ein höherer Fischzuwachs erzielt wurde. Durch die gesenkte Futtermenge und damit verbundenen geringeren Fischzuwachs stieg der Wasserbedarf im Zeitraum 2 bis auf 50,5 L/kg.

Beim Becken B beobachtet man im 1. und 2. Zeitraum keine relevanten Veränderungen im Wasserverbrauch. Auffällig ist der auf 1000 L/kg gestiegene Bedarf an Frischwasser im 3. Zeitraum. Es wurde fast die gleiche Menge an Frischwasser benötigt wie im 1. Zeitraum, allerdings hat sich der Fischzuwachs von 11,4 kg auf 6,4 kg halbiert.

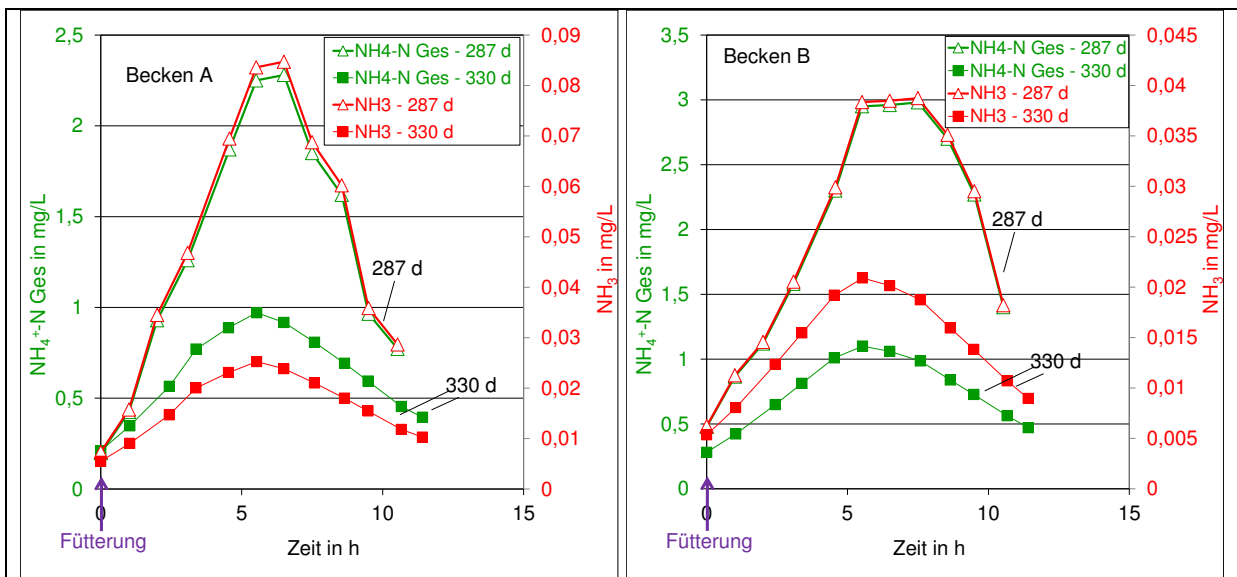


**Abb. 27: Wasserverbrauch in L/kg Fischzuwachs (250 d...399 d) (Anl. A mit, Anl. B ohne MDR)**

Beim Vergleich mit der Literatur zeigt sich eine gute Übereinstimmung mit den hier ermittelten Werten für den Wasserverbrauch. Ohne Denitrifikationsstufe geht man von einem Wasserbedarf von ca. 500 L/kg Fischzuwachs aus (LAWA 2003), mit Denitrifikationsstufe wird erfahrungsgemäß eine Wassermenge von ca. 40 L/kg verbraucht (FAO Fisheries Report, 2001).

### 5.1.5.9 Tagesganglinien der Ammoniumkonzentrationen

Die Fischgesundheit kann in besonderem Maße von der Ammoniakkonzentration ( $\text{NH}_3$ ) beeinträchtigt werden, denn freies  $\text{NH}_3$  hemmt die Diffusion von Ammonium über die Kiemen und kann damit bei hohen Konzentrationen letztendlich Kiemennekrosen auslösen (Steffens, 2008). Es wird daher empfohlen den Grenzwert von 0,02 mg/L  $\text{NH}_3$  nicht zu überschreiten (Baur & Rapp, 1988). Daher wurden Ammoniak Konzentration im Wasser täglich kontrolliert. Bei den verwendeten Küvettentests wird grundsätzlich die Summe aus  $[\text{NH}_4^+\text{-N}] + [\text{NH}_3\text{-N}] (= \text{NH}_4^+\text{-N Ges})$  gemessen, daraus lässt sich in Abhängigkeit von pH und Temperatur die  $\text{NH}_3$  Konzentration berechnen (s. Kap. 4.1.7.1).



**Abb. 28: Beispiel für  $\text{NH}_3$  u.  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  ges Akkumulation bei unterschiedl. Futterrationen, 287. d u. 330. d (n. Verminderung der Futtermenge). Li.: Becken A, re: Becken B.**

Während des Betriebs der beiden Anlagen wurden am 285. Betriebstag Rötungen an der Haut der Fische in Becken A und B festgestellt, was ein Anzeichen für erhöhte Ammoniumkonzentrationen sein könnte (pers. Mitteilung Frau Verena Jung-Schroers, TiHo). Da die täglich vor der Fütterung gemessenen  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  Ges und die daraus berechneten  $\text{NH}_3$  Konzentrationen jedoch immer weit unter den Grenzwerten lagen, wurde vermutet, dass es eventuell temporär zu hohen Ammonium/Ammoniak-Konzentrationen im Fischbecken kam. Deshalb wurde an mehrere Tagen Tagesganglinien aufgenommen, um zu untersuchen, wie sich die Ammonium-Konzentrationen im Laufe des Tages nach der Fütterung im Becken A und B entwickeln.

Im beiden Anlagen erreichte  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  Ges immer innerhalb 5,5...7,5 h nach der Fütterung den maximalen Wert (s. Abb. 28). Nach Umrechnung auf die Ammoniak-Konzentrationen nach Formel (6), (7), wurden  $\text{NH}_3$ -Werte bis zu 0,085 mg/L im Becken A (Abb. 28, li.) bzw. 0,038 mg/L in Becken B erreicht (Abb. 28, re.). Weil die Ammonium bzw. Ammoniak-Konzentrationen im Wasser von der Futtermenge abhängig sind, wurde die Futtermenge am 294. Betriebstag von 390 g/d auf 300 g/d reduziert.

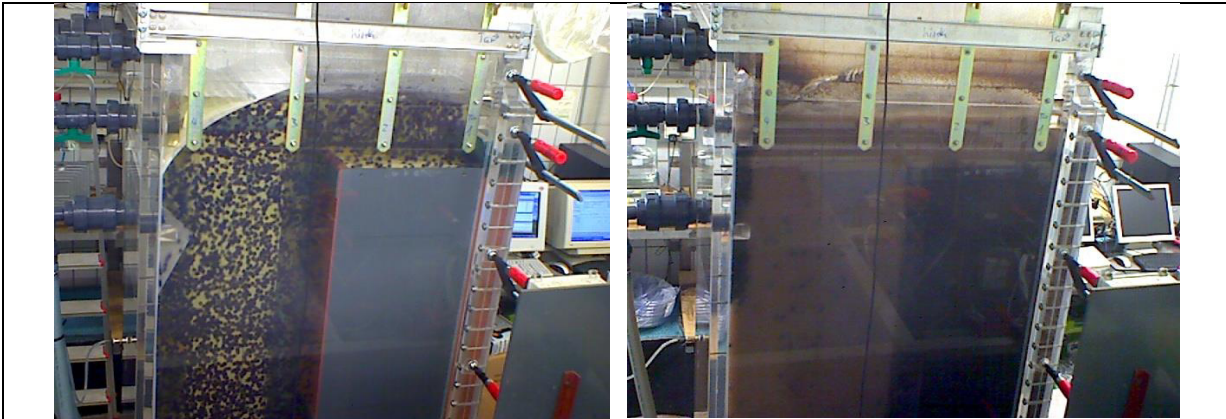
Die Ganglinien am 330. d zeigen deutlich den Erfolg dieser Umstellung.

Nach der Verminderung der Futtermenge wurden beim nächsten Wiegen der Fische keine Rötungen an der Schleimhaut der Fische in beiden Becken mehr festgestellt.

Anmerkung zu Abb. 28: In Becken A sind die maximalen  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  Ges Konzentrationen kleiner, die  $\text{NH}_3$  Konzentrationen jedoch höher als in Becken B. Dies liegt daran, dass der pH-Wert in Becken B niedriger, und damit auch das Verhältnis von  $\text{NH}_3 / \text{NH}_4^+\text{-N}$  Ges kleiner ist.

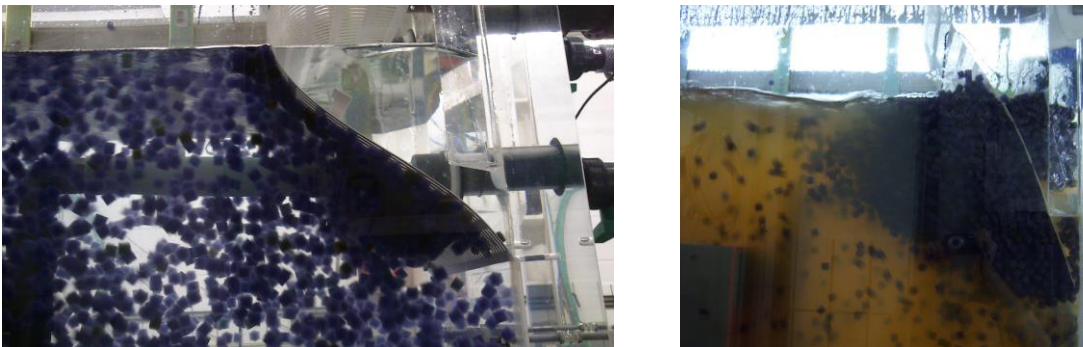
### 5.1.5.10 Erfahrungen mit dem Reaktor

Eine ausreichende Rezirkulationsströmung zu erzeugen war zunächst eine schwierige Aufgabe, die jedoch gelöst werden konnte. Mit Hilfe des transparenten Reaktors konnten die Schaumstoffwürfel gut beobachtet werden und so unerwünschte Ansammlungen auf Gittern oder in Totzonen erkannt und beseitigt gewirkt werden (s. Abb. 29). Es war gut zu erkennen, dass sich die Biomasse zu Beginn der Betriebszeit im Wesentlichen auf den Schaumstoffwürfeln befand, während am Ende (bei hoher Nitratfracht) auch viele Schlammflockchen im Wasser vorhanden waren, die eine höhere Trübung bewirkten.



**Abb. 29: MDR mit Schaumstoffwürfeln im Kreislauf 3 d n. Inbetriebnahme (li), n. 287 d Betrieb (Versuchsende, re)**

Kurz nach der Inbetriebnahme war festzustellen, dass sich im oberen Bereich Ruhezone ausgebildet hatten. Daraufhin wurde ein Ableitgitter eingebaut, das später mit Kunststoffseilen in Position gehalten wurde (Abb. 30 li). Allerdings kam es dennoch gelegentlich vor, dass sich ein Teil der Schaumstoff-Würfel dort angesammelte und damit nicht mehr für den Reinigungsprozess zur Verfügung stand (Abb. 30 re).



**Abb. 30: Strömung mit Ableitblech (li) Bildung einer Totzone im Reaktor (re)**

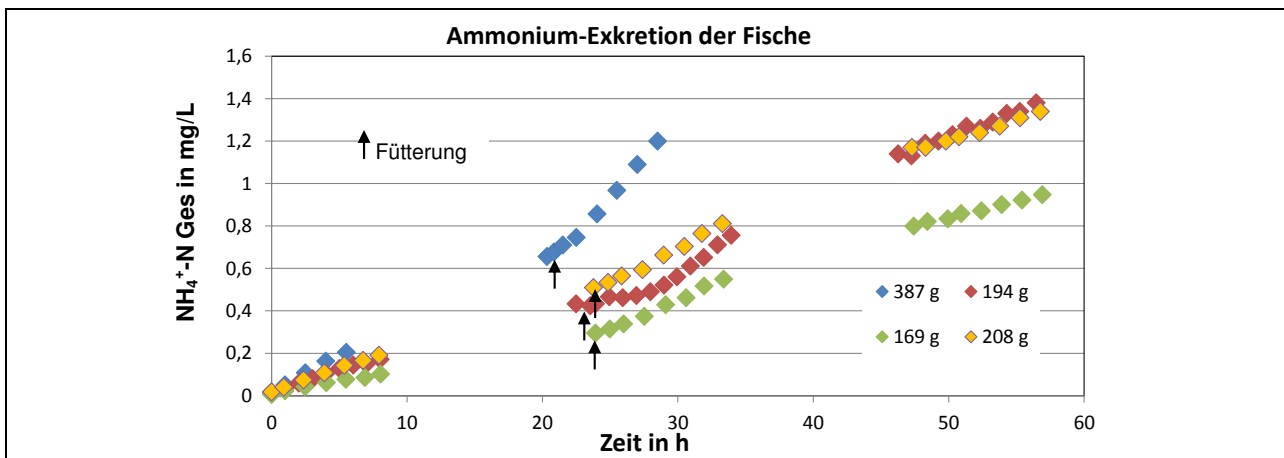
Durch die Rezirkulationsströmung wurden die Gitter, die die Schaumstoffwürfel zurückhalten sollten, normalerweise freigespült. In wenigen Fällen wurde durch am Gitter anhaftende Schaumstoffwürfel eine derartige Druckdifferenz erzeugt, dass sich das Edelmetallgitter verbog und die Schaumstoffwürfel hindurch gesaugt wurden und in der Pumpe landeten. Das Gitter wurde daraufhin zunächst mit Aluminiumprofilen verstärkt. Als diese dann ebenfalls verbogen waren wurde es neu konstruiert und eine verbesserte Version gebaut.

## 5.2 Stickstoffströme in Aquarien

### 5.2.1 Versuche zur Ammoniumexkretion von Einzel-Fischen

Die Versuche zur Ammonium-Exkretion von Karpfen wurden mit den Aquarien und den Fischen aus dem Vorgängerprojekt (Phase 1) durchgeführt (Abb. 31).

Der Versuchsablauf war wie folgt: Am ersten Tag wurde ein einzelner Fisch gewogen und in das Versuchsbecken eingesetzt und danach die Ammoniumkonzentrationen verfolgt (auch Nitrit, Nitrat, pH, T). Am zweiten Tag wurden 2 g Futter zugegeben. Das Futter wurde vollständig aufgenommen. Der pH-Wert durfte auf max. pH 7,5 ansteigen. Am dritten Tag wurde die Ammoniumausscheidung ohne erneute Fütterung weiterverfolgt.



**Abb. 31: NH<sub>4</sub>-N-Konz.-Verläufe aller Versuche mit Fischen über die Zeit. T=24 °C** Die Legende zeigt die Masse des jeweils eingesetzten Fisches.

Am ersten und dritten Tag (ohne Fütterung) war die ausgeschiedene Menge an Ammonium recht ähnlich und schien offenbar linear zu verlaufen. Außerdem kann ein Zusammenhang zwischen der Fischmasse und der Exkretion an Ammonium vermutet werden. Je größer der Fisch, desto mehr Ammonium wird ausgeschieden.

### 5.3 Beurteilung von Fischen und Wasser (TiHo)

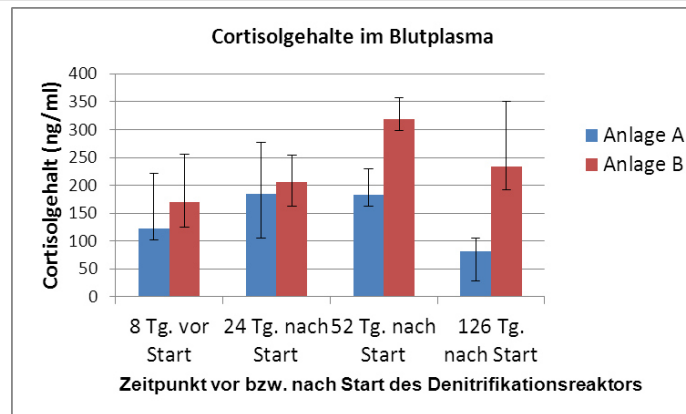
#### 5.3.1 Blutuntersuchungen von Fischen

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 48 Karpfen verwendet, aus jeder Anlage 24 Fische. Sie wiesen im Durchschnitt eine Länge von  $(33 \pm 5)$  cm und eine Masse von  $(1111 \pm 422)$  g auf. Es handelte sich um 35 Spiegelkarpfen und 13 Schuppenkarpfen. Während des gesamten Untersuchungszeitraums traten keine Verluste auf. Die Fische aus Anlage B wiesen 24 d und die Fische aus beiden Anlagen wiesen 52 d nach Inbetriebnahme des Reaktors hgr. verschleimte und geschwollene Kiemen sowie Hautrötungen auf. Dies wurde zurückgeführt auf die nicht optimale Wasserqualität zu diesem Zeitpunkt.

Die Ergebnisse der Blutuntersuchungen liegen – mit Ausnahme der Werte für den Hämokritwert und den Cortisolwert – für den letzten Probennahmezeitpunkt (126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors) noch nicht vor und werden zurzeit noch im Labor bearbeitet. Aus diesem Grund werden nur die Daten der ersten drei Zeitpunkte angegeben.

##### 5.3.1.1 Cortisolgehalte im Blut der Fische

Der Cortisolgehalt im Blut der Fische lag bei den einzelnen untersuchten Tieren zwischen (60 und 465) ng/mL. An den ersten beiden Untersuchungszeitpunkten (8 d vor Inbetriebnahme des Reaktors und 24 d nach Inbetriebnahme) waren keine statistisch signifikanten Unterschiede im Cortisolgehalt zwischen den Fischen aus beiden Anlagen zu erkennen. An den Tagen 52 und 126 nach Inbetriebnahme des Reaktors konnte im Blut der Fische aus Anlage B (ohne MDR) ein deutlich höherer Cortisolgehalt nachgewiesen werden. Dies deutete auf eine erhöhte Stressbelastung der Fische in dieser Anlage hin.



**Abb. 32: Cortisolgehalte im Blutplasma von Karpfen aus beiden Anlagen. Angabe von Medianen u. Quartilen der Gehalte in ng /mL Cortisol, Blut von jeweils 6 Karpfen.**

### 5.3.1.2 Hämatokritwerte im Blut der Fische

Die gemessenen Hämatokritwerte lagen im Mittel zwischen 51,8 und 58,5 %. Dabei waren die individuellen Schwankungen zwischen einzelnen untersuchten Fischen teilweise groß. Ein statistisch signifikanter Unterschied der Werte ließ sich weder zwischen den einzelnen Probenahmezeiten innerhalb derselben Gruppe noch zwischen den Gruppen erkennen.

**Tab. 13: Hämatokritwerte im Blut der Karpfen aus beiden Anlagen. Angaben: Mittelw. u. Standardabw. in Volumenanteil  $\phi$  in % von jeweils 6 Karpfen (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

	Anlage A	Anlage B
8 d vor Inbetriebnahmen des Reaktors	51,83±7,39	58,50±8,92
24 d nach Inbetriebnahme des Reaktors	58,50±11,79	58,00±8,37
52 d nach Inbetriebnahme des Reaktors	52,83±9,45	54,83±8,33
126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors	56,33±5,16	55,83±13,14

### 5.3.1.3 Gesamteiweiß, Glucose, Calcium, Magnesium, Natrium, Kalium und Laktatgehalte im Blut der Fische

Die Mittelwerte und Standardabweichungen der ermittelten Werte sind in Tab. 14 dargestellt. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Werten der beiden untersuchten Fischgruppen ließ sich für keinen der gemessenen Parameter erkennen.

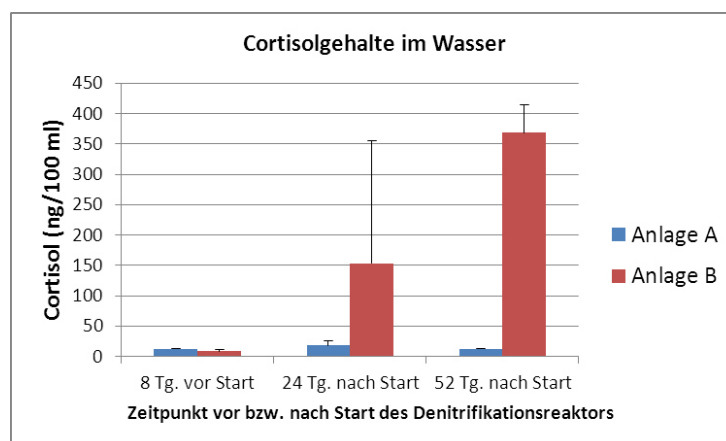
**Tab. 14: Ergebnisse Blutuntersuchung der Karpfen aus beiden Anlagen (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR) („Eiweiß“ = Gesamteiweiß)**

Zeitpunkt bez. Inbetriebnahme MDR	Anlage	Eiweiß g/L	Glucose mmol/L	Calcium mmol/L	Magnesium mmol/L	Natrium mmol/L	Kalium mmol/L	Laktat mmol/L
8 d vor	A	32±2	5,79±2,18	2,63±0,34	1,91±0,18	137±2	1,03±0,06	3,64±0,59
8 d vor	B	31±2	5,29±1,71	2,58±0,26	2,03±0,31	138±1	1,07±0,11	3,88±0,39
24 d nach	A	34±3	6,73±1,94	2,85±0,24	2,24±0,51	139±3	0,87±0,06	4,58±2,21
24 d nach	B	31±2	6,18±2,14	2,81±0,20	1,97±0,33	139±2	0,99±0,13	4,82±1,33
52 d nach	A	35±3	5,71±2,08	2,82±0,26	1,67±0,90	138±2	0,86±0,01	3,49±0,83
52 d nach	B	33±2	5,72±1,02	3,07±0,26	2,04±0,18	140±2	0,88±0,10	4,65±1,06

### 5.3.2 Wasseruntersuchungen

#### 5.3.2.1 Cortisolgehalte im Wasser

Die Messung der Cortisolgehalte im Wasser ergab für die Probennahme vor Inbetriebnahme des Reaktors für beide Anlagen vergleichbare, niedrige Werte zwischen (8,8 u. 12,2) ng je 100 mL Wasser (s. Abb. 33). Einen Monat nach Inbetriebnahme waren die Cortisolgehalte im Wasser der Anlage B (ohne MDR) deutlich angestiegen, jedoch wichen die Gehalte in den unterschiedlichen Abschnitten der Anlage stark voneinander ab, weswegen keine statistisch signifikante Änderung verzeichnet wurde. Zwei Monate nach Inbetriebnahme des Reaktors dagegen lagen die Cortisolwerte in der Anlage A (mit MDR) noch immer in einem sehr niedrigen Bereich (i.M. 12,5 ng / 100 mL Wasser), während in allen Bereichen der Anlage B (ohne MDR) signifikant höhere Werte ermittelt wurden (i.M. 368,4 ng / 100 mL Wasser). Das entspricht in etwa einer 30fach höheren Cortisolkonzentration in Anlage B im Vergleich zur Anlage A. Die Tendenz der Messungen korrelierte mit den Ergebnissen der Blutuntersuchungen. Anhand der Wasseruntersuchungen konnte nochmals sehr deutlich dargestellt werden, dass die Stressbelastung der Fische in der Anlage A mit MDR, deutlich geringer zu sein schien als in der Vergleichsanlage B ohne MDR. Man muss davon ausgehen, dass sich eine deutlich geringere Stressbelastung positiv auf die Fischgesundheit auswirkt und dass somit der Membran-Denitrifikationsreaktor (MDR) förderlich für das Tierwohl der in der Anlage gehaltenen Fische sein kann.



**Abb. 33: Cortisolgehalte im Wasser in ng/100 mL, Anlage A u. B. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. der Wasserproben aus Fischhaltungs-, Filter- u. Lamellenabscheider (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

#### 5.3.2.2 Ergebnisse der kulturellen Untersuchungen zur Bakterienzusammensetzung im Wasser

##### Gesamtkeimzahlbestimmung:

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl ergab in beiden Anlagen bis 52 d nach Inbetriebnahme des Reaktors eine Erhöhung der Bakterienzahl im Verlauf der Zeit. Diese Erhöhung konnte sowohl im Wasser der Fischhaltungsbecken, als auch im Wasser des Filterbeckens sowie des Lamellenabscheiders beobachtet werden. Der Vergleich der beiden Anlagen ergab ab 24 d nach Inbetriebnahme des Reaktors eine statistisch signifikant höhere Bakterienzahl in Anlage B (ohne MDR, s. Abb. 34). Eine deutliche Erniedrigung der Bakterienzahl in den Wasserproben, die 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors entnommen wurden, wurde im Wasser beider Anlagen nachgewiesen.

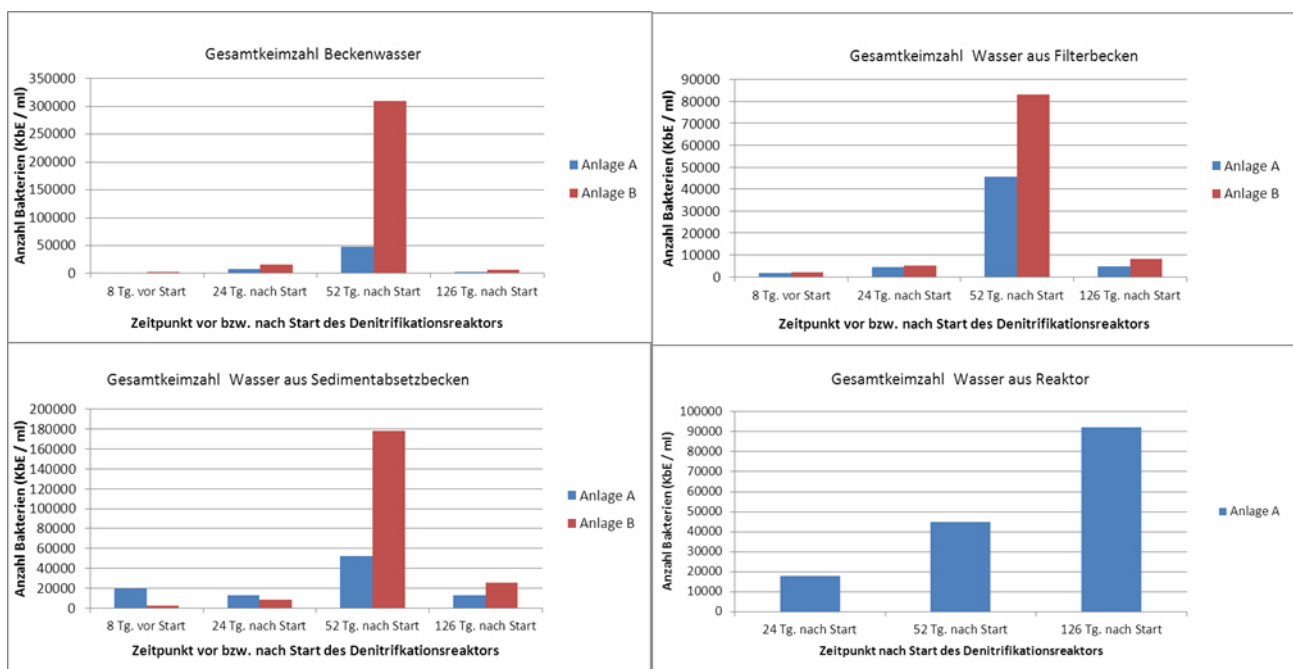
Dies schien mit einer Reduktion der Fütterung der Fische nach den Untersuchungen 52 d nach Start des Reaktors zusammenzuhängen und spiegelte sich nicht nur im Wasser, sondern auch in den mikrobiologischen Untersuchungen der Fische wider (s.u.). Da bei der Untersuchung 52 d nach Start des MDR alle Fische deutliche Kiemenveränderungen und teilweise auch Hautrötungen



aufwiesen und da die Ammoniumwerte in beiden Anlagen nach der Fütterung zu diesem Zeitpunkt erhöht waren, wurde ab diesem Zeitpunkt die Futtermenge reduziert.

Trotz der insgesamt nachgewiesenen Reduktion des Bakteriengehaltes im Wasser 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors konnte ein erhöhter Keimgehalt in den Wasserproben aus Anlage B detektiert werden. Die Ergebnisse sprachen insgesamt für eine deutlich stärkere bakterielle Belastung des Prozesswassers aus der Anlage ohne MDR. Sie zeigten gleichzeitig auch, dass die Nährstoffzufuhr in Form von Futtermenge und damit verbunden die Kotmenge in einem Aquakultursystem entscheidend verantwortlich für die bakterielle Belastung des Systems ist.

Im Wasser, das aus dem Reaktor entnommen wurde, wurden im Verlauf der Zeit jeweils höhere Bakteriengehalte nachgewiesen. Dies erscheint für ein neu einlaufendes System üblich zu sein und entspricht normalen Verhältnissen.



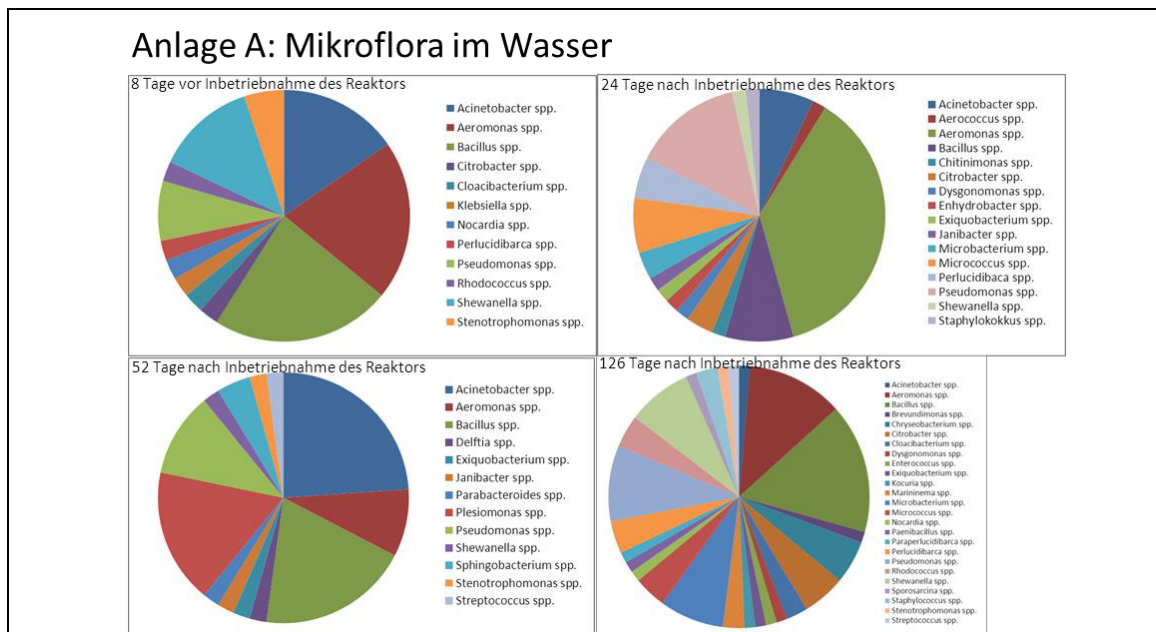
**Abb. 34: Entwicklung der Gesamtkeimzahl im Wasser Fischhaltungs-, Filter-, Sedimentabsetzbecken (=Lamellenabscheider) u. des Reaktors. Angaben von Werten jeder einzelnen Wasserprobe (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

### 5.3.2.3 Zusammensetzung der Mikroflora im Wasser

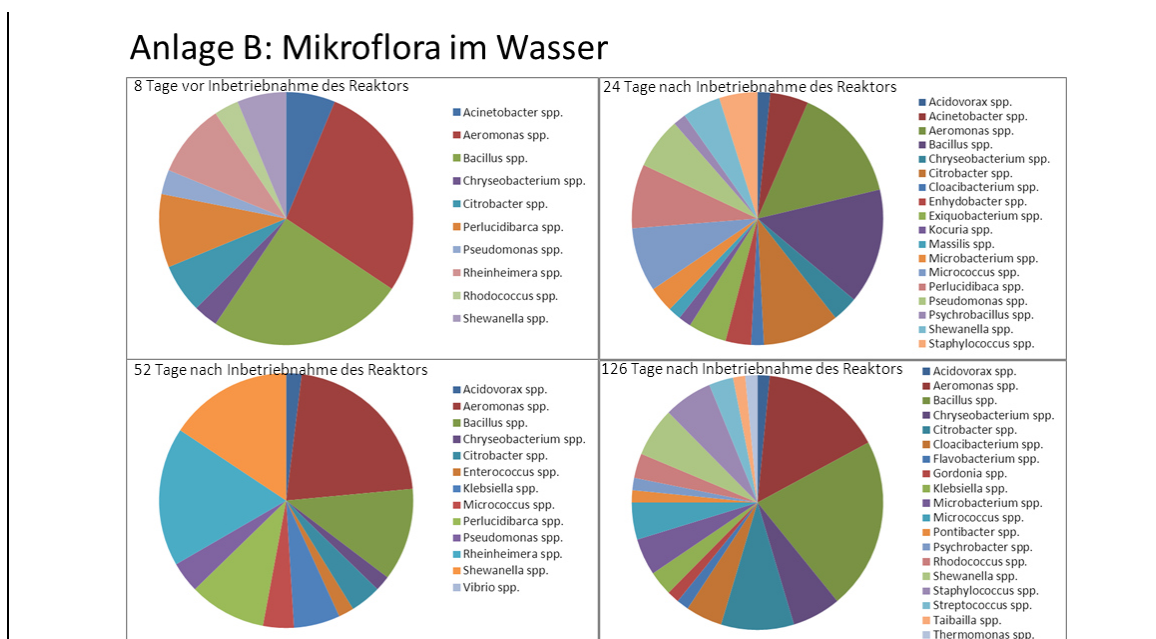
Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen wurden für das Wasser aus den Fischhaltungsbecken, aus den Filterbecken und aus dem Lamellenabscheider zusammengefasst. Insgesamt wurden bei den Untersuchungen der bakteriellen Mikroflora im Wasser beider Anlagen 110 unterschiedliche Bakterienspezies identifiziert. Bei dem Großteil dieser Bakterienspezies handelte es sich um ubiquitär im Wasser vorkommende Keime, wie beispielsweise *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. und *Shewanella* spp. Auffällig war in beiden Anlagen bereits vor Inbetriebnahme des Reaktors der große Anteil an *Bacillus* spp. an der aquatischen Mikroflora. Diese Bakterien lassen sich üblicherweise nicht in sehr hohen Gehalten aus Wasserproben isolieren. Da die Gehalte jedoch für beide Anlagen vom Beginn der Untersuchungen an ähnlich waren und sich im Verlauf der weiteren Untersuchungen nicht signifikant änderten, kann davon ausgegangen werden, dass es sich hierbei um für beide Anlagen gleich typische Bakterien handelte, die möglicherweise durch den Fischbesatz in die Anlage eingeschleppt wurden (s. Abb. 35, Abb. 36).

In beiden Anlagen erhöhte sich die Anzahl der nachgewiesenen Bakterien im Verlauf der Untersuchungen tendenziell. Insbesondere bei der zweiten Probennahme 24 d nach Inbetriebnahme des Reaktors konnten im Vergleich zu den Proben vor Inbetriebnahme mehr Bakterienspezies

nachgewiesen werden. An Tag 52 nach Inbetriebnahme des Reaktors wurden in beiden Anlagen weniger Spezies isoliert. Zu diesem Zeitpunkt war ebenfalls die Gesamtkeimzahl deutlich angestiegen und die Wasserqualität war generell suboptimal. Dies schien Einfluss auf die gesamte bakterielle Mikroflora genommen zu haben. Wie bereits erwähnt, kann vermutet werden, dass durch die anschließend erfolgte Reduktion der Futtermenge die Wasserqualität verbessert und damit auch die Gesamtkeimzahl gesenkt werden konnte. Dies scheint auch einen Einfluss auf die bakterielle Gemeinschaft im Wasserkörper selber gehabt zu haben, da bei der Probennahme 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors eine deutlich höhere Diversität der Bakterienspezies nachgewiesen werden konnte. Eine höhere bakterielle Diversität kann sich insofern positiv auf ein Aquakultursystem und die darin gehaltenen Fische auswirken, als dass durch die Besetzung von diversen unterschiedlichen Nischen mit nicht obligat pathogenen Bakterien die Etablierung von pathogenen Keimen erschwert wird.



**Abb. 35: Proz. Verteilung Bakterienspezies identifiziert in Wasserproben aus Anlage A (mit MDR)**



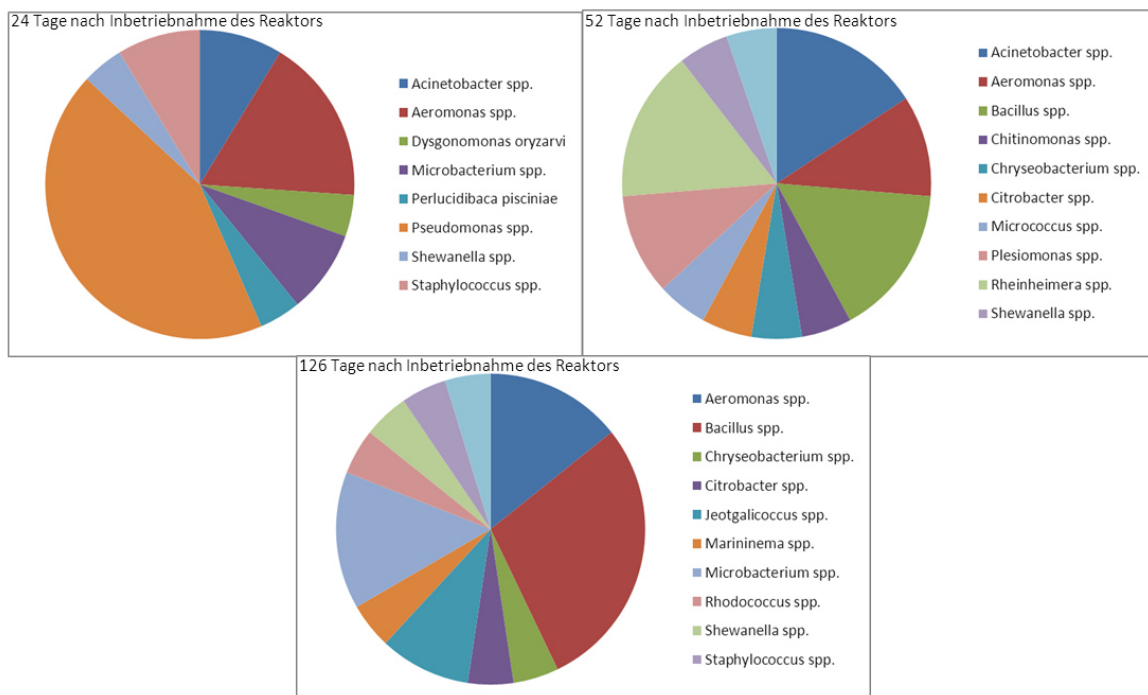
**Abb. 36: Proz. Verteilung Bakterienspezies identifiziert in Wasserproben aus Anlage B (ohne MDR)**

Unter den nachgewiesenen Bakterienspezies konnten auch einige Keime identifiziert werden, die unter Umständen zu Krankheitssymptomen bei Fischen führen können. Prinzipiell sind zwar auch fast alle ubiquitär vorkommende Bakterien in der Lage, bei nicht optimalen Haltungsbedingungen oder schlechter Kondition der Fische zu Erkrankungen zu führen, jedoch sind insbesondere *Vibrio* spp., *Staphylococcus* spp. und *Streptococcus* spp. im Süßwasser als potentiell pathogen zu bewerten. In beiden Anlagen konnten geringe Gehalte an Bakterien dieser Spezies nachgewiesen werden, jedoch waren tendenziell mehr Isolate der genannten Spezies in Anlage B (ohne MDR) zu finden. Vergleichbare Ergebnisse konnten für den Gehalt an sogenannten „Schmutzkeimen“, die für eine erhöhte organische Belastung des Wassers sprechen, wie zum Beispiel *Citrobacter* spp., *Enterococcus* spp. und *Klebsiella* spp. erzielt werden.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich die Mikroflora in beiden Anlagen in großen Teilen ähnelte, jedoch bei Betrachtung spezieller Spezies auch Unterschiede bestanden. Tendenziell schien es so, dass in der Anlage A (mit MDR) insgesamt weniger für Fische pathogene Bakterienspezies und weniger Schmutzkeime im Wasser vorhanden waren.

### **Zusammensetzung der Mikroflora im Denitrifikationsreaktor (MDR)**

Es wurde 24 d, 52 d und 126 d nach Inbetriebnahme des MDR Wasserproben aus dem Reaktor mikrobiologisch untersucht. Dabei konnte eine Erhöhung der Anzahl der nachgewiesenen Bakterien festgestellt werden, die für eine Etablierung der Mikroflora innerhalb des Reaktors spricht (s. Abb. 37). Zum großen Teil wurde Bakterienspezies nachgewiesen, die auch im Wasser der Fischhaltungsbecken bzw. im Filterbecken und im Lamellenabscheider identifiziert wurden. Teilweise konnten für den Reaktor spezifische Spezies, wie *Micrococcus* spp. oder *Microbacterium* spp. isoliert werden.



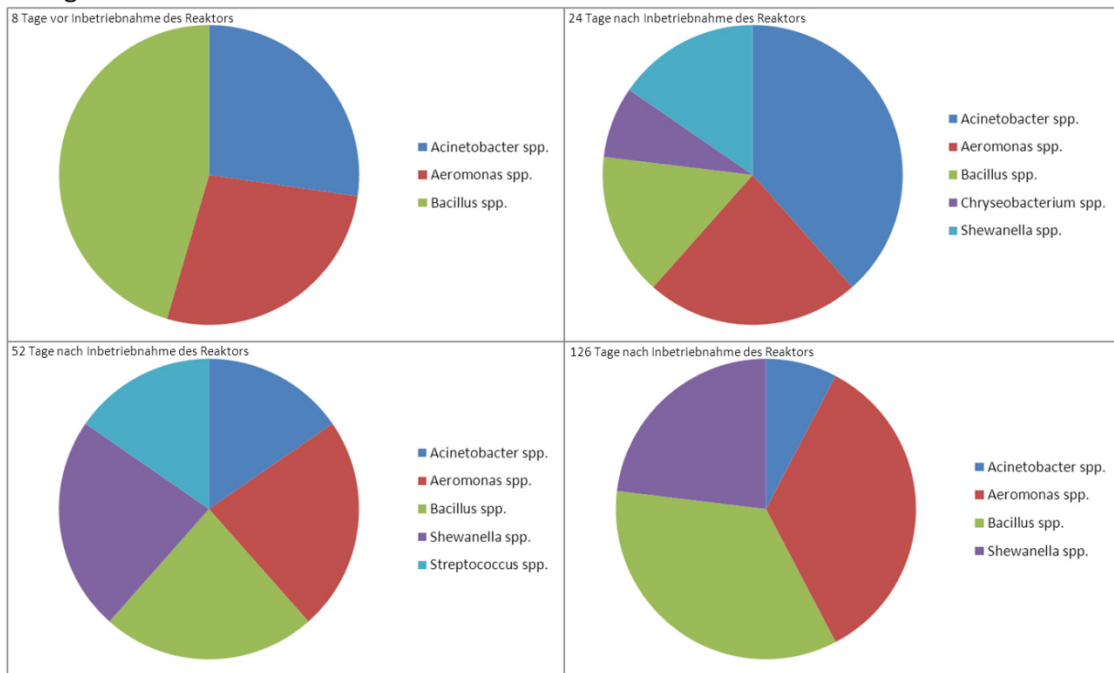
**Abb. 37: Proz. Verteilung Bakterienspezies, in Wasserproben aus Reaktor identifiziert (Anl. A mit MDR)**

#### **5.3.2.4 Zusammensetzung der Mikroflora in Biofilmen von Beckenoberflächen**

In beiden Anlagen konnten bei der Probennahme vor Inbetriebnahme des Reaktors nur drei Bakterienspezies aus den Biofilmen isoliert werden (s. Abb. 38). Dies entspricht den üblichen Verhältnissen in aquatischen Systemen. Es können sich weniger Bakterienspezies in einem Biofilm etablieren als frei im Wasser vorhanden sind. Auffällig war erneut, dass in beiden Anlagen *Bacillus* spp. in etwa die Hälfte der isolierten Bakterienspezies ausmachte. Diese Gegebenheit spiegelte sich

auch, wie bereits beschrieben, im Wasser der Anlagen wieder. Die bakterielle Diversität erhöhte sich im Verlauf der Zeit. In Anlage A (mit MDR) konnten sich insbesondere *Chryseobacterium* spp. und *Shewanella* spp. ebenfalls ubiquitäre Wasserkeime, in den Biofilmen etablieren. Zudem konnten bei der Probennahme 52 d nach Inbetriebnahme des MDR *Streptococcus* spp. nachgewiesen werden. Sie können pathogen für Fische sein. Bei diesem Probennahmezeitpunkt handelte es sich um den Zeitraum, zu dem gesundheitliche Probleme bei den Fischen auftraten und die chemischen Wasserwerte ebenfalls nicht optimal waren. Als Reaktion wurde, wie bereits beschrieben, die Fütterung reduziert. In Anlage B konnten ab 24 d nach Inbetriebnahme des MDR in Anlage A sogenannte Schmutzkeime nachgewiesen werden (*Citrobacter* spp, *Enterobacter* spp.). In Biofilmen der Anlage A waren sie nie zu identifizieren. Dies spricht für bessere hygienische Verhältnisse und damit für eine bessere Umwelt für die gehaltenen Fische in Anlage A. Auch in Anlage B konnten bei der Probennahme 52 d nach Inbetriebnahme des Reaktors *Streptococcus* spp. nachgewiesen werden. Auch in diesem Fall schien das Vorliegen dieser für Fische pathogenen Bakterien auf die generell nicht optimalen Verhältnisse in beiden Anlagen zu diesem Zeitpunkt hinzudeuten.

Anlage A: Biofilm auf Beckenoberflächen



Anlage B: Biofilm auf Beckenoberflächen

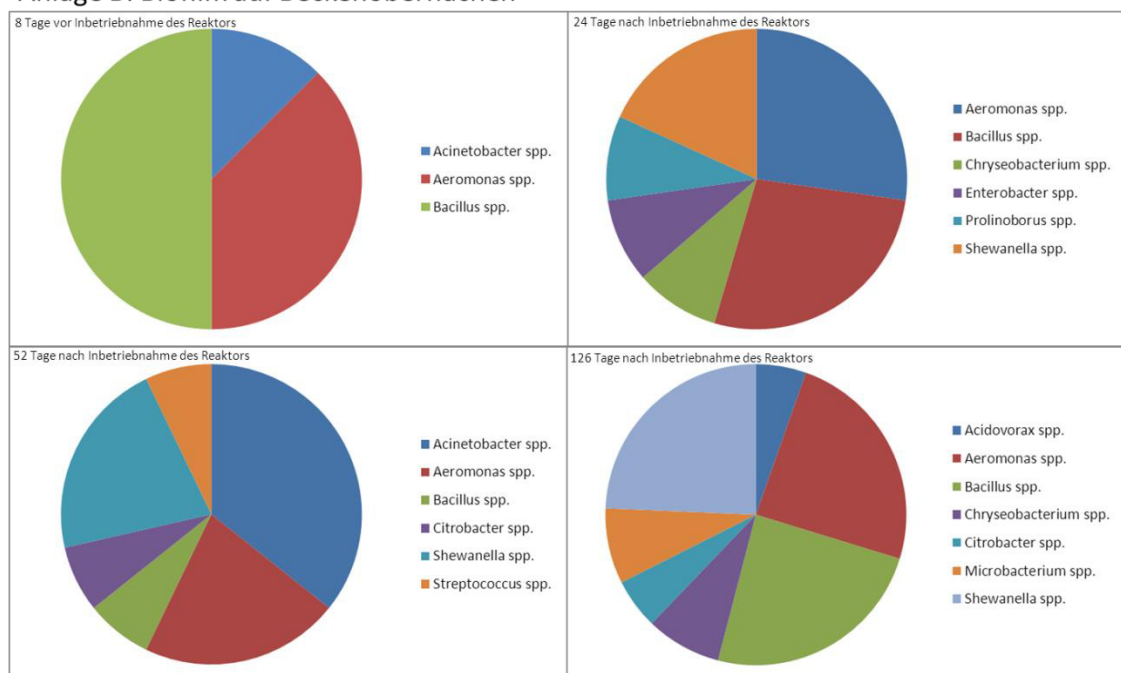


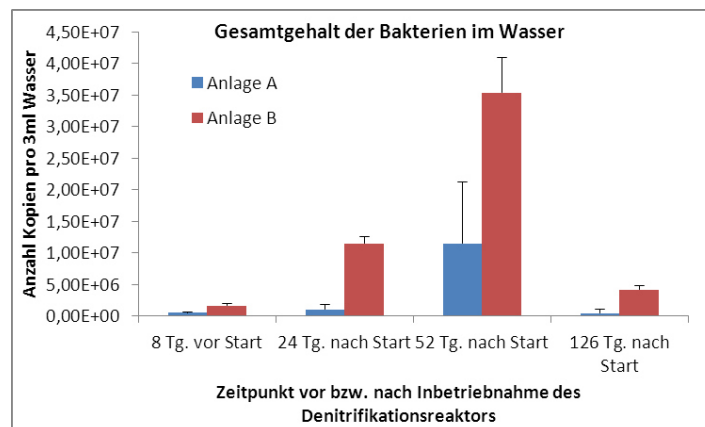
Abb. 38: Proz. Verteilung Bakterienspezies, aus Biofilmen in Anlagen A u. B identifiziert (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)

### 5.3.2.5 Ergebnisse der molekularbiologischen Methoden auf die Bakterienzusammensetzung im Wasser

#### Ergebnisse der Untersuchungen auf spezifische Bakterien mittels Real Time PCR

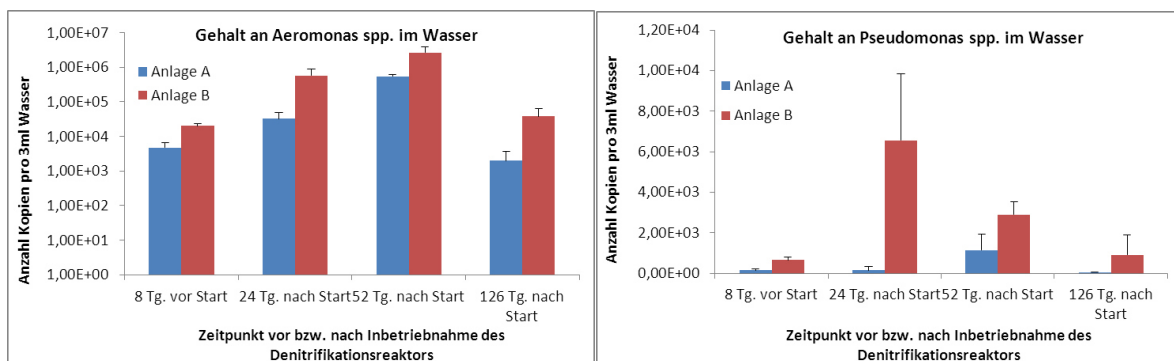
Der Gesamtgehalt der Bakterien in den Wasserproben beider Anlagen war vergleichbar mit den Ergebnissen der kulturellen Untersuchungen auf die Gesamtkeimzahl (s.o.). Auch bei den molekularbiologischen Untersuchungen wurden insgesamt ab 24 d nach Inbetriebnahme des MDR deutlich mehr Bakterien in Anlage B (ohne MDR) nachgewiesen (s. Abb. 39). Insgesamt war die Anzahl der nachgewiesenen Bakterien deutlich höher als die Anzahl der kulturell nachgewiesenen Keime. Dies hängt damit zusammen, dass nicht alle Bakterien auf Agarplatten kultiviert werden können und somit ein Teil der Mikroflora kulturell nicht erfasst werden kann. Molekularbiologisch werden theoretisch alle Bakterien detektiert.

Auch die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten den deutlichen Rückgang der Bakteriengesamtzahl 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors, der, wie bereits mehrfach erwähnt, vermutlich auf eine Reduktion der Futterration zurückzuführen ist.



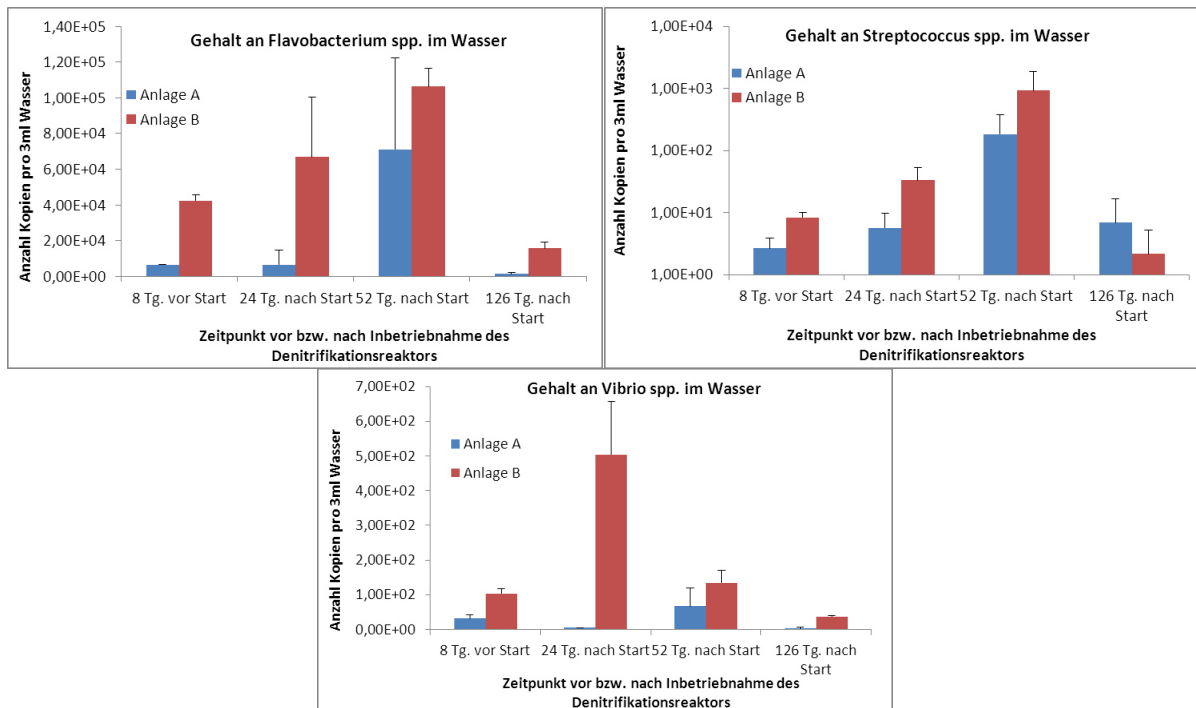
**Abb. 39:** Gesamtgehalt molekularbiologisch nachgewiesener Bakterien beider Anlagen je 3 mL Wasser. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. der Gehalte in Wasserproben aus Fischhaltungs-, Filter- u. Lamellenabscheider. (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)

Untersucht wurde speziell auf die im Wasser ubiquitär und häufig in hohen Gehalten vorkommenden Bakterienspezies *Aeromonas* spp. und *Pseudomonas* spp. Der Gehalt an beiden Spezies, insbesondere der Gehalt an *Pseudomonas* war in Anlage B zu allen Zeitpunkten höher als in Anlage A (s. Abb. 40). Dies korrelierte mit dem Gesamtgehalt an Bakterien im Wasser.



**Abb. 40:** Gehalt molekularbiologisch nachgewiesener, ubiquitär im Wasser vorkommender Bakterienspezies *Aeromonas* spp. u. *Pseudomonas* spp. in beiden Anlagen je 3 mL Wasser. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. der Gehalte in Wasserproben aus Fischhaltungs-, Filter- u. Lamellenabscheider. (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)

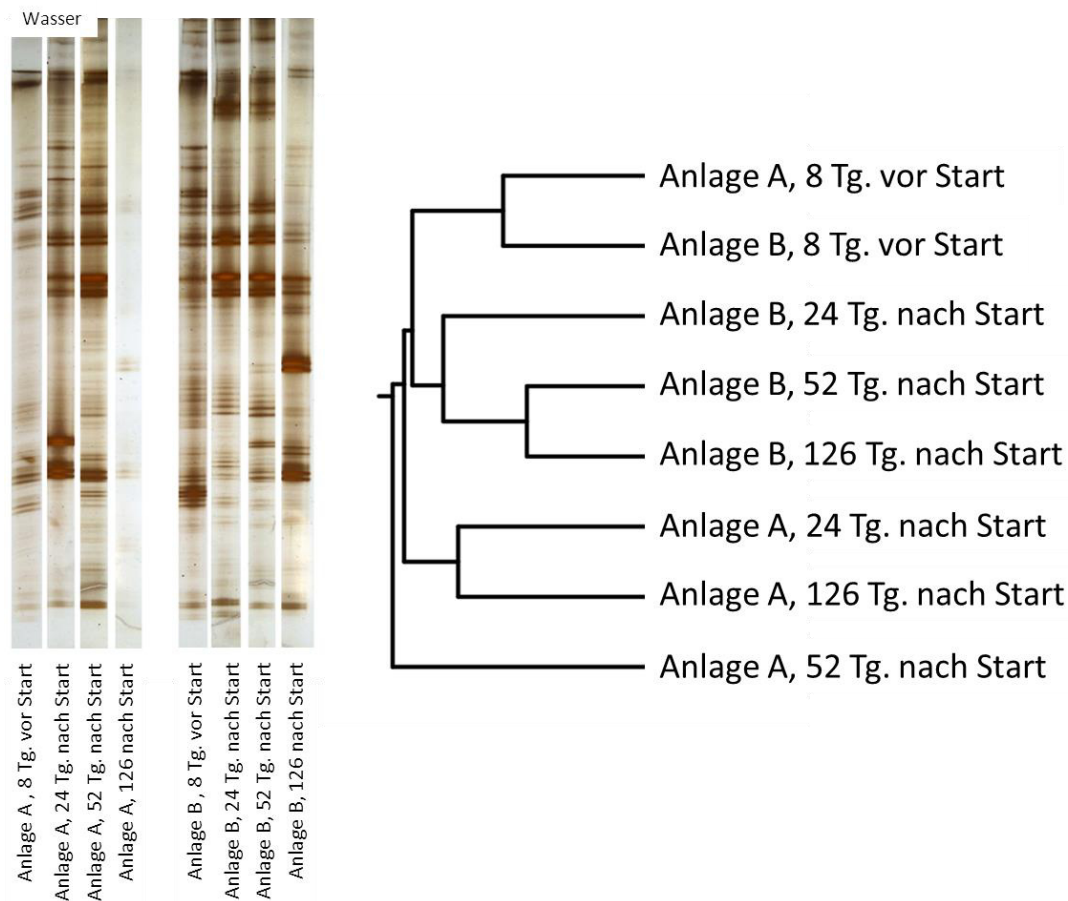
Die molekularbiologische Untersuchung auf für Fische potentiell pathogene Bakterien (*Flavobacterium* spp., *Streptococcus* spp. u. *Vibrio* spp.) ergab für die meisten untersuchten Bakterien und Probenzeitpunkte erneut einen höheren Bakteriengehalt in Anlage B, ohne MDR (s. Abb. 41). Die einzige Ausnahme ist die Untersuchung 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors. Zu diesem Zeitpunkt wurden mehr Streptokokken in Anlage A detektiert. Insgesamt deuteten allerdings auch diese Untersuchungsergebnisse darauf hin, dass die mikrobiologische Qualität des Wassers aus Anlage A für die Fischgesundheit besser zu sein schien als in Anlage B.



**Abb. 41: Gehalt molekularbiologisch nachgewiesener, für Fische fakultativ pathogener Bakterienspezies *Flavobacterium* spp., *Streptococcus* spp. u. *Vibrio* spp. in beiden Anlagen je 3 mL Wasser. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. der Gehalte in Wasserproben aus Fischhaltungs-, Filter- und Lamellenabscheider (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

### Ergebnisse der Untersuchungen zur Verteilung der Bakterien im Wasser der Fischhaltungsbecken mittels DGGE

Die Untersuchung mittels DGGE ergab in beiden Anlagen eine sehr ähnliche Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora vor Inbetriebnahme des Reaktors (s. Abb. 42). Die Proben des Wassers aus beiden Anlagen bildeten ein gemeinsames Cluster im Dendrogramm. Somit war eine vergleichbare Ausgangslage in beiden Anlagen gegeben, als der Reaktor in Betrieb genommen wurde. Bereits 24 d nach Inbetriebnahme und während des gesamten weiteren Zeitverlaufes, war die bakterielle Zusammensetzung in beiden Anlagen unterschiedlich. Sowohl die Proben aus Anlage A und Anlage B bildeten je ein eigenes Cluster. Daraus konnte geschlossen werden, dass sich in beiden Anlagen nach Start des MDR die Mikroflora im Wasser veränderte, jedoch in beiden Anlagen auf unterschiedliche Weise. Die Wasserproben der Vergleichsanlage B schienen dabei enger mit den Ausgangsproben vor Inbetriebnahme des Reaktors verwandt zu sein als die Proben der Anlage A.



**Abb. 42: DGGE Gel Analyse u. auf Grundlage des DGGE Bandenmusters erstelltes Dendrogramm. Gezeigt sind Wasserproben aus Fischhaltungsbecken beider Anlagen zu unterschiedlichen Probenahme-Zeitpunkten vor bzw. n. Inbetriebnahme des MDR (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

### 5.3.3 Bakteriologische Untersuchungen der Fische

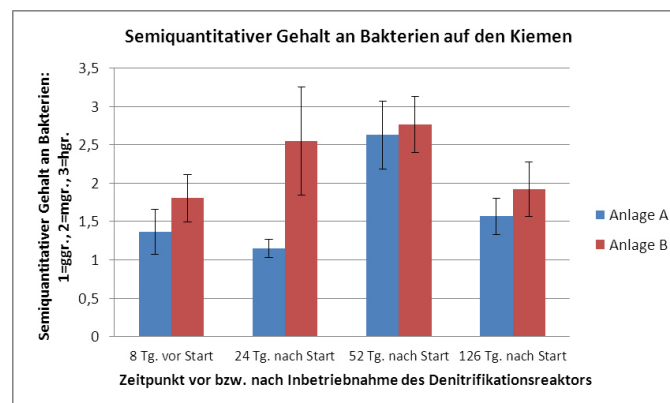
Gezeigt werden die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen der Kiemen, die kulturell und molekularbiologisch durchgeführt wurden. Da die bakteriologischen Untersuchungen der Haut zu vergleichbaren Ergebnissen führten und da die Belastung der Kiemen für die Gesundheit der Fische von entscheidenderer Bedeutung ist, wurden die Ergebnisse der Hautuntersuchungen nicht in diesen Ergebnisteil einbezogen. Zusätzlich zu den Kiemenuntersuchungen werden die Ergebnisse der kulturell bakteriologischen Untersuchungen der inneren Organe von jeweils 3 Fischen je Anlage beschrieben.

#### 5.3.3.1 Ergebnisse der kulturell bakteriologischen Untersuchungen der Fische

##### Semiquantitativer Gehalt an Bakterien auf den Kiemen

Der Gehalt der kulturell nachgewiesenen Bakterien auf den Kiemen wurde semiquantitativ bestimmt, indem die Menge der gewachsenen Kolonien in „geringgradig“, „mittelgradig“ und „hochgradig“ eingestuft wurde. Bei der ersten Probenahme 8 d vor Inbetriebnahme des Reaktors konnte in Anlage A und B ein ggr.-migr. Bakteriengehalt auf den Kiemen festgestellt werden (s. Abb. 43). 24 d nach Inbetriebnahme des Reaktors waren auf den Kiemen der Karpfen aus Anlage A ggr. Bakterien vorhanden, während von den Kiemen der Fische aus Anlage B hgr. Bakterien kultiviert werden konnten. Dies spiegelte sich auch im klinischen Bild der Karpfen wider. Die Fische aus Anlage B (ohne MDR) hatten zu diesem Zeitpunkt hgr. verschleimte und geschwollene Kiemen, während die Kiemen der Fische aus Anlage A (mit MDR) keine Veränderungen aufwiesen. Bei der Probenahme 52 d nach Inbetriebnahme des Reaktors, dem Zeitpunkt an dem in beiden Anlagen

Probleme mit der Wasserqualität auftraten, konnten von den Kiemen der Fische aus beiden Anlagen hgr. Bakterien isoliert werden. Auch zu diesem Zeitpunkt korrelierte das klinische Bild mit den Ergebnissen der mikrobiologischen Untersuchungen. Alle Fische aus beiden Anlagen wiesen hgr. verschleimte und geschwollene Kiemen auf. Nach Reduktion der Futtermenge konnten in beiden Anlagen 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors ein mgr. Bakteriengehalt auf den Kiemen nachgewiesen werden. Die Untersuchungsergebnisse zeigten, dass die Wasserqualität, insbesondere auch die bakteriologische Belastung des Wassers, die mit den Ergebnissen der Kiemenuntersuchungen weitgehend korreliert, einen enormen Einfluss auf die Besiedlung der Kiemen und damit auf die Fischgesundheit hatte.



**Abb. 43: Semiquantitativer Gehalt an Bakterien auf Kiemen von je 6 Fischen aus beiden Anlagen zu unterschiedlichen Untersuchungszeiten. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. von jeweils 6 Fischen je Anlage u. Zeitpunkt (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

### 5.3.3.2 Zusammensetzung der Mikroflora auf den Kiemen

Die Ergebnisse der bakteriologischen Untersuchungen der Kiemen wurden für jeweils 6 Karpfen je Anlage und Zeitpunkt zusammengefasst. Insgesamt wurden bei den Untersuchungen der bakteriellen Mikroflora auf den Kiemen der Fische beider Anlagen 79 unterschiedliche Bakterienspezies identifiziert (s. Abb. 44). Wie auch in den Wasserproben handelte es sich auch bei den von den Kiemen isolierten Bakterien zum Großteil um Bakterienspezies, die ubiquitär im Wasser vorkommen, wie beispielsweise *Aeromonas* spp., *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. und *Shewanella* spp. Auch auf den Kiemen war der große Anteil an *Bacillus* spp. auffällig. Da die Besiedlung der Schleimhäute der Fische mit den im Wasser vorkommenden Bakterien erfolgt und es in der Regel zu einer zumindest teilweisen Korrelation von aquatischer Mikroflora und Mikroflora auf den Schleimhäuten kommt, war dieser Befund zu erwarten.

An Tag 52 nach Inbetriebnahme des Reaktors wurden in beiden Anlagen von den Kiemen der Fische Bakterien aus nur wenigen Spezies isoliert. Dies kann ein Hinweis darauf sein, dass sich unter den beschriebenen Wasserbedingungen bestimmte Bakterienspezies verstärkt vermehren und in der Gemeinschaft etablieren konnten, während andere Spezies verdrängt wurden. In der Folge kam es auch auf den Kiemen zu einem Rückgang der Diversität der Bakterien und damit zu einer größeren Wahrscheinlichkeit, dass sich bestimmte pathogene Bakterien aufgrund frei werdender ökologischer Nischen etablieren könnten. Bei der Probennahme 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors war die Diversität der Bakterien wieder deutlich erhöht, was mit der Reduktion der Futtermenge in Korrelation zu stehen schien.

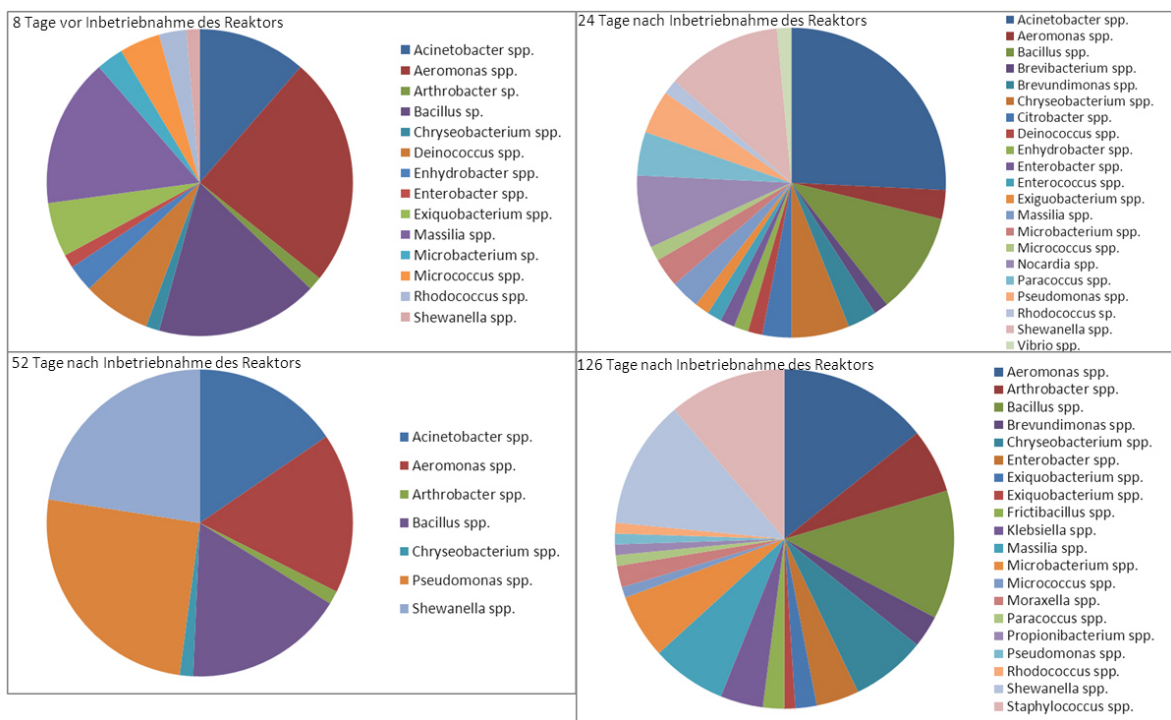
Unter den auf den Kiemen nachgewiesenen Bakterienspezies konnten, wie in den Wasserproben, auch einige Keime identifiziert werden, die zu Krankheitssymptomen bei Fischen führen können. Insbesondere sind *Vibrio* spp. und *Staphylococcus* spp. im Süßwasser als potentiell pathogen zu bewerten. In beiden Anlagen konnten Bakterien dieser Spezies nachgewiesen werden. Insbesondere bei der Probennahme 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors waren in den Kiemenpro-



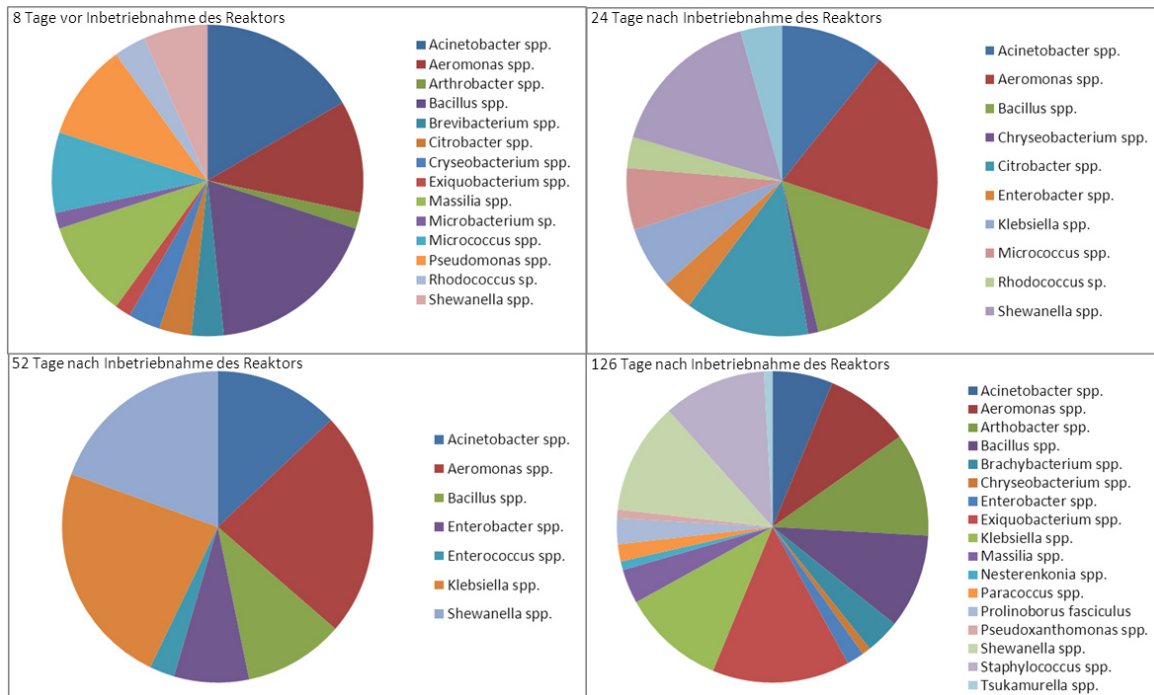
ben der Fische beider Anlagen prozentual relativ hohe Gehalte an Staphylokokken zu finden. Der Gehalt an sogenannten „Schmutzkeimen“, die für eine erhöhte Belastung des Wassers sprechen, wie zum Beispiel *Citrobacter* spp., *Enterococcus* spp. und *Klebsiella* spp. war insgesamt auf den Kiemen der Fische aus Anlage B erhöht. An Tag 24 und Tag 52 nach Inbetriebnahme des Reaktors stellten Schmutzkeime auf den Kiemen der Karpfen aus Anlage B prozentual etwa ein Viertel aller nachgewiesenen Bakterien dar, während der Gehalt an diesen Bakterien auf den Kiemen der Fische aus Anlage A sehr gering war.

Die Ergebnisse zeigten, dass sich, wie auch im Wasser, die Mikroflora auf den Kiemen der Fische in beiden Anlagen in großen Teilen ähnelte, jedoch bei Betrachtung spezieller Spezies auch Unterschiede bestanden. Tendenziell schien es so, als ob in der Anlage mit MDR insgesamt weniger Schmutzkeime im Wasser vorhanden waren. Zwischen den mikrobiologischen Untersuchungen der Wasserproben und der Kiemenproben ergaben sich deutliche Übereinstimmungen.

### Anlage A: Mikroflora auf den Kiemen



## Anlage B: Mikroflora auf den Kiemen



**Abb. 44: Proz. Verteilung Bakterienspezies, in Kiemenproben von Karpfen aus beiden Anlagen identifiziert (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

### 5.3.3.3 Nachweis von Bakterien aus den inneren Organen der Fische

Von jeweils drei Karpfen je Anlage wurden 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors Proben der Leber, Milz und Niere kulturell bakteriologisch untersucht. Bei keinem der untersuchten Fische aus Anlage A konnten Bakterien nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wiesen alle untersuchten Karpfen aus Anlage B einen geringgradigen Bakteriengehalt in den inneren Organen auf. Die dabei isolierten Bakterienspezies sind in Tab. 15 aufgeführt. Zwar können auch von klinisch gesunden Fischen manchmal Bakterien aus den inneren Organen nachgewiesen werden, jedoch spricht ein solcher Nachweis in der Regel in jedem Fall für eine erhöhte Belastung des betroffenen Tieres und kann unter Umständen zu einer Septikämie und damit zu einer generalisierten bakteriellen Infektion führen. Die Ergebnisse zeigten, dass der mikrobiologische Gesundheitsstatus der Fische aus Anlage A (mit MDR), besser zu sein schien, als der Gesundheitsstatus der Fische der Anlage B, ohne Membran-Denitrifikations-Reaktor.

**Tab. 15: Isolierte Bakterienspezies aus den inneren Organen von je drei Karpfen aus Anlage A und Anlage B (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

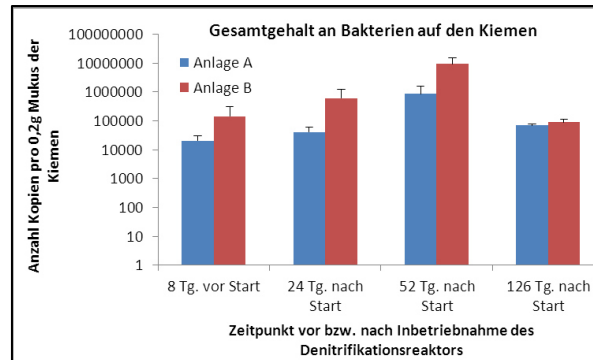
INNERE ORGANE	Fisch 1	Fisch 2	Fisch 3
<b>Anlage A</b>	keine Bakterien nachgewiesen	keine Bakterien nachgewiesen	keine Bakterien nachgewiesen
<b>Anlage B</b>	ggr. Staphylococcus spp.	ggr. Aeromonas spp. ggr. Shewanella spp.	ggr. Aeromonas spp.

### 5.3.3.4 Ergebnisse der molekularbiologischen Untersuchungen der Bakterienzusammensetzung auf den Kiemen der Fische

#### Ergebnisse der Untersuchungen auf spezifische Bakterien mittels Real Time PCR

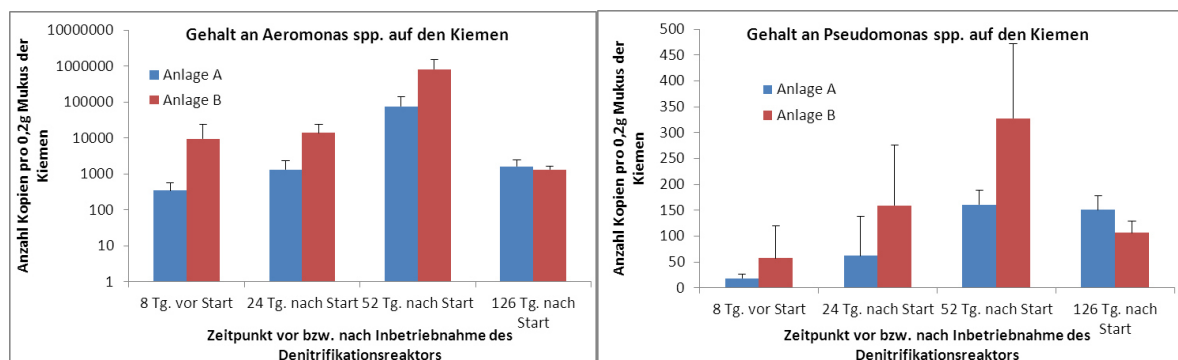
Der Gesamtgehalt der Bakterien in den Kiemenproben von Karpfen aus beiden Anlagen war annähernd vergleichbar mit den Ergebnissen der semiquantitativen kulturellen Untersuchungen auf den Bakteriengehalt (s.o.). Auch bei den molekularbiologischen Untersuchungen wurden insge-

samt mehr Bakterien auf den Kiemen der Fische aus Anlage B nachgewiesen (s. Abb. 45). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten einen Rückgang der Bakteriengesamtzahl auf den Kiemen 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors, der, wie bereits mehrfach erwähnt, vermutlich auf die Futterreduktion zurückzuführen ist.



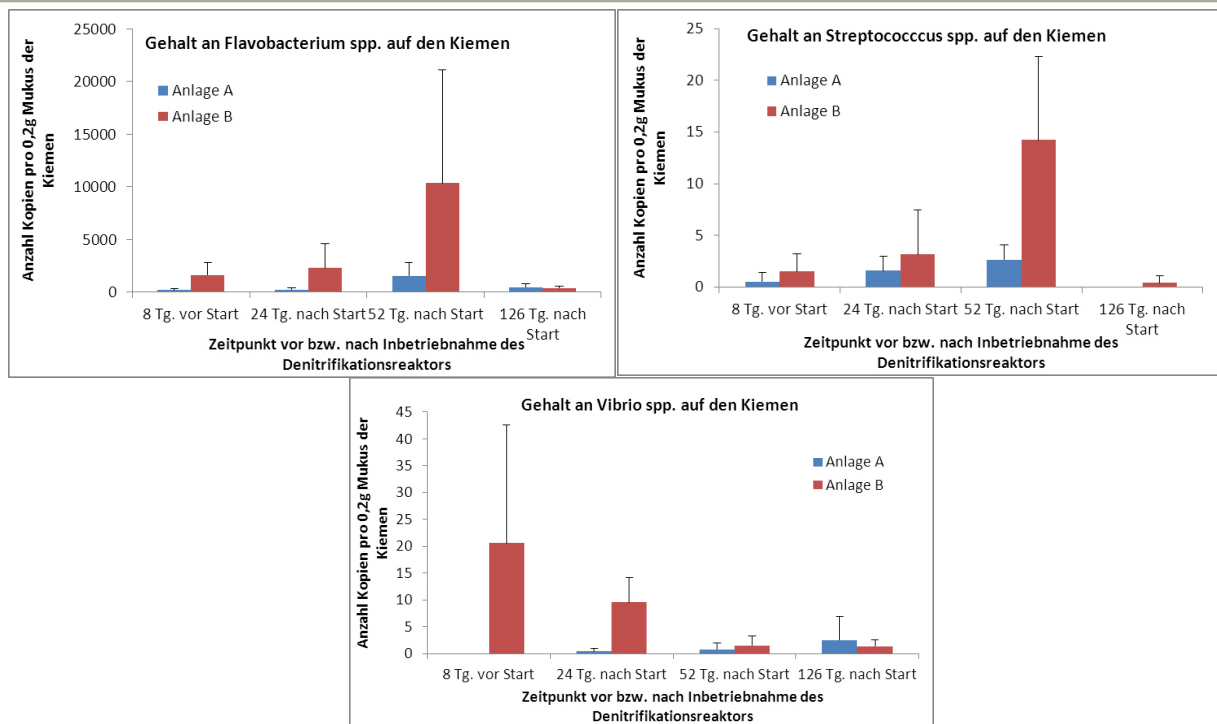
**Abb. 45: Gesamtgehalt molekularbiologisch nachgewiesener Bakterien aus 0,2 mg Kiemen-Mucus, Fische aus beiden Anlagen. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. von jeweils 6 Karpfen je Anlage u. Zeitpunkt. (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

Untersucht wurde ebenfalls auf die im Wasser ubiquitär und häufig in hohen Gehalten vorkommenden Bakterienspezies *Aeromonas* spp. und *Pseudomonas* spp. (s. Abb. 46). Ebenso wie in den Wasserproben (s.o.) war der Gehalt an beiden Spezies und insbesondere der Gehalt an Pseudomonaden auf den Kiemen der Fische aus Anlage B zu allen Zeitpunkten höher als auf den Kiemen der Fische aus Anlage A.



**Abb. 46: Gesamtgehalt molekularbiologisch nachgewiesener, ubiquitär im Wasser vorkommender Bakterienspezies *Aeromonas* spp. u. *Pseudomonas* spp aus 0,2 mg Kiemen-Mucus, Fische aus beiden Anlagen. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. von jeweils 6 Karpfen je Anlage u. Zeitpunkt. (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

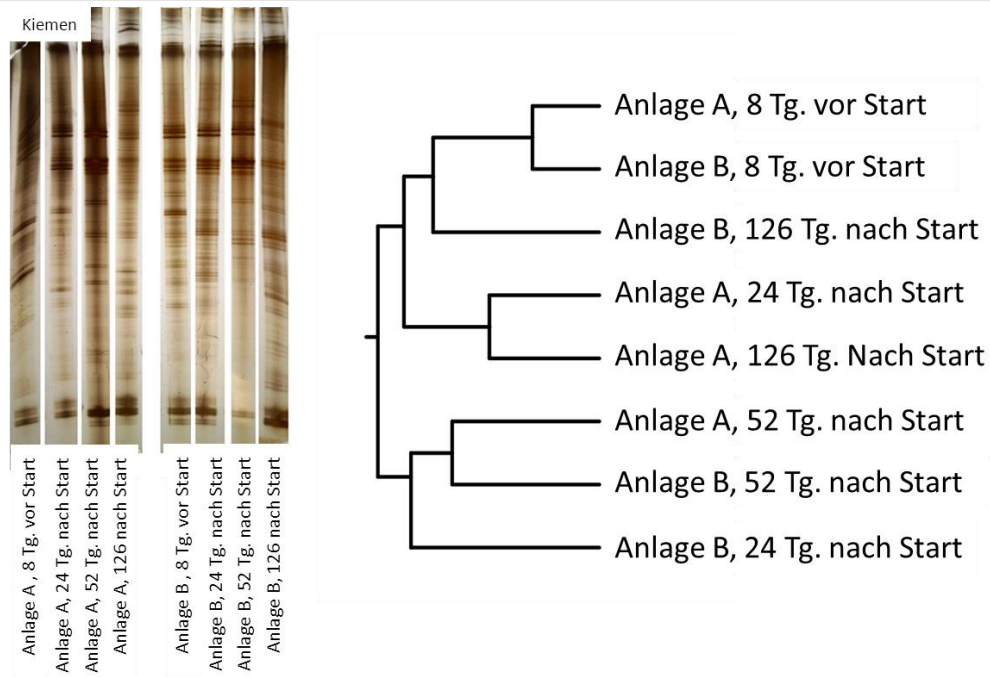
Die molekularbiologische Untersuchung der Kiemen auf für Fische potentiell pathogene Bakterien (*Flavobacterium* spp., *Streptococcus* spp. und *Vibrio* spp.) ergab für die meisten untersuchten Bakterien und Probennahmezeitpunkte erneut einen höheren Gehalt auf den Kiemen der Fische aus Anlage B (s. Abb. 47). Insgesamt schienen auch diese Untersuchungsergebnisse darauf hinzudeuten, dass die mikrobiologische Qualität des Wassers aus Anlage A für die Fischgesundheit positiver zu sein schien als die Qualität des Wassers aus Anlage B.



**Abb. 47: Gesamtgehalt molekularbiologisch nachgewiesener für Fische fakultativ pathogene Bakterienspezies *Flavobacterium* spp., *Streptococcus* spp. u. *Vibrio* spp. aus 0,2 mg Kiemen-Mucus, Fische aus beiden Anlagen. Angaben von Mittelw. u. Standardabw. von jeweils 6 Karpfen je Anlage u. Zeitpunkt (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**

### Ergebnisse der Untersuchungen zur Verteilung der Bakterien auf den Kiemen der Fische mittels DGGE

Die Untersuchung mittels DGGE ergab eine sehr ähnliche Zusammensetzung der bakteriellen Mikroflora auf den Kiemen der Fische beider Anlagen vor Inbetriebnahme des Reaktors (s. Abb. 48). Die Proben der Kiemen der Fische aus beiden Anlagen bildeten ein gemeinsames Cluster im Dendrogramm. Somit war auch im Hinblick auf die bakterielle Besiedlung der Kiemen eine vergleichbare Ausgangslage in beiden Anlagen gegeben, als der Reaktor in Betrieb genommen wurde. Die Kiemenproben aus Anlage B, 24 d und 52 d nach Inbetriebnahme des Reaktors sowie die Probe aus Anlage A, 52 d nach Inbetriebnahme des Reaktors bildeten ein gemeinsames Cluster. Interessanterweise handelte es sich bei den genannten Zeitpunkten um die Punkte, an denen die Fische der jeweiligen Anlagen deutliche Kiemenveränderungen in Form von Verschleimungen und Schwellungen zeigten. Anhand des Dendrogramms konnte eine sehr ähnliche Verteilung der Bakterienspezies insbesondere in beiden Anlagen 52 d nach Inbetriebnahme des Reaktors erkannt werden. Die beiden anderen Kiemenproben der Anlage A, die 24 d und 126 d nach Inbetriebnahme des Reaktors entnommen wurden, clusterten zusammen. Zu diesen Zeitpunkten erschien die Wasserqualität und die bakterielle Besiedlung des Wassers und der Fische in dieser Anlage optimal gewesen zu sein.



**Abb. 48: DGGE Gel Analyse u. auf Grundlage des DGGE Bandenmusters erstelltes Dendrogramm. Gezeigt sind Proben des Kiemen-Mucus von jeweils 6 Fischen zu unterschiedlichen Probennahmezeiten (Anl. A: mit MDR, Anl. B ohne MDR)**



## 6 Fazit

### 6.1 Vergleich der Ergebnisse mit den ursprünglichen Zielen

Einen Betrieb der Membranfiltration unter den Bedingungen der Denitrifikation ohne chemische Reinigung durchzuführen, war ursprünglich nicht Ziel der Untersuchungen. Jedoch hat sich gezeigt, dass im gesamten Zeitraum des Betriebs des Membran-Denitrifikations-Reaktors (MDR) keine chemische Reinigung erforderlich war.

Eine ausreichende Rezirkulationsströmung zu erzeugen war eine schwierige Aufgabe, die jedoch gelöst werden konnte. Mit Hilfe des transparenten Reaktors konnten die Schaumstoffwürfel gut beobachtet und so unerwünschte Ansammlungen auf Gittern oder in Totzonen erkannt und beseitigt werden. Dennoch ließ sich in einem Fall nicht verhindern, dass durch die Rezirkulationsströmung und am Gitter anhaftende Schaumstoffwürfel eine so hohe Druckdifferenz entstand, dass sich das Edelstahlgitter verbog, mit der Folge, dass Schaumstoffwürfel durchgesaugt wurden, in der Pumpe landeten und diese beschädigten. Das Gitter wurde daraufhin neu konstruiert und verbessert.

Da der MDR im Vergleich zur übrigen Anlage überdimensioniert war, waren die Denitrifikationsraten mit  $0,5 \text{ mg}/(\text{L h}) \text{ NO}_3\text{-N}$  durch die Exkretionsraten der Fische limitiert, somit aber für diese halbertechnische Anlage vollkommen ausreichend. Daher wurde später zusätzlich eine Nitratlösung dosiert. Dennoch konnte die maximale Leistungsfähigkeit des Denitrifikationsprozesses vermutlich nicht erreicht werden, da es immer wieder zu Problemen mit der Zulaufpumpe zum MDR gab. Insgesamt aber lässt sich sagen, dass die Denitrifikation einigermaßen problemlos ablief, mit nur seltenen Konzentrationsspitzen von Nitrit.

Der Frischwasserbedarf konnte durch den Einsatz des MDR deutlich gesenkt werden. Eine pH-Wert-Einstellung mit  $\text{NaHCO}_3$  war nicht erforderlich. Der Ethanolbedarf unter realistischen Bedingungen wurde zu  $2,1 \text{ g je g Nitrat-N}$  ermittelt, was sich mit Erfahrungen aus der Abwassertechnik deckt. Bei höherer Beladung mit Nitrat wird der Bedarf an Ethanol niedriger.

In Bezug auf die Fischgesundheit konnte bei der MDR-Anlage im Vergleich zur Referenzanlage folgendes festgestellt werden:

- Die Gesamtkeimzahl im Wasser war geringer, jedoch bei Erhalt der bakteriellen Diversität. Ökologischen Nischen bleiben besetzt und erschweren die Etablierung möglicherweise pathogener Bakterien
- Im Kiemenmucus der Fische und im Wasser waren weniger potentiell pathogene Keime und „Schmutzkeime“ zu ermitteln.
- Die Fische schienen weniger gestresst zu sein, denn Cortisolgehalte im Blut und im Wasser (als Stressfaktor) waren erheblich verringert. Dies ist vermutlich zurückzuführen auf die bessere chemische und mikrobiologische Wasserqualität.
- Der Einsatz eines MDR kann die Fischgesundheit und das Tierwohl in einer Aquakultur-Kreislaufanlage verbessern.

## 6.2 Weiterführende Fragestellungen

Wichtige Aufgaben bei der technischen Umsetzung des Verfahrens werden sein:

- Die Strömungsdynamik im Reaktor im Zusammenspiel mit den Schaumstoffwürfeln ist noch nicht optimal, um Wirbel und Totzonen zu vermeiden. Hier ist noch weiterer Forschungsbedarf vorhanden, um z.B. die Geometrie zu verändern.
- Zur Verbesserung des Permeatflusses ist die Problematik der Gasblasenbildung zu lösen.
- Optimierung der Membranmodule bezüglich Membranmaterial und Strömungsverhalten
- Wahl eines geeigneten Reaktormaterials, das die Anforderungen erfüllt, oder Konstruktion von weiteren geeigneten Verstärkungen.
- Verbesserung der Biomassenträger, unter Berücksichtigung der schonenden Reinigung der Membranen
- Einsatz des Verfahrens in der marinen Aquakultur
- Erarbeitung eines vereinfachten, schnellen Summenparameters für die Praxis (z.B. Cortisol und ausgewählte mikrobiologische und wasserchemische Parameter) zur Beurteilung des Tierwohls und der Fischgesundheit in der Aquakultur.

## 6.3 Möglichkeiten der Umsetzung oder Anwendung

Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass die Projektidee technisch umsetzbar ist und sehr vielversprechende Ansätze bietet. Allerdings bleiben noch einige Fragen offen. Hierzu besteht weiterer Forschungsbedarf.



## 7 Literatur, Software

- Aboutboul, Y., Arviv, R., and Van Rijn, J. (1995): Anaerobic treatment of intensive fish culture effluents: volatile fatty acids mediated denitrification. *Aquacult.* 133, 21-32.
- Alcaide, E., Blasco, M.-D. and Esteve, C. (2005): Occurrence of Drug-Resistant Bacteria in Two European Eel Farms, *Appl. & Environm. Microbiol.*, 71, p. 3348–3350.
- Anthonisen, A.C., R.C. Loehr, T.B.S. Prakasam, E.G. Srinath (1976): Inhibition of Nitrification by Ammonia and Nitrous Acid, *J. Wat. Pollut. Contr. Fed.*, 48, 835-852
- Beyer, P., 2013: Bachelorarbeit „Stoffströme der Stickstoffkomponenten in einem Aquarium“, Universität Stuttgart (in Arbeit)
- Boley, A., G. Boley (1999 bis 2012): Entwicklung Software „MULTIMESS“
- Borchmann, A., Rosenwinkel, K.-H. (2008): Keramische Flachmembranen in anaeroben Abwasserreinigungsverfahren. *GWF Wasser · Abwasser* 149 (14), 32-41.
- Busse (2002-2004): Projekt der deutschen Bundesstiftung Umwelt - Firma Busse. Zweiphasige Entwicklung und Erprobung einer Versuchsanlage und eines Prototypen zur Biomembranfiltration in Kreislaufwasseranlagen für die Fischzucht (<http://www.dbu.de/PDF-Files/A-18579.pdf>)
- CRC Handbook 2014: Handbook of Chemistry & Physics Online, 95<sup>th</sup> Edition, 2014, <http://www.hbcpnetbase.com/>, section 5 Dissociation Constants of Inorganic Acids and Bases
- DIN 38405-9 (Mai 1979). Berlin: Beuth Verl. GmbH.
- DIN 38406-1 (Mai 1983). Berlin: Beuth Verl. GmbH.
- DIN 38406-5 (Okt. 1983). Berlin: Beuth Verl. GmbH.
- DIN 38409-41 (Dez. 1980). Berlin: Beuth Verl. GmbH.
- DIN 38409-7 (Dez. 2005). Berlin: Beuth Verl. GmbH.
- DIN EN 26777 (Apr. 1993). Berlin: Beuth Verl. GmbH.
- DIN EN ISO 15682 (Jan. 2002). Berlin: Beuth Verl. GmbH.
- DIN EN ISO 6878 (Sept. 2004). Berlin: Beuth Verl. GmbH.
- Ellis, T, James, JD, Sundh, H., Fridell, F., Sundell K., und Scott AP (2007) Non-invasive measurement of cortisol and melatonin in tanks stocked with seawater Atlantic salmon. *Aquaculture* 272, 698-0706.
- FAO (2010): The state of world fisheries and aquaculture 2010. FAO, Rome (Italy). Fisheries and Aquaculture Dept. , 2010 <http://www.fao.org/fishery/sofia/en> letzter Zugriff 20.06.2014
- FAO Fisheries Report (2001): Report of the Conference on Aquaculture in the Third Millennium. Bangkok, Thailand, 20-25 Feb. 2000. Report No. 661, Bangkok, Thailand, 20-25 <http://www.fao.org/DOCREP/005/Y2815E/y2815e04.htm#TopOfPage>, letzter Zugriff 20.06.2014

- Hach Lange (Ed.) (1997). Wasserhärte Calcium/Magnesium: Küvetten-Test LCK 327. <http://www.hach-lange.de/view/content/facetsearch?query=calcium&type=All#> letzter Zugriff 15.09.2014
- Hach Lange (Ed.) (2001). Sulfat Methode 8051 SulfaVer 4 Methode: Pulverkissen oder AccuVac-Ampullen (2 bis 70 mg/L). Retrieved August 11, 2011, from <http://www.hach-lange.de/view/content/facetsearch?query=sulfat&type=All#>
- Hamon, M., Fustec, E. (1991): Laboratory and field study of an in situ groundwater denitrification reactor. Res. J. Wat. Pollut. Control Fed. 63 (7), 942 - 949.
- Helmus, F.P., Rosenberger, S., Bareth, A., Meyer-Blumenroth, U. (2014): „Chemikalienfreier Betrieb von getauchten Modulsystemen in der Abwasserbehandlung durch Foulingvermeidung mittels Wirbelschichttechnologie. Abschlussbericht DBU (AZ 27171/02-23)
- Hoa, P. T. P., Managaki, S., Nakada, N., Takada, H., Anh, D.H., Viet, P.H. and Suzuki, S. (2008) Occurrence Rates of Sulfamethoxazole and Erythromycin-Resistant Bacteria and Drug Concentrations in Wastewater of Integrated Aquaculture-Agriculture (VAC) Sites in Northern Vietnam. In: Interdisciplinary Studies on Environmental Chemistry - Biological Responses to Chemical Pollutants, Eds., Y. Murakami, K. Nakayama, S.-I. Kitamura, H. Iwata and S. Tanabe, p. 355–359. TERRAPUB, 2008.
- Irtenkauf, J., Heynhold, H., 2013: Bachelorarbeit „Aufbau einer halbtechnischen Aquakultur-Kreislaufanlage und Untersuchung der Wasserqualität“, Universität Stuttgart
- Jun B-H., Miyanaga, K., Tanji, Y. , Unnob, H. (2003): Removal of nitrogenous and carbonaceous substances by a porous carrier–membrane hybrid process for wastewater treatment. Biochem. Eng. J. 14, 37–44
- Klas, S., Mozes, N., Lahav, O. (2006): Development of a single-sludge denitrification method for nitrate removal from RAS effluents: Lab-scale results vs. model prediction. Aquacult. 259, 342–353.
- Korshun, G., 2014: Diplomarbeit „Untersuchung eines neuen Membran-Denitrifikations-Reaktors für die Aquakultur“, Universität Stuttgart (in Arbeit)
- Krause, S. (2008 a): Neue Verfahren beim Einsatz aerober MBR in der Industrieabwasserreinigung. GWF Wass. –Abwass. 149, (14), 50-54.
- Krause, S., Tournier, R., Cornel, P. and Siembida, B. (2008 b): Granulate-driven Fouling Control in a Submerged Membrane Module for MBR Application. IWA Conf. Vienna 2008.
- Kunz, M., Graber, A., 2007. Schweizer Fisch aus ökologischer Zucht: Ein Wegweiser zur eigenen Fischproduktion.
- LAWA 2003 - Hinweise zur Verringerung der Belastung der Gewässer durch die Fischhaltung. Beschlossen auf der 61. ACK (Amtschefkonf.), 19./20. Nov. 2003.
- Mayer-Tasch, Peter Cornelius (2007): Meer ohne Fische? Profit und Welternährung. 1. Aufl. Frankfurt/Main [u.a.]: Campus.
- Menasveta, P, Panritdam, T., Sihanonth, P., Powtongsook, S., Chuntapa, B, and Lee, P. (2001).: Design and function of a closed, recirculating seawater system with denitrification for the culture of black tiger shrimp broodstock. Aquacult. Eng., 25 (1) (2001), 35 – 49.
- Muyzer, G.; De Waal, E. C; 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. *Applied and environmental microbiology* 59 (3), S. 695–700.
- Ngo, H., Guo, W., Xing, W. (2008): Evaluation of a novel sponge-submerged membrane bioreactor (SSMBR) for sustainable water reclamation. *Biores. Technol.* 99 (2008) 2429-2435.
  - Rana, K.J. (1997): Status of global production and production trends. In: *Review of the State of World Aquaculture*. FAO Fisheries Circ. no. 886. Food & Agricultural Organ. of the United Nations, Rome, Italy, 3-16.
  - Rheinheimer, G.; Hegemann, W.; Raff, J.; Sekoulov, I. (1988): *Stickstoffkreislauf im Wasser*, R.-Oldenbourg-Verl., München, Wien.
  - Roennefahrt, Klausdieter W. (1992): *Nitratentfernung aus dem Trinkwasser: Übersicht über die Verfahrensvarianten mit mikrobieller Nitratreduktion*, Kontakt & Studium, Bd. 399, Ehningen: Expert-Verl.
  - Schreckenbach, K. (2002): Einfluss von Umwelt und Ernährung bei der Aufzucht und beim Besatz von Fischen. *VDSF-Schriftenreihe Fischerei & Naturschutz* (4), 207–208.
  - Steinum, T; Sjøstad, K; Falk, K; Kvellestad, A; Colquhoun (2009): An RT PCR-DGGE survey of gill-associated bacteria in Norwegian seawater-reared Atlantic salmon suffering proliferative gill inflammation, *Aquaculture*, 293, 3–4, 172-179
  - Timmons, M. B.; Losordo T. M. (1994): *Developments in Aquaculture and Fisheries Science*, Vol. 27, *Aquaculture Water Reuse Systems: Engineering Design and Management*. Elsevier, Amsterdam.
  - Van Rijn, Tal, Y., and Schreier, H.J. (2006): Denitrification in recirculating systems: Theory and applications. *Aquacult. Eng.* 34, 364–376.
  - Verschure L, Rombaut, G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000): Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiol. Mol. Rev.* 64: 655-671
  - Viadero Jr, R. C. & Noblet, J.A. (2002): Membrane filtration for removal of fine solids from aquaculture process water. *Aquacult. Eng.* 26, 151-169.
  - K H Wilson, R B Blichington and R C Greene (1990): Amplification of bacterial 16S ribosomal DNA with polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 28 (9): 1942-1946.
  - WHO (2002): World Health Organization Antimicrobial Resistance Fact Sheet 194. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs194/en/index.html>