

**Mikrobiologische Entfernung von Ammonium aus Abwässern
mit niedrigem C/N-Verhältnis**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Hannover
zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften
Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von

Dipl.-Biotechnol. Edzard Scholten
geboren am 23.12.1968 in Mülheim/Ruhr

2001

Referent: Prof. Dr. T. Scheper

Korreferent: Prof. Dr. H. Diekmann

Tag der Promotion: 20.12.2000

Datum der Veröffentlichung: 16.02.2001

Abstract

The aim of this work was to analyze the bacterial community structure in the biological step of the wastewater treatment plant in Mechernich as well as to study in laboratory scale reactors how operating conditions affect nitrification and denitrification.

The C/N elimination ratio in the rotating biological contactor (RBC) was low suggesting that the N-losses are mainly due to the activity of autotrophic bacteria. Autotrophic nitrifiers were therefore enriched from samples originating from different sites of the biological step. The enrichment cultures nitrified ammonium to nitrite but in none of these cultures nitrate production occurred. Two of them were investigated in continuous culture.

N-losses determined for enrichment culture 6 (5 % under steady state conditions, 25 % after ammonium pulses) were significantly lower than those occurring in the RBC. Supplementing the air supply with 50 ppm NO₂ did not result in higher N-losses.

After three months of continuous cultivation nitrate was the main nitrification product in culture 3. Increasing the temperature from 28 to 35 °C and dilution rate from 0.005 to 0.008 h⁻¹ at pO₂ = 0 % lead to broad nitrite accumulation (i. e. suppression of nitrification). For a few days the molar NH₄⁺/NO₂⁻ ratio in the effluent was 1 : 1.3 and thus well suited for nitrogen elimination in an anammox reactor.

During a simultaneous diploma thesis fluorescent in situ hybridization (FISH) had been established in our laboratory. This technique is used for specific identification and quantification of bacteria with fluorescently labeled rRNA-targeted oligonucleotide probes. By applying this technique we were able to show that there is no correlation between the nitrogen balance and the bacterial community composition.

FISH-analyses of biofilm samples from the RBC revealed that one fifth of the DAPI-stained cells belongs to the Planctomycetales. They occur thus with the same frequency as autotrophic ammonia- and nitrite-oxidizers. Anaerobic ammonium oxidizers (determined with the probe Amx820) were exclusively detected within the biofilm (7 %) but not in the wastewater. From these results it can be concluded that anaerobic ammonium oxidation significantly contributes to the N-losses in the RBC.

A heterotrophic denitrifier, strain TL1, which had been isolated from the RBC was further characterized. TL1 can express a nitrate reductase which is located in the periplasm. The results from 16S rDNA-sequencing and DNA-DNA-hybridization indicated that TL1 constitutes a new species *Thauera mechernichensis*.

Key words: biological nitrogen elimination, FISH, Anammox

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung der Bakterienflora in der biologischen Stufe der Kläranlage Mechernich analysiert und der Einfluß der Betriebsparameter auf die Nitrifikation und Denitrifikation in kontinuierlich betriebenen Labor-Reaktoren untersucht.

Das C/N-Eliminationsverhältnis in der Scheibentauchkörper(STK)-Anlage legte nahe, daß die N-Verluste überwiegend durch autotrophe Prozesse hervorgerufen werden. Daher wurden zunächst autotrophe Nitrifizierer aus verschiedenen Bereichen der biologischen Stufe in Reagenzgläsern angereichert. Die Anreicherungskulturen setzten Ammonium zu Nitrit um, Nitrat wurde nicht gebildet. Zwei dieser Kulturen wurden in kontinuierlich betriebenen Reaktoren untersucht.

In Experimenten mit Anreicherungskultur 6 ermittelte N-Verluste (5 % im stationären Zustand, 25 % nach Ammoniumpulsen) lagen deutlich niedriger als die N-Verluste in der STK-Anlage. Der Zusatz von 50 ppm NO₂ zur Begasungsluft führte zu keiner Steigerung der N-Verluste.

In der Kultur 3 wurde nach dreimonatigem kontinuierlichen Betrieb überwiegend Nitrat gebildet. Bei einem pO₂ von 0 % konnte durch Veränderung der Temperatur von 28 auf 35 °C und der Verdünnungsrate von 0,005 auf 0,008 h⁻¹ die Nitrifikation weitgehend auf der Stufe des Nitrits angehalten werden. Kurzzeitig lag das molare NH₄⁺/NO₂⁻-Verhältnis im Auslauf bei 1 zu 1,3, wie es für einen Anammox-Reaktor anzustreben ist.

In einer parallel laufenden Diplomarbeit war die Technik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) etabliert worden, bei der Bakterien mit fluoreszenzgekoppelten DNA-Oligonukleotiden spezifisch markiert und am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert werden. Damit konnte gezeigt werden, daß die jeweilige Stoffbilanz und die Populationszusammensetzung nicht korrelieren.

Die Populationsanalyse des Biofilms auf dem STK ergab, daß Bakterien der Ordnung Planctomycetales ein Fünftel der DAPI-positiven Zellen ausmachen und damit ähnlich häufig vertreten sind wie autotrophe Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer. Anaerobe Ammonium-Oxidierer (erfaßt mit der Sonde Amx820) waren im Biofilm mit einem Anteil von 7 %, nicht jedoch im Abwasser vorhanden. Die Ergebnisse lassen den Schluß zu, daß die Anaerobe Ammonium Oxidation maßgeblich zu den Stickstoffverlusten der STK-Anlage beiträgt.

Ein aus der Scheibentauchkörper-Anlage isolierter heterotropher Denitrifizierer, Stamm TL1, wurde phänotypisch und physiologisch weiter charakterisiert. Eine aktive Nitratreduktase ist im Periplasma lokalisiert. Mit den Ergebnissen der 16S rDNA-Sequenzierung und DNA/DNA-Hybridisierung konnte TL1 als neue Art *Thauera mechernichensis* beschrieben werden.

Schlagworte: Biologische Stickstoffentfernung, FISH, Anammox

Inhaltsverzeichnis		Seite
	Abkürzungen und Symbole	III
1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien und Reagenzien	11
2.2	Geräte	13
2.3	Nährlösungen	14
2.4	Mikroorganismen	19
2.5	Versuchsanlagen	20
2.5.1	Aufbau der Versuchsanlage 1	20
2.5.2	Aufbau der Versuchsanlage 2	22
2.6	Kulturbedingungen	23
2.6.1	Anreicherung autotropher Nitrifizierer	23
2.6.2	Stammhaltung	23
2.6.3	Batchkultivierung und Zellernte	24
2.6.3.1	Zellanzucht zur DNA-Präparation	24
2.6.3.2	Zellanzucht für biochemische Experimente	25
2.6.4	Kontinuierliche Kultur	26
2.6.4.1	Kultivierung	26
2.6.4.2	Probenahme und Aufbereitung	26
2.6.4.3	Berechnung der Umsatzraten	27
2.7	Meß- und Analysenmethoden	31
2.7.1	Optische Dichte	31
2.7.2	Gesamtzellzahl	31
2.7.3	Biotrockenmasse	31
2.7.4	Protein	32
2.7.5	Ammonium	32
2.7.6	Nitrit	32
2.7.7	Nitrat	32
2.7.8	Distickstoffoxid	33
2.7.9	Acetat	33
2.7.10	Glycerin	33
2.7.11	Chemischer Sauerstoffbedarf	34
2.8	Taxonomische Untersuchungen	35
2.8.1	Mikroskopie	35
2.8.2	Wachstum auf verschiedenen Substraten	36

2.8.3	Optimale Wachstumstemperatur	36
2.8.4	Poly- β -hydroxybuttersäure als Speicherprodukt	36
2.8.5	N ₂ O-Bildung	37
2.8.6	Nitrat-Reduktase-Test	37
2.8.7	16S rDNA-Sequenzierung	38
2.8.8	Bestimmung der DNA-Homologie	38
2.8.9	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	41
3	Ergebnisse	43
3.1	Populationsanalyse des Biofilms auf dem Scheibentauchkörper der Kläranlage Mechernich	43
3.2	Anreicherung autotropher Nitrifizierer aus der Kläranlage Mechernich	44
3.3	Charakterisierung der Anreicherungskulturen	45
3.4	Chemostatexperimente mit Anreicherungskulturen autotropher Nitrifizierer	46
3.4.1	Anreicherungskultur 3	46
3.4.2	Anreicherungskultur 6	54
3.4.2.1	Ablauf	54
3.4.2.2	FISH- und REM-Analysen	56
3.4.2.3	Einfluß von NO ₂	58
3.5	Charakterisierung und Klassifizierung von <i>T. mechernichensis</i> TL1	66
3.5.1	Phänotypische Tests und Physiologie	66
3.5.1.1	Transmissionselektronenmikroskopie	66
3.5.1.2	Akkumulation von Poly- β -hydroxybuttersäure	67
3.5.1.3	Wachstum auf verschiedenen Substraten	68
3.5.1.4	Wachstumstemperatur	69
3.5.1.5	N ₂ O als Denitrifikationsprodukt	69
3.5.1.6	Nitrit-Toleranz und -reduktion	70
3.5.1.7	Periplasmatische Nitrat-Reduktase	72
3.5.2	Beschreibung von <i>Thauera mechernichensis</i> sp. nov.	73
3.5.2.1	16S rDNA-Sequenz	73
3.5.2.2	DNA-Homologie	74
3.5.3	pO ₂ -Abhängigkeit der Denitrifikation	75
4	Diskussion	83
5	Zusammenfassung	108
6	Literatur	110
	Anhang	133

Abkürzungen und Symbole

Abkürzungen

AMO	Ammoniak-Monooxygenase
ATCC	American Type Culture Collection
BFM	Biofeuchtmasse
BSA	Rinderserumalbumin
BTM	Biotrockenmasse
BV ⁺	Benzylviologen (reduzierte Form)
CTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
ECD	Electron Capture Detector
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (Titriplex [®] III)
FID	Flammenionisationsdetektor
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
gProt	gelöstes Protein
HAO	Hydroxylamin-Oxidoreduktase
MV ⁺	Methylviologen (reduzierte Form)
N-BTM	in der Biotrockenmasse festgelegter Stickstoff
N-gProt	im gelösten Protein festgelegter Stickstoff
N-zProt	im zellulären Protein festgelegter Stickstoff
PCR	Polymerase Chain Reaction
PHB	Poly- β -hydroxybuttersäure
PTFE	Polytetrafluorethylen
Q, QH ₂	oxidiertes, reduziertes Ubichinon
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuclease
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Saline-Natriumcitrat-Puffer
STK	Scheibentauchkörper

Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
zProt	zelluläres Protein

Symbole

BCR	Baseverbrauchsrate	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf	$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
c_i	Konzentration der Komponente i	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
D	Verdünnungsrate	h^{-1}
d	Schichtdicke	cm
E	Extinktion	-
F	Flußrate	$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$
h	Höhe	cm
m	Masse	g
n	Drehzahl	min^{-1}
OUR	Sauerstoffaufnahme	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
OD_{578}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von 578 nm	-
sDR	spezifische Denitrifikationsrate	$\text{mmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
sNR	spezifische Nitrifikationsrate	$\text{mmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
t, t_d	Zeit, Verdopplungszeit	h
T	Temperatur	$^{\circ}\text{C}$
V	Volumen	mL, L
v	Renaturierungsrate	min^{-1}
vDR	volumetrische Denitrifikationsrate	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
vNR	volumetrische Nitrifikationsrate	$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$
Z	Zellzahl	L^{-1}
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient	$\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$
μ , μ_{\max}	spezifische, maximale spezifische Wachstumsrate	h^{-1}
v	spezifische Nitrat-Reduktase-Aktivität	$\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$
%D	DNA-Homologie	%

1 Einleitung

Mit der Zunahme der Erdbevölkerung - in nur 75 Jahren ist eine Verdreifachung zu erwarten - werden sich auch der Bedarf an Trinkwasser und der Wasserbedarf von Industrie und Landwirtschaft erheblich erhöhen. Die jährliche Erneuerung des verfügbaren Wassers im naturgesetzlich ablaufenden Wasserkreislauf bleibt jedoch im Mittel etwa gleich. Im Mittelpunkt sämtlicher Bemühungen für eine nachhaltige Entwicklung (sustainable development) muß daher neben der Einführung verbesserter wassersparender Technologien mit Einschluß innerbetrieblicher Kreisläufe die Abwasserreinigung stehen (MARCINEK und ROSENKRANZ, 1996). Neben der Entfernung organischer Substanzen aus dem Abwasser kommt der Eliminierung von Stickstoff und Phosphor, die als Nährstoffe insbesondere in Seen zur Eutrophierung führen, eine entscheidende Bedeutung zu. Von einzelnen Industrieabwässern abgesehen liegen Stickstoffverbindungen hauptsächlich als Ammonium vor (MUDRACK und KUNST, 1997). Die biologische Entfernung von Ammonium aus Abwasser erfolgt traditionell in den zwei räumlich bzw. zeitlich getrennten Prozessen der Nitrifikation und Denitrifikation.

Als **Nitrifikation** wird die Oxidation reduzierter Stickstoffverbindungen bezeichnet. Es gibt zwei Gruppen autotropher Bakterien (autotrophe Nitrifizierer), die entweder aus der Oxidation von Ammoniak zu Nitrit (Ammoniakoxidierer) oder aus der Oxidation von Nitrit zu Nitrat (Nitritoxidierer) Energie für das Wachstum beziehen (DROZD, 1976; KUENEN und ROBERTSON, 1987; BOCK et al., 1992).

Die Biochemie der Oxidation des Ammoniaks wurde intensiv bei *Nitrosomonas* untersucht (eine Zusammenfassung findet sich bei HOOPER et al., 1997). Sie erfolgt in zwei Schritten. Der erste (Gleichung 1.1) ist die Oxidation des Ammoniaks zu Hydroxylamin und wird durch die Ammoniak-Monooxygenase (AMO) katalysiert. Als Substrat wird Ammoniak (NH_3), nicht das mit diesem im Gleichgewicht stehende Ammonium (NH_4^+), angesehen.



Der zweite Schritt, die Oxidation des Hydroxylamins zu salpetriger Säure (Gleichung 1.2), wird von der Hydroxylamin-Oxidoreduktase (HAO) katalysiert. Die Reaktion liefert vier Reduktionsäquivalente, von denen je zwei für die Aktivierung des Sauerstoffs durch die AMO ($\text{NH}_3 + \text{O}_2 + \text{QH}_2 \rightarrow \text{NH}_2\text{OH} + \text{H}_2\text{O} + \text{Q}^1$) und für die Atmungskette (Gleichung 1.3) bereitgestellt werden. Als Summe ergibt sich Gleichung 1.4, wobei die Gleichgewichte $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ und $\text{HNO}_2/\text{NO}_2^-$ bei einem pH-Wert um 7,0 auf der Seite des Ammoniums bzw. des Nitrits liegen (Anhang A1 und A2).

Die Oxidation von Nitrit zu Nitrat durch die Nitrit-Oxidoreduktase (BOCK et al., 1992) wird meist entsprechend Gleichung 1.5 dargestellt, obwohl als eigentliches Substrat HNO_2 angenommen wird (O'KELLY et al., 1970; HOOPER, 1989). Das in Nitrit eingeführte Sauerstoffatom entstammt dem Wasser (KUMAR et al., 1983; HOOPER et al., 1984). Beide freigesetzten Reduktionsäquivalente werden entsprechend Gleichung 1.3 für die Energiegewinnung via Atmungskette genutzt und schließlich auf Sauerstoff übertragen (BOCK et al., 1992). Gleichung 1.6 beschreibt die Gesamtreaktion.



Die **Denitrifikation** ist eine bakterielle Atmung, bei der der Elektronentransport an die Reduktion von Nitrat bzw. Nitrit zu gasförmigen Stickstoffkomponenten gekoppelt ist (MAHNE und TIEDJE, 1995; ZUMFT, 1997). Die Denitrifikation, als anaerobe Alternative zur Atmung mit Sauerstoff (KUENEN und ROBERTSON, 1987), erfolgt in vier Schritten (Gleichungen 1.7 bis 1.10; ZUMFT, 1992 und 1997). Die Reaktionen laufen im Cytoplasma bzw. Periplasma ab (STOUTHAMER, 1992; FERGUSON, 1994; BERKS et al., 1995; ZUMFT, 1997).



¹ Als Elektronenüberträger wird Ubichinon 8 angenommen (KUENEN, 1999; WHITTAKER et al., 2000).

Bei den technischen (kontinuierlichen) Verfahren zur Nitrifikation und Denitrifikation sind aerobe Beckenzonen bzw. Betriebszeiten (für die Nitrifikation) mit anaeroben Zonen/Zeiten (für die Denitrifikation) kombiniert (ATV, 1987 und 1994). Auf diese Weise umfaßt die biologische Entfernung von Ammonium die vollständige Oxidation von Ammoniak zu Nitrit (Nitritation), die Oxidation von Nitrit zu Nitrat (Nitratation) und dessen Reduktion zu elementarem Stickstoff (RAHMANI et al., 1995; JETTEN et al., 1997b). Mit Nitrat als Intermediärprodukt (Abbildung 1.1) besteht ein hoher Bedarf an Sauerstoff und Reduktionsmitteln.

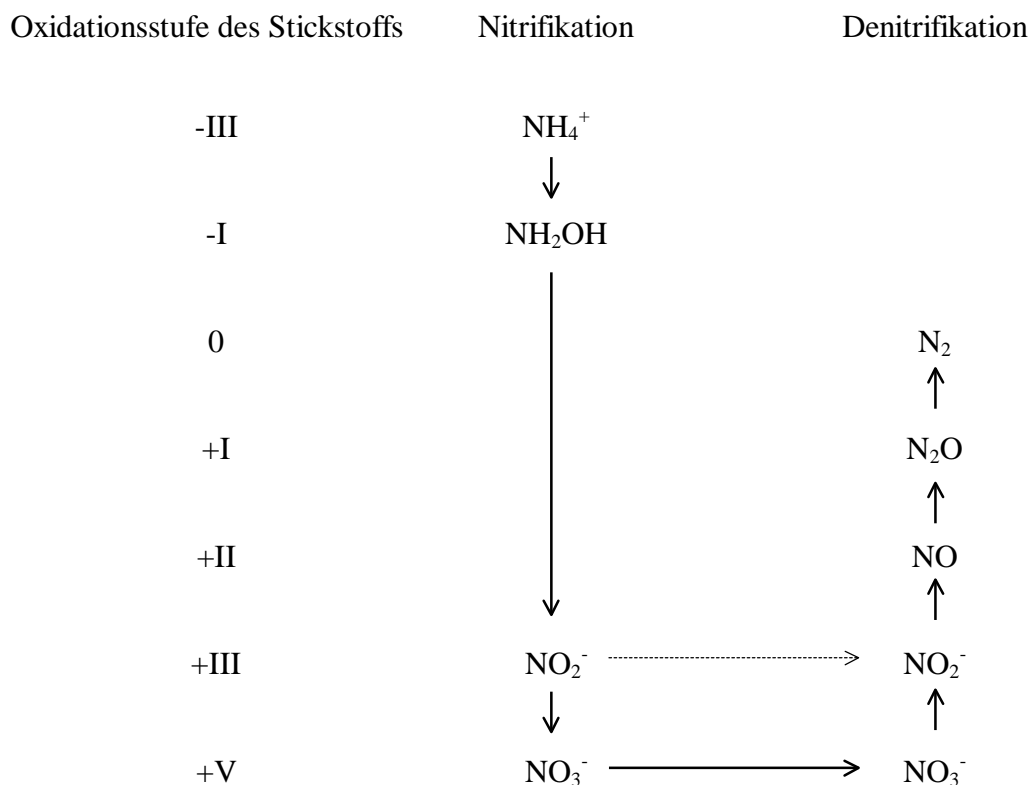


Abb. 1.1: Ablauf der mikrobiologischen Entfernung von Ammonium aus Abwasser via Nitrifikation (autotroph) und Denitrifikation (heterotroph).

Mit einem Prozeß, bei dem nur bis zu den Oxidationsstufen -I (Hydroxylamin) oder +III (Nitrit) oxidiert wird, würden die Betriebskosten deutlich verringert (ABELING, 1994). Prinzipiell wäre Hydroxylamin ein ideales Intermediat (DE BRUIJN et al., 1995), doch sind entsprechende Umsetzungen in der Praxis nicht von Bedeutung (JETTEN et al., 1997b). Eine Möglichkeit besteht darin, nur bis zum Nitrit zu oxidieren und dieses zu reduzieren (in Abbildung 1.1 gestrichelt dargestellt).

Viele Untersuchungen in der Abwassertechnik zielten daher auf die Etablierung eines Prozesses ab, bei dem diese Abkürzung beschriftet wird (z. B. ANTHONISEN et al., 1976; TURK und MAVINIC, 1989; ABELING und SEYFRIED, 1992; BALMELLE et al., 1992; RAHMANI et al., 1995; RHEE et al., 1997; YOO et al., 1999; JOO et al., 2000). ANTHONISEN et al. (1976) zeigten, daß die Nitritoxidation (Nitratation) durch Bakterien bei hohen pH-Werten durch freies Ammoniak gehemmt wird. In der Regel handelt es sich jedoch nur um einen vorübergehenden Effekt, so daß die Nitrifikation nach kurzer Zeit wieder bis zum Nitrat verläuft (TURK und MAVINIC, 1989). Eine effektivere Strategie, die Nitritoxidation zu unterdrücken, besteht in der Wahl von Betriebstemperaturen oberhalb von 25 °C. In diesem Temperaturbereich ist die spezifische Wachstumsrate μ der Ammoniumoxidierer höher als die der Nitritoxidierer (HUNINK, 1994), so daß letztere ausgewaschen werden. Auf diesem Prinzip beruht der sogenannte SHARON (Single reactor High activity Ammonium Removal Over Nitrite)-Prozeß (MULDER und VAN KEMPEN, 1997; HELLINGA et al., 1998), bei dem in einem Reaktor die in Abbildung 1.1 angedeutete Abkürzung über Nitrit realisiert ist.

Seit 1970 wurden zuvor nicht bekannte mikrobielle Umsetzungen nachgewiesen bzw. bereits bekannte wieder entdeckt, die die bisherige Unterscheidung von autotropher Nitrifikation und anaerober heterotropher Denitrifikation erweitern (Zusammenfassungen finden sich bei MARTINS DOS SANTOS et al., 1998):

Heterotrophe Nitrifikation

VERSTRAETE und ALEXANDER (1972) wiesen am Beispiel *Arthrobacter* sp. Nitrifikationsaktivität eines heterotrophen Bakteriums nach. Inzwischen wurde für verschiedene Gruppen von Prokaryonten heterotrophe Nitrifikation beschrieben (VERSTRAETE, 1975; KUENEN und ROBERTSON, 1987). Die Reaktion ist für die Mikroorganismen nicht mit einem Energiegewinn verbunden (CASTIGNETTI, 1990; CASTIGNETTI et al., 1990), sondern dient wahrscheinlich der Regulation des intrazellulären Q/QH₂-Gleichgewichts (WEHRFRITZ et al., 1993; BERKS et al., 1995).

Aerobe Denitrifikation

Die Vorstellung, daß Denitrifikation nur bei Abwesenheit von Sauerstoff (anoxisch) erfolgt, mußte revidiert werden; es gibt eine aerobe Denitrifikation. Untersuchungen von KRUL (1976), MEIBERG et al. (1980), ROBERTSON und KUENEN (1983) und OTTOW und FABIG (1984) zeigten, daß bei einigen Bakterien Denitrifikation in Gegenwart von meßbaren (z. T. auch hohen) Sauerstoffkonzentrationen möglich ist. Die meisten der aerob denitrifizierenden

Bakterien sind auch zur heterotrophen Nitrifikation befähigt. Der am besten untersuchte heterotrophe Nitrifizierer/aerobe Denitrifizierer ist *Paracoccus pantotrophus* (RAINEY et al., 1999), der ehemals als *Thiosphaera pantotropha* (ROBERTSON UND KUENEN, 1983) bzw. *P. denitrificans* DSM 2944 (LUDWIG et al., 1993) bezeichnet wurde.

Denitrifikation durch autotrophe Ammoniak-Oxidierer

Frühere experimentelle Befunde von GOREAU et al. (1980) und BLACKMER et al. (1980) zur Denitrifikation durch autotrophe Ammoniak-Oxidierer wurden erst durch die Arbeiten von POTH und FOCHT (1985) und POTH (1986) wiederentdeckt und durch BOCK et al. (1995) und KUAI und VERSTRAETE (1998) bestätigt.

Anaerobe Ammonium Oxidation

Von einer biologischen Ammonium-Oxidation, die unter anaeroben Bedingungen stattfindet, wurde erstmals durch VAN DE GRAAF et al. (1990) berichtet. In einem anaerob betriebenen 23 L-Fließbettreaktor in Delft, Holland wurden Ammonium und Nitrat entfernt und elementarer Stickstoff gebildet. Die Reaktion wurde als Anammox (Anaerobe Ammonium Oxidation) bezeichnet und patentiert (MULDER et al., 1995). In Experimenten mit ¹⁵N-markiertem Ammonium zeigten VAN DE GRAAF et al. (1995), daß nicht wie ursprünglich angenommen Nitrat sondern Nitrit als Elektronenakzeptor der Anammox-Reaktion (Gleichung 1.11) fungiert.



Unter verbesserten Kultivierungsbedingungen (VAN DE GRAAF et al., 1996; STROUS et al., 1998) konnten die Anammox-Bakterien bis zu einem Anteil von über 70 % (bezogen auf die Gesamtzellzahl) angereichert und genauere physiologische Studien (STROUS et al., 1999b) durchgeführt werden. Anammox-Bakterien wachsen wie andere autotrophe oder anaerobe Mikroorganismen sehr langsam. Für die katabole Anammox-Reaktion (Gleichung 1.11) wurde ein Reaktionsmechanismus über Hydrazin (N₂H₄) postuliert (VAN DE GRAAF et al., 1997), was die Untersuchungen von SCHALK et al. (1998) bestätigten (Abbildung 1.2). Neben N₂ wird durch die Anammox-Bakterien auch NO₃⁻ gebildet, und die Stoffbilanz ergab ein NH₄⁺/NO₂⁻-Umsetzungsverhältnis von 1 zu 1,3. Aus diesen Befunden schlossen VAN DE GRAAF et al. (1996) und JETTEN et al. (1999), daß die für die CO₂-Fixierung notwendigen Reduktionsäquivalente aus der Oxidation von Nitrit zu Nitrat stammen. Es gelang nicht, durch

Vereinzelung zu einer Reinkultur des Anammox-Bakteriums zu gelangen. Erst durch die Abtrennung und Anhäufung der Anammox-Bakterien durch Zentrifugation im Dichtegradienten waren die Voraussetzungen für molekulartaxonomische Untersuchungen erfüllt. Das Anammox-Bakterium wurde als neue Art der Ordnung Planctomycetales identifiziert und klassifiziert und vorläufig als *Candidatus Brocadia anammoxidans* benannt (STROUS et al., 1999a; STROUS et al., 2000). Inzwischen wurde in einer halbtechnischen Tropfkörper-Anlage ein weiteres Bakterium entdeckt, das sehr wahrscheinlich zur Anammox-Reaktion befähigt ist. Dieser Organismus wurde ebenfalls vorläufig als neue Gattung der Planctomycetales, *Candidatus Kuenenia stuttgartiensis*, beschrieben (SCHMID et al., 2000).

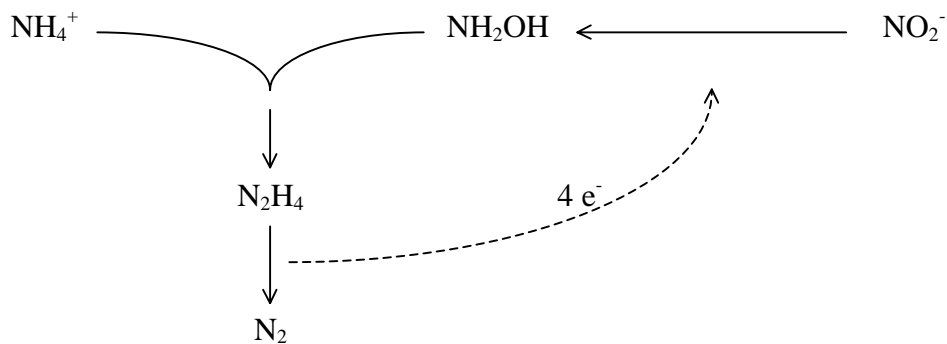


Abb. 1.2: Postulierter Reaktionsmechanismus für die Anaerobe Ammonium Oxidation (SCHALK et al., 1998).

Neben der traditionellen Vorgehensweise (Seiten 1 - 3) gibt es somit drei weitere Möglichkeiten der Entfernung von Ammonium aus Abwässern (Tabelle 1.1). In allen Fällen wird Ammonium nur bis zum Nitrit oxidiert.

Tab. 1.1: Erweiterte Möglichkeiten der Ammoniumentfernung aus Abwässern mit Beispielen für die beteiligten Organismen.

Mikrobielle Umsetzungen	Organismen	Literatur
Heterotrophe Nitrifikation/ Aerobe, heterotrophe Denitrifikation	<i>Paracoccus pantotrophus</i>	ROBERTSON und KUENEN, 1984
Autotrophe Nitrifikation/ Autotrophe Denitrifikation	<i>Nitrosomonas eutropha</i>	BOCK et al., 1995
Autotrophe Nitrifikation/ Anaerobe Ammonium Oxidation	<i>Nitrosomonas</i> sp./ <i>Candidatus Brocadia anammoxidans</i>	STROUS et al., 1999a

Bei der heterotrophen Nitrifikation/aeroben heterotrophen Denitrifikation wird der überwiegende Teil des aus dem Abwasser entfernten Stickstoffs nicht mineralisiert sondern vielmehr assimiliert (KUENEN und ROBERTSON, 1987; VAN NIEL et al., 1993). Die resultierende starke Biomassebildung macht die Umsetzung in vielen Fällen ungeeignet (MARTINS DOS SANTOS, 1998). Darüberhinaus treten heterotrophe Nitrifikation und aerobe heterotrophe Denitrifikation insbesondere in Abwässern mit hohem C/N-Verhältnis auf, die eher die Ausnahme als die Regel sind (MARTINS DOS SANTOS, 1998) und bei denen die Stickstoffentfernung unproblematisch ist (JETTEN et al., 1997b). Heterotrophe Nitrifizierer/aerobe heterotrophe Denitrifizierer bilden unter bestimmten Bedingungen N_2O (OTTE et al., 1996; SCHALK-OTTE et al., 1999), das zum Treibhauseffekt und zur Zerstörung der Ozonschicht in der Stratosphäre beitragen würde (RASMUSSEN und KHALIL, 1986; GRAEDEL und CRUTZEN, 1994).

Die Ammoniumentfernung via autotrophe Nitrifikation und autotrophe Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen wurde durch SCHMIDT und BOCK (1997, 1998) und unter aeroben Bedingungen durch ZART et al. (1998) bzw. ZART und BOCK (1998) bearbeitet. Der Mechanismus ist noch nicht aufgeklärt. Es wurde beobachtet, daß bei Verwendung von mit 50 ppm NO_2 dotierter Luft als Begasungsmedium Reinkulturen von *Nitrosomonas eutropha* N904 unter aeroben Bedingungen mehr als 50 % des aus Ammonium gebildeten Nitrits durch Denitrifikation eliminieren (ZART und BOCK, 1998). Dieses einstufige Verfahren wurde bisher nur im Pilotmaßstab bei der Intensivfischzucht bzw. der Teilstrombehandlung von Schlammwasser eingesetzt (SCHMIDT et al., 1999). Auch bei autotrophen Ammoniak-Oxidierern wurde die Bildung von N_2O nachgewiesen (BLACKMER et al., 1980; JIANG und BAKKEN, 1999).

Für die Stickstoffentfernung mit Anammox-Bakterien ist es notwendig, zunächst knapp die Hälfte des Ammoniums in Nitrit zu überführen. Mit einer Kombination aus autotropher Nitrifikation von Ammonium zu Nitrit und Anammox-Reaktion erzielten JETTEN et al. (1997a) im Labormaßstab Eliminierungsgrade für Ammonium von 80 %. Es fehlt bisher der Beweis, daß die im Anammox-Reaktor gemessenen Eliminierungsleistungen ausschließlich auf Anammox-Bakterien zurückzuführen sind. Es könnten auch aus dem vorgeschalteten Reaktor ausgespülte Ammoniak-Oxidierer zu den Umsetzungen beigetragen haben. Da die Planctomyceten noch nicht als Reinkultur vorliegen, wurden die bisherigen Versuche mit hoch angereicherten Mischkulturen durchgeführt (STROUS et al., 1999a und 1999b).

Von zwei technischen Anlagen zur Behandlung von Deponiesickerwasser werden N-Verluste von 70-90 % berichtet (HIPPEN et al., 1998b; HELMER und KUNST, 1998; SIEGRIST et al., 1998). Da in beiden Fällen mit periodisch belüfteten Biofilmen gearbeitet wird, kommen im Prinzip sowohl aerobe als auch anaerobe mikrobiologische Prozesse als Ursachen der Stickstoffverluste in Betracht (WATANABE et al., 1995). Berücksichtigt man weiterhin, daß durch lysierte Zellen Kohlenstoff zur Verfügung gestellt wird bzw. im Zulauf vorhanden ist, kann die heterotrophe Denitrifikation trotz der niedrigen gemessenen C/N-Eliminationsverhältnisse in geringem Umfang beitragen. Darauf deutet die Isolierung eines neuen heterotrophen Nitrifizierers/aeroben Denitrifizierers aus einer der genannten Anlagen (LUKOW und DIEKMANN, 1997) hin.

In der Kläranlage Mechernich (BAUMGARTEN und SEYFRIED, 1996) werden Deponiesickerwässer gereinigt. Die biologische Vorbehandlung (die Endreinigung erfolgt in der kommunalen Kläranlage) zum weitgehenden Abbau der Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen (Abbildung 1.3) setzt sich aus folgenden Verfahrensschritten zusammen (HIPPEN et al., 1997):

- 1) Nitrifikation in einer Scheibentauchkörper-Anlage (STK-Anlage)
- 2) vorgeschaltete Denitrifikation in einer Belebungsanlage mit nachgeschalteter Zwischenbelüftung und Nachklärbecken.

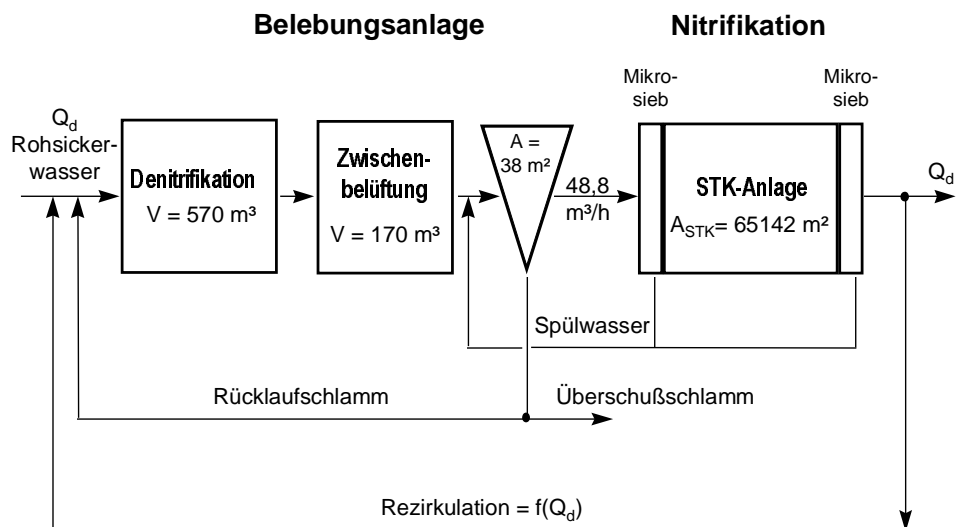


Abb. 1.3: Fließschema der biologischen Vorbehandlung von Deponiesickerwasser (HIPPEN et al., 1997).

Die ursprüngliche Konzeption der Anlage sah die Zugabe von Methanol als Reduktionsmittel für die heterotrophe Denitrifikation vor; dieses wurde jedoch nach der Anfahrperiode nicht benötigt. Die Konzentrationen des Zulaufs zum Denitrifikationsbecken betragen im Mittel für Ammonium 14,3 mM, für Nitrit 0,3 mM und für Nitrat 1,9 mM. Die durchschnittlichen Konzentrationen des Ablaufs der STK-Anlage liegen bei <0,1 mM für Ammonium und Nitrit und 2,8 mM für Nitrat. Die beschriebenen Stickstoffverluste von bis zu 70 % bezogen auf die Zulauffracht treten in der STK-Anlage auf. Unter Berücksichtigung des niedrigen C/N-Eliminationsverhältnisses von etwa 1 (der Wert für heterotrophe Denitrifikation beträgt 7 bis 8) wird deutlich, daß die Stickstoffentfernung überwiegend auf autotrophe Prozesse zurückzuführen ist (HIPPEN et al., 1998b).

Mit den üblichen mikrobiologischen Methoden konnten bisher keine sicheren Aussagen über die Zusammensetzung der Mikroorganismen-Population in einer Kläranlage gemacht werden, vor allem waren quantitative Populationsanalysen nicht möglich (WAGNER und AMANN, 1996). Die Anwesenheit zuvor unbekannter Arten konnte nicht nachgewiesen werden, solange keine Möglichkeit der Anreicherung bestand.

Untersuchungen von Belebtschlammproben mit molekularbiologischen Techniken haben nun gezeigt, daß die mikrobielle Diversität größer als früher angenommen ist und bisher nur ein Teil der vorhanden Bakterien isoliert und charakterisiert wurde (WAGNER et al., 1993 und 1994; AMANN et al., 1995). Es ist immer noch davon auszugehen, daß ein (immer geringer werdender) Teil der in Kläranlagen stattfindenden Stoffumsetzungen auf unbekannte Mikroorganismen zurückzuführen ist (AMANN, 2000).

Problemstellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Zusammensetzung der Bakterienflora in der biologischen Stufe der Mechernicher Kläranlage zu analysieren und die Bedeutung verschiedener mikrobieller Umsetzungen für die beobachteten Stickstoffverluste sowie den Einfluß der Betriebsparameter zu ermitteln.

Aus der Anlage Mechernich sollen dazu autotrophe Nitrifizierer angereichert werden. Die Anreicherungskulturen sind bezüglich ihrer Nitrifikationsaktivitäten und des überwiegenden Nitrifikationsprodukts (Nitrit vs. Nitrat) zu untersuchen. Die Anteile Ammoniak-oxidierender Bakterien an der Gesamtpopulation sind mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zu erfassen, nachdem diese Technik im Rahmen einer parallel laufenden Diplomarbeit etabliert wurde. Geeignete Kulturen sollen für Chemostatexperimente ausgewählt werden.

Wird in den Kulturen Nitrat gebildet, so ist zu untersuchen, wie durch Veränderung der Betriebsparameter die Nitrifikation auf der Stufe des Nitrits angehalten werden kann. Parallel dazu ist die mikrobielle Zusammensetzung der Kultur mit Oligonukleotidsonden für die verschiedenen physiologischen Gruppen sowie spezielle Gattungen quantitativ zu erfassen. Besonderes Interesse besteht darin zu ermitteln, inwieweit Änderungen der Stoffbilanz sich mit solchen der Bakterienpopulation korrelieren lassen.

In nitritierenden Kulturen soll ermittelt werden, inwieweit die Elimination des gebildeten Nitrits durch Denitrifikation möglich ist.

Die Bakterienflora der Scheibentauchkörper-Anlage ist mittels FISH zu charakterisieren, wobei eine weitgehende Erfassung aller Mikroorganismen, die zur biologischen Entfernung von Ammonium beitragen, angestrebt wird.

Der von LUKOW (1996) isolierte heterotrophe Nitrifizierer/aerobe heterotrophe Denitrifizierer TL1 soll phänotypisch und physiologisch weiter charakterisiert und unter Verwendung der Molekulartaxonomie klassifiziert werden. Von besonderem Interesse ist die Abhängigkeit der Denitrifikationsleistung von der Sauerstoffsättigung.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Reagenzien

Roche, Mannheim

RNase A (109142)

Chroma Gesellschaft GmbH, Münster

Nilblausulfat

Difco Laboratories GmbH, Augsburg

Bacto-Agar

Hefeextrakt (0127)

Fluka AG, Buchs, Schweiz

Durcupan ACM

Magnesiumchlorid Hexahydrat, purum

Kalbsthymus-DNA

Natriumdithionit, pract.

Natriumperchlorat, purum

Linde AG, Höllriegelskreuth

Distickstoffmonoxid

Macherey-Nagel, Düren

Chromosorb[®]

MBI Fermentas, St. Leon-Roth

Lambda DNA/HindIII Marker

Merck, Darmstadt

Lysozym aus Hühnereiweiß (105281)

Proteinase K (124568)

Mettler-Toledo GmbH, Urdorf, Schweiz

Standardpufferlösungen pH 4,01, 7,00 und 9,21

O₂-Elektrolyt

Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg

Agarose NA

Riedel de Haën AG, Hannover-Seelze

Natriumwolframat Dihydrat, p. a.

Serva Feinbiochemica GmbH, Heidelberg

α -Liponsäure

Rinderserumalbumin

Sigma Chemie GmbH, Deisenhofen

Acetatstandard 0,02 N

Benzylviologen

Diphenylamin, gereinigt

Ethidiumbromid

Hexadecyltrimethylammoniumbromid (CTAB)

Methylviologen

Natriumbenzoat, Minimum 99 %

Alle Chemikalien und Reagenzien, die nicht explizit erwähnt sind, wurden von der Firma Merck, Darmstadt in der Qualität z. A. bezogen.

2.2 Geräte

Die zur Durchführung der in den folgenden Kapiteln beschriebenen Arbeiten verwendeten Geräte zeigt Tabelle 2.1.

Tab. 2.1: Im Methoden- und Ergebnisteil aufgeführte Standardgeräte.

Gerät	Verwendungszweck	Bezeichnung	Hersteller
pH-Meter	pH-Einstellung der Medien		Knick
Festwellenphotometer	Optische Dichte	1101 M	Eppendorf
Spektralphotometer	photometrische Analysen	Ultrospec III	Pharmacia
Spektralphotometer	photometrische Analysen	PM6	Zeiss
Analysenwaage	Feineinwaage	A120S	Sartorius
Lichtmikroskop	Zelldichte/Kulturkontrolle	Standard 30	Zeiss
Schüttelwasserbad	Vorkultur	Gyrotory G67	New Brunswick
Mikrowelle	BTM-Bestimmung	NN 3306	Panasonic
Inkubationsschüttler	Batchversuche	RC1TK	Infors
Wasservollentsalzer	VE-Wasser	SD 2000	Seradest
Gaschromatograph	Acetatbestimmung	GC-9AM	Shimadzu
Integrator	GC-Peak-Auswertung	C-R6A	Shimadzu
Gaschromatograph	N ₂ O-Bestimmung	CP 9002	Chrompack
Zählkammer nach Thoma	Zellzahlbestimmung		Hecht

2.3 Nährlösungen

Medium 1 (Chemostat-Medium, HOOIJMANS et al., 1990)

Grundmedium:

Na ₂ HPO ₄	0,40 g/L
KH ₂ PO ₄	0,15 g/L
NH ₄ Cl	0,40 g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,40 g/L
Natriumacetat	1,64 g/L
Spurenelement-Lösung VS	2,0 mL/L

Bei Bedarf werden pro Liter Medium 4,00 g KNO₃ zugesetzt. MgSO₄ und KNO₃ werden in konzentrierter Form getrennt autoklaviert. Der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf 8,0 eingestellt.

Spurenelement-Lösung VS (VISHNIAC und SANTER, 1957)

EDTA (Titriplex III)	50,00 g/L
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	2,20 g/L
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	5,50 g/L
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	5,06 g/L
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	5,00 g/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	1,10 g/L
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	1,57 g/L
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	1,61 g/L

Der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf 6,0 eingestellt.

Medium 2 (Mineralsalz-Medium, modifiziert, ROBERTSON und KUENEN, 1984a)

Na ₂ HPO ₄	4,20 g/L
KH ₂ PO ₄	1,50 g/L
NH ₄ Cl	0,30 g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,10 g/L
Natriumacetat	2,93 g/L
Spurenelement-Lösung VS	2,0 mL/L

Der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf 8,0 eingestellt. Zur Herstellung von Agarplatten werden dem Medium 1,5 % (w/v), zur Herstellung von Schrägschichtröhrchen 2,0 % (w/v) Bacto-Agar zugesetzt.

Medium 586 (DSMZ, 1996)

Lösung A:

KH_2PO_4	1,64 g/L
K_2HPO_4	10,84 g/L

Lösung B:

NH_4Cl	0,54 g/L
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,40 g/L
KNO_3	4,00 g/L
$\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,06 g/L
Natriumbenzoat	1,44 g/L

Die Lösungen A und B werden auf pH-Wert 7,5 eingestellt, getrennt autoklaviert und nach dem Abkühlen im Verhältnis 1:1 steril vereinigt. Pro Liter Medium werden 10 mL Spurenelement-Lösung SL-10 und 5 mL Vitamin-Lösung 1 hinzugegeben.

Spurenelement-Lösung SL-10 (Medium 320, DSM, 1993)

HCl (25%; 7,7 M)	10 mL/L
$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	1,50 g/L
ZnCl_2	70 mg/L
$\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	100 mg/L
H_3BO_3	6 mg/L
$\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	190 mg/L
$\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	2 mg/L
$\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	24 mg/L
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	36 mg/L

FeCl_2 wird in der Salzsäure gelöst, danach wird mit Wasser verdünnt. Anschließend werden die übrigen Salze gelöst.

Vitamin-Lösung 1 (Medium 461, DSM, 1993)

Vitamin B ₁₂	50 mg/L
Pantothensäure	50 mg/L
Riboflavin	50 mg/L
Pyridoxamin-Hydrochlorid	10 mg/L
Biotin	20 mg/L
Folsäure	20 mg/L
Nicotinsäure	25 mg/L
Nicotinamid	25 mg/L
α -Liponsäure	50 mg/L
p-Aminobenzoesäure	50 mg/L
Thiamin-Hydrochlorid	50 mg/L

Die Lösung wird einige Stunden gerührt und anschließend sterilfiltriert.

Definiertes Süßwassermedium (F. WIDDEL, MPI, Bremen, persönliche Mitteilung)

Grundmedium

NaCl	1,00 g/L
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,10 g/L
NH ₄ Cl	0,25 g/L
KH ₂ PO ₄	0,50 g/L
KCl	0,50 g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,50 g/L
Natriumbenzoat	0,29 g/L
KNO ₃	0,51 g/L

Der pH-Wert wird auf 6,4 eingestellt. Nach dem Autoklavieren werden pro Liter Medium je 1 mL der Spurenelement-Lösung mit EDTA, der Selenit-Wolframat-Lösung und der Vitamin-Lösung zugesetzt. Nach Zugabe von 20 mL Natriumhydrogencarbonatlösung (8,4 %) sollte der pH-Wert zwischen 7,1 und 7,4 liegen.

Spurenelement-Lösung mit EDTA (WIDDEL und BAK, 1992)

Titriplex III	5,80 g/L
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,10 g/L
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	100 mg/L
H ₃ BO ₃	30 mg/L
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	190 mg/L
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	10 mg/L
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	20 mg/L
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	40 mg/L
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	140 mg/L

Der pH-Wert wird mit 1 N NaOH auf 6,0 eingestellt.

Selenit-Wolframat-Lösung (WIDDEL und BAK, 1992)

NaOH	400 mg/L
Na ₂ SeO ₃ · 5 H ₂ O	10 mg/L
Na ₂ WO ₄ · 2 H ₂ O	10 mg/L

Ggf. tritt eine leichte Tübing auf, die Lösung ist trotzdem verwendbar.

Vitaminlösung 2 (WIDDEL und BAK, 1992)

4-Aminobenzoat	40 mg/L
D(+)-Biotin	10 mg/L
Nicotinsäure	100 mg/L
Calcium-D(+)-Pantothenat	125 mg/L
Pyridoxindihydrochlorid	150 mg/L
Thiamin-Hydrochlorid	100 mg/L
Vitamin B ₁₂	100 mg/L

Der pH-Wert wird auf 7,3 eingestellt, die Lösung sterilfiltriert.

Minimalmedium (J. M. MACY, La Trobe University, persönliche Mitteilung)

Grundmedium

NaCl	1,20 g/L
KCl	0,30 g/L
NH ₄ Cl	0,30 g/L
KH ₂ PO ₄	0,20 g/L
Na ₂ SO ₄	0,30 g/L
MgCl ₂ · 6 H ₂ O ²	0,40 g/L
NaHCO ₃	0,60 g/L
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,15 g/L

Ggf. werden pro Liter Medium 4,00 g Hefeextrakt zugesetzt. Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt. Zur Herstellung von Agarplatten und Schrägschichtröhrchen werden 2 % (w/v) Bacto-Agar hinzugegeben. Nach dem Autoklavieren werden pro Liter Medium 10 ml SL-7-Lösung und 5 ml Vitamin-Lösung 1 steril zugesetzt.

Spurenelement-Lösung SL-7 (PFENNIG und TRÜPER, 1981)

HCl (25%; 7,7 M)	6,5 mL/L
FeCl ₂ · 4 H ₂ O	1,50 g/L
ZnCl ₂	70 mg/L
MnCl ₂ · 4 H ₂ O	100 mg/L
H ₃ BO ₃	62 mg/L
CoCl ₂ · 6 H ₂ O	190 mg/L
CuCl ₂ · 2 H ₂ O	17 mg/L
NiCl ₂ · 6 H ₂ O	24 mg/L
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	36 mg/L

FeCl₂ wird in der Salzsäure gelöst, dann wird mit Wasser verdünnt. Anschließend werden die anderen Salze gelöst.

² Die offenbar fehlerhafte Angabe in der Originalarbeit (MACY et al., 1989) wurde korrigiert.

Mineralmedium (BOCK et al., 1995), modifiziert

Grundmedium

NH ₄ Cl	0,54 g/L
KH ₂ PO ₄	0,06 g/L
KCl	0,08 g/L
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05 g/L
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,15 g/L
NaCl	0,59 g/L
Spurenelementlösung 1	1,0 mL/L

Spurenelement-Lösung 1 (BOCK et al., 1995)

MnSO ₄ · 1 H ₂ O	45 mg/L
H ₃ BO ₃	49 mg/L
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	43 mg/L
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	37 mg/L
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	973 mg/L
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	16 mg/L

Die Spurenelemente werden in 0,01 N HCl gelöst. CaCl₂ · 2 H₂O und MgSO₄ · 7 H₂O werden in konzentrierter Form getrennt autoklaviert. Der pH-Wert wird mit 1N NaOH auf 8,0 eingestellt.

Nitrosomonas Medium 221 (ATCC, 1992), modifiziert

Grundmedium

(NH ₄) ₂ SO ₄	3,00 g/L
K ₂ HPO ₄	0,50 g/L
MgSO ₄	0,05 g/L
CaCl ₂	4,0 mg/L
Fe/EDTA Lösung	0,1 mL/L
Fe(III)-Citrat	0,5 mg/L
Phenolrot (0,0005 %)	25,0 mL/L

Fe/EDTA-Lösung 1

EDTA Dinatriumsalz	1,40 g/L
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	5,00 g/L
H ₂ SO ₄ (konz.)	0,50 mL/L

CaCl₂ und MgSO₄ werden in konzentrierter Form getrennt autoklaviert. Der pH-Wert wird mit 50 % K₂CO₃ auf 7,4 eingestellt.

2.4 Mikroorganismen

Die Mischkulturen autotropher Nitrifizierer 1, 2, 3, 4 und 6 wurden aus Proben angereichert, die verschiedenen Stufen der biologischen Vorbehandlung der Kläranlage für Deponiesickerwässer in Mechernich am 03.07.1998 entnommen waren.

Die Probe J enthielt als Sammelprobe einen hohen Anteil des auf dem Scheibentauchkörper aufgewachsenen Biofilms und Abwasser. Sie wurde am 27.04.2000 genommen.

Stamm TL1 war aus einer dem Scheibentauchkörper entnommenen Sammelprobe (Biofilm und Abwasser) isoliert worden (LUKOW, 1996).

Thauera aromatica DSM 6984^T (ANDERS et al., 1995) wurde im Juli 1997 als Schrägschichtröhrchen von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH in Braunschweig bezogen.

Stamm mXyN1 (RABUS und WIDDEL, 1995) wurde uns freundlicherweise im November 1997 von Prof. Dr. F. Widdel, Max-Planck-Institut für Marine Mikrobiologie, Bremen als Flüssigkultur zur Verfügung gestellt.

Thauera selenatis ATCC 55363^T (MACY et al., 1993) wurde uns freundlicherweise im Januar 1998 von Prof. Dr. J. M. Macy, School of Microbiology, La Trobe University, Bundoora, Victoria, Australien als Flüssigkultur zur Verfügung gestellt.

2.5 Versuchsanlagen

2.5.1 Aufbau der Versuchsanlage 1

Für kontinuierliche Kultivierungen wurde ein Biostat B (B. Braun Biotech International, Melsungen) eingesetzt, der aus einer Versorgungseinheit und einem Kulturgefäß mit 2,0 L Arbeitsvolumen besteht.

Die Versorgungseinheit enthält alle erforderlichen Einrichtungen zur Energieversorgung, Belüftung und Zu- und Abfuhr von Kühlwasser. Ein integrierter Single Board Computer beinhaltet alle Systemfunktionen einschließlich Meßverstärker und Stellgliedansteuerung. Die Versorgungseinheit ermöglicht die Regelung von Temperatur, Drehzahl, pH, pO₂, Antischaum, Niveau, Substrat und Gasvolumenstrom. Der Biostat B wurde über eine serielle Schnittstelle RS-422 mit dem MFCS/win-System (B. Braun Biotech International, Melsungen) verbunden. Dieses ist ein modular aufgebautes Client/Server-Softwarepaket, das auf dem Betriebssystem Microsoft Windows NT läuft. Die Servermodule dienen zur Konfiguration und Verwaltung des Systems und arbeiten normalerweise im Hintergrund. Die im Vordergrund laufenden Client-Module werden zur Bedienung des Systems und zur Auswertung der vom System gesammelten Prozeßdaten eingesetzt.

Das autoklavierbare Kulturgefäß Typ B2 ist ein Glasbehälter mit außenliegendem Doppelmantel. Der Gefäßdeckel enthält insgesamt zwölf Durchgänge zur Aufnahme von Meßsonden, Animpfstutzen, Begasungsrohr, Probenahme-, Ablauf- und Abluftstrecke. Vier Schlaucholiven für den Anschluß von Korrekturmittel- und Substratgefäßen sind in die Deckelplatte eingeschweißt. Über eine elastische Kupplung ist ein 180 W-Elektromotor mit der Rührerwelle im Gefäßdeckel verbunden. Auf die Welle sind zwei Sechs-Blatt-Scheibenrührer montiert. Der Drehzahlbereich liegt zwischen 0 und 1200 Upm. Der Betriebsdruck der institutseigenen Druckluftleitung bzw. angeschlossener Gasflaschen wird durch ein Druckminderventil FR 32-B (Riegler&Co KG, Bad Urach) auf 1,0 bar reduziert. Da der in die Kontrolleinheit integrierte Schwebekörperdurchflußmesser nicht zur Einstellung der gewünschten Gasvolumenströme zwischen 20 und 50 mL/min geeignet ist, wird stattdessen der Schwebekörperdurchflußmesser A-125-5 (Porter Instrument Company, Hatfield, PA, USA) eingesetzt. Membranfilter FY 50 (0,2 µm Porenweite, Millipore, Molsheim, Frankreich) gewährleisten die sterile Be- und Entlüftung des Kulturgefäßes. Der pH-Wert wird mit der Einstabmeßkette 405-DPAS-SC-K8S/200 (Mettler-Toledo, Steinbach/Taunus), die Sauerstoffsättigung mit der

Sauerstoffelektrode 12/220 A (Mettler-Toledo, Steinbach/Taunus) gemessen. Für die Konstanzhaltung des Flüssigkeitsvolumens wird eine Einstabmeßsonde, die nach dem Leitfähigkeitsprinzip arbeitet, eingesetzt. Die Kultivierungstemperatur wird mit einem Pt 100 Temperaturfühler erfaßt. Das Thermostatsystem der Versorgungseinheit ermöglicht die Regelung der Kultivierungstemperatur in einem Bereich von 8 °C oberhalb der Kühlwassertemperatur bis 60 °C mit einer Genauigkeit von $\pm 0,1$ °C. Das Kulturgefäß ist über Silikon-schläuche 3997108/2 bzw. 3997141/4 (B. Braun Biotech International, Melsungen) mit den 13 L-Glasgefäßen für Medium und Ernte (Pyrex, Corning, USA) und den 250 mL-Gefäßen für Korrekturmittel verbunden. Alle Schlauchverbindungen werden mit Kabelbindern gesichert. Die kontinuierliche Zufuhr des mit dem Magnetrührer MR 2002 (Heidolph, Kehlheim) gerührten Kultivierungsmediums wird über die Präzisionspumpe Minipuls 3 (Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich) unter Verwendung kalibrierter Vinylschläuche DT316 (Abimed Analysen Technik GmbH, Düsseldorf) reguliert. In Zu- und Ablaufstrecke befinden sich Sterilfallen aus Glas (angefertigt nach Vorlage, Laboratoriumsbedarf und Glasapparatebau Pfeuffer, Hannover). In Abbildung 2.1 ist der Aufbau der Versuchsanlage 1 schematisch dargestellt.

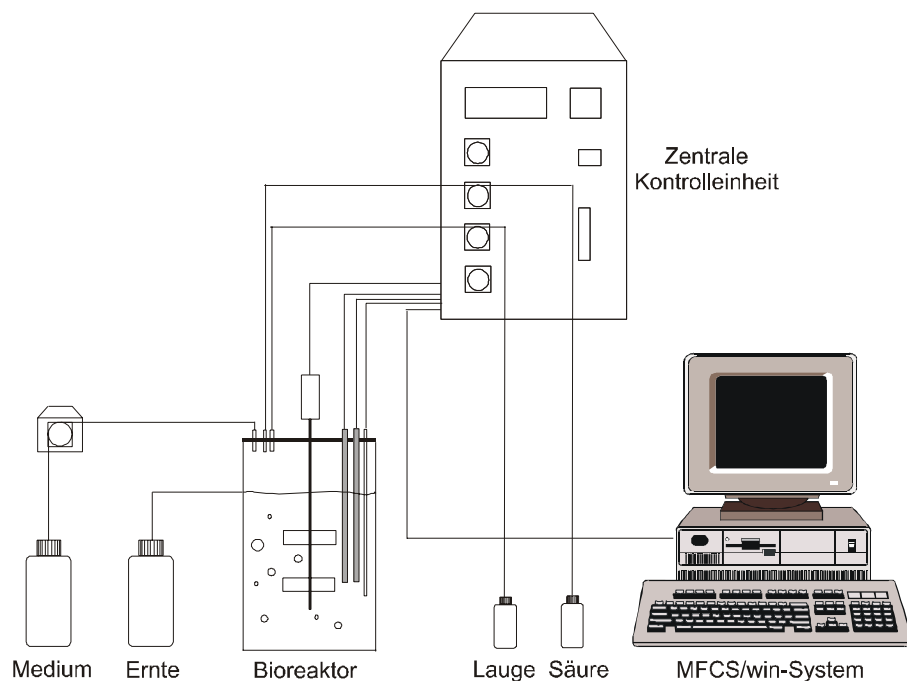


Abb. 2.1: Schematischer Aufbau der Versuchsanlage 1.

Um ein Durchwachsen von *Thauera mechernichensis* TL1 vom Kulturgefäß in das Mediumreservoir zu verhindern, wurde die Glasfalle in der Zulaufstrecke beheizt. Dazu wurden das

Pilz[®]-Heizkabel KTe/022 (Heraeus-Wittmann GmbH, Heidelberg) und die Relais-Box R10 Electronic (MGW, Lauda) eingesetzt (FABY, 1986). Für Kultivierungen mit vollständiger Biomasserückhaltung stand ein Polysulfon-Hohlfaser-Membranmodul SPS 4002-6 (1,25 m², cut off 5 kD, Fresenius, St. Wendel) zur Verfügung. Der Verbrauch an pH-Korrekturmittel wurde über die Waage BP 1200 (Sartorius, Göttingen) als Massenabnahme registriert.

2.5.2 Aufbau der Versuchsanlage 2

Für Versuche, in denen die Betriebsbedingungen weniger genau eingestellt werden konnten, stand ein Chemostat Bioflo C30 (New Brunswick Scientific Co. Inc. Edison, New Jersey, USA) zur Verfügung. Er besteht aus einer Kontrolleinheit und einem autoklavierbaren 0,4 L-Kulturgefäß mit Überlauf. Der magnetisch mit dem Sechs-Blatt-Scheibenrührer verbundene Antrieb und die Belüftungspumpe sind in die Kontrolleinheit integriert. Der Drehzahlbereich liegt zwischen 0 und 1000 Upm. Die Belüftungsrate wird mit Hilfe eines Schwebekörperdurchflußmessers eingestellt. Das Begasungsmedium wird durch einen Millex-Filter FY 50 (Millipore, Molsheim, Frankreich) in den Reaktor geführt. Im Deckel des Gefäßes sind die Meßelektroden (pH, pO₂), das Kontrollthermometer 884432/1 (B. Braun Biotech International, Melsungen), ein wassergespeicherter Heizfinger sowie die Durchlässe zur Medien- und pH-Korrekturmittelzugabe angeordnet. Der pH-Wert wird mit der Ingold-Elektrode 405 (Mettler-Toledo, Steinbach/Taunus), die Sauerstoffsättigung mit einer modifizierten Ingold-Sauerstoffstoffscheibenelektrode (angefertigt im Institut für Technische Chemie, Universität Hannover) gemessen. Für die Regelung des pH-Wertes wird ein älterer Meß-, Regel- und Registrierschrank 826988/2³ mit dem pH-Meter Einschub 883202/1, dem pH-Regler Einschub 883262/5 und der Schlauchpumpe 883900/0 (alle B. Braun Biotech International, Melsungen) eingesetzt. Der Verbrauch des pH-Korrekturmittels wird über ein mechanisches Zählwerk registriert. Die Arbeitstemperatur wird über den Thermostat Fe2 (Haake, Berlin) konstant gehalten. Die kontinuierliche Zufuhr des Kultivierungsmediums wird über die Präzisionspumpe Minipuls 2 (Gilson, Villiers Le Bel, Frankreich) unter Verwendung kalibrierter Vinylschläuche DT142 (Abimed Analysen Technik GmbH, Düsseldorf) reguliert. Zwischen Vorratsgefäß und Fermenter ist eine Bakterienfalle aus Glas (angefertigt nach Vorlage, Laboratoriumsbedarf und Glasapparatebau Pfeuffer, Hannover) angebracht.

³ Dieser wurde 1982 als Sonderanfertigung von der B. Braun Melsungen, Melsungen bezogen.

2.6 Kulturbedingungen

2.6.1 Anreicherung autotropher Nitrifizierer

Die Anreicherung autotropher Nitrifizierer erfolgt in Reagenzgläsern mit 4 mL *Nitrosomonas*-Medium 221 (ATCC, 1992, modifiziert) bzw. Mineralmedium (BOCK et al., 1995, modifiziert) bei 27 °C im Dunkeln. Zum Test auf Nitrifikationsaktivität werden in den Kulturen der pH-Wert und die Konzentrationen an Nitrit und Nitrat mit Teststäbchen (Merckoquant 1.10007. bzw. 1.10020.; Merck, Darmstadt) bestimmt. Die Anreicherung wurde freundlicherweise von Frau Inge Reupke durchgeführt.

2.6.2 Stammhaltung

Die Anreicherungskulturen autotropher Nitrifizierer werden alle fünf Wochen in frisches Mineralmedium (BOCK et al., 1995, modifiziert) überimpft (10 % Inokulum) und bis zum Auftreten einer leichten Trübung des Kulturmediums bei 27 °C im Dunkeln inkubiert. Während dieser Zeit, etwa drei bis sieben Tage, wird der pH-Wert des Mediums durch Zugabe von Kaliumcarbonatlösung (50 %) auf 7,4 gehalten (*Nitrosomonas*-Medium 221; ATCC, 1992). Anschließend werden die Kulturen ohne weitere pH-Korrektur bei 17 °C im Dunkeln gelagert. TL1 und *T. selenatis* werden zur Stammhaltung alle fünf Wochen auf frische Schrägröhrchen, *T. aromatica* wird alle fünf Wochen auf frische Agarplatten überimpft. TL1 wird etwa 36 h bei 37 °C auf Medium 2 inkubiert, *T. selenatis* 48 h bei 30 °C auf Minimalmedium mit Hefeextrakt und *T. aromatica* 48 h bei 30 °C auf Medium 586. Danach werden die Kulturen bei 4 °C gelagert. Stamm mXyN1 wird für 36 h als Standkultur bei 30 °C in 60 mL-Serumflaschen mit 50 mL des definierten Süßwassermediums kultiviert und anschließend bei 4 °C gelagert. Alle zehn Wochen werden die Zellen in frisches Medium überimpft (10 % Inokulum).

Die Langzeitkonservierung von TL1 erfolgt wie bei JAHNKE (1990) beschrieben als Lyophilisat. Das Zellmaterial aus zwei frischen Schrägröhrchen wird in 1,2 mL steriler Magermilchlösung (10 % w/v) resuspendiert, aliquotiert (0,2 mL) und für 24 h in Lyophilisationsröhrchen bei -25 °C eingefroren. Die Gefriertrocknung erfolgt in der Gefriertrocknungsanlage Lyovac GT2 (Finn-Aqua Santasalo-Sohlberg GmbH, Hürth).

2.6.3 Batchkultivierung und Zellernte

2.6.3.1 Zellanzucht zur DNA-Präparation

Anzucht von TL1

Mit je einer Impföse voll Zellmaterial einer frischen Stammkultur werden 2 · 10 mL Medium 2 in 100 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane beimpft (1. Vorkultur). Nach Inkubation über Nacht bei 37 °C und 120 Upm werden die Ansätze in 100 mL Medium 2 in 500 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane überführt (2. Vorkultur). Die Inkubation erfolgt unter obigen Bedingungen für ca. 4 h. Mit je 10 mL dieser Ansätze werden dann 15 · 100 mL Medium 2 beimpft und unter identischen Bedingungen inkubiert (Hauptkultur). Nach 5 h haben die Kulturen eine OD₅₇₈ von etwa 3,0 und werden geerntet. Die Zellen werden in der Cryofuge 6-6 (Heraeus Christ GmbH, Osterode) für 30 Minuten bei 3000 Upm abgetrennt und zweimal mit Saline-EDTA (0,15 M/0,10 M, pH 8,0) gewaschen. Die Pellets (ca. 2,5 g BFM) werden bei -20 °C eingefroren.

Anzucht von *T. selenatis*

T. selenatis wird im Minimalmedium mit 0,4 % Hefeextrakt, 20mM Acetat und 20mM Nitrat (MACY et al., 1993) bei 30 °C und 120 Upm angezogen. Mit Zellmaterial einer frischen Stammkultur werden 2 · 10 mL Medium in 100 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane beimpft und für 24 h inkubiert (Vorkultur). Mit diesen Ansätzen werden 2 · 100 mL dieses Mediums in 500 mL Erlenmeyerkolben beimpft und unter identischen Bedingungen für 24 h inkubiert (Hauptkultur). Die Ernte erfolgt bei 10000 Upm für 10 Minuten in der Zentrifuge des Typs Sorvall RC-5B mit GSA-Rotor (Du Pont de Nemours Deutschland GmbH, Bad Nauheim). Nach zweimaligem Waschen in Saline-EDTA werden die Pellets (ca. 2,0 g BFM) bei -20 °C gelagert.

Anzucht von *T. aromatica* K172

Die Anzucht von *T. aromatica* K172 erfolgt in Medium 586 bei 30 °C und 120 Upm. Es werden 2·10 mL Medium in 100 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane beimpft, für 24 h inkubiert (1. Vorkultur) und anschließend in je 100 mL Medium in 500 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane überführt (2. Vorkultur). Nach Inkubation für 24 h werden mit je 10 mL dieser Ansätze 18 · 100 mL Medium in 500 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane beimpft (Hauptkultur). Diese erreichen nach Inkubation für 24 h eine OD₅₇₈ von etwa 1,0. Die Zellen

(ca. 1,8 g BFM) werden in der Cryofuge 6-6 abgetrennt, zweimal mit Saline-EDTA gewaschen (s. o.) und bei -20 °C eingefroren.

Anzucht von Stamm mXyN1

Der Stamm mXyN1 wird als ruhende Kultur im definierten Süßwassermedium bei 30 °C angezogen. Die Ansätze werden täglich leicht geschwenkt. Mit je 5 mL einer Stammkultur werden 4 · 50 mL Medium beimpft (Vorkultur). Die Inkubation erfolgt für 48 h in mit Gummistopfen und Aluminiumkappen gasdicht verschlossenen 60 mL-Serumflaschen. Mit je 20 mL dieser Ansätze werden 8 · 800 mL Medium in überdruckgesicherten 1000 mL-Schottflaschen (mit Gummistopfen und durchbohrten Schraubverschlüssen gasdicht verschlossen) beimpft (Hauptkultur). Nach 48 h haben die Kulturen eine OD₅₇₈ von etwa 0,4 erreicht und werden geerntet. Die Zellen (ca. 1,8 g BFM) werden in der Cryofuge 6-6 abgetrennt, zweimal mit Saline-EDTA gewaschen (s. o.) und bei -20 °C eingefroren.

2.6.3.2 Zellanzucht für biochemische Experimente

Zellanzucht für den N₂O-Nachweis

Die Zellen werden bei 37 °C und 120 Upm in Medium 1 mit KNO₃ und MgSO₄ · 7H₂O unter aeroben Bedingungen angezogen. Die Inkubation erfolgt für 12 h in 2 · 10 mL Medium in 100 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane (Vorkultur) bzw. 4 h in 2 · 100 mL Medium in 500 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane (Hauptkultur, 10 %ig beimpft mit der Vorkultur). Die Zellen der Hauptkultur werden mit der Zentrifuge RC-5B mit GSA-Rotor (Du Pont de Nemours Deutschland GmbH, Bad Nauheim) abgetrennt (10000 Upm, 10 Minuten bei Raumtemperatur) und in 12 mL des sterilen Mediums aufgenommen und resuspendiert.

Zellanzucht für Nitrat-Reduktase-Tests

Die Zellen werden bei 37 °C und 120 Upm in Medium 1 mit KNO₃ und MgSO₄ · 7H₂O angezogen. Die Inkubation unter aeroben Bedingungen erfolgt für 12 h in 2 · 16 mL Medium in 100 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane (Vorkultur) bzw. 4 h in 2 · 100 mL Medium in 500 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane (Hauptkultur, 10 %ig beimpft mit der Vorkultur). Für die Anzucht der Zellen unter anaeroben Bedingungen werden die gleichen Volumina des Mediums in 17 mL-Hungateröhrchen bzw. in gasdicht verschlossenen 125 mL-Serumflaschen eingesetzt. Vor dem Autoklavieren wurde das Medium mit O₂-freiem Stickstoff begast

(MILLER und WOLIN, 1974). Die Inkubation der Vorkulturen erfolgt für 20 h, die der Hauptkulturen für 40 h. Die Zellen der Hauptkulturen werden mit der Zentrifuge RC-5B mit GSA-Rotor abgetrennt (s. o.), in sterilem nitratfreiem Medium gewaschen und in 20 mL Tris/HCl (pH 6,8) resuspendiert.

2.6.4 Kontinuierliche Kultur

2.6.4.1 Kultivierung

Die Versuche in kontinuierlicher Kultur werden in den unter 2.4 beschriebenen Versuchsanlagen 1 und 2 durchgeführt.

2.6.4.2 Probenahme und Aufbereitung

Proben werden über die Probenahmestrecke (Versuchsanlage 1) bzw. dem Ablauf der kontinuierlichen Kultur (Versuchsanlage 2) entnommen und sofort im Eisbad gekühlt. Die Bestimmung der OD_{578} , der Biotrockenmassekonzentration und der Gesamtzellzahl erfolgt direkt in der Kulturbrühe. Zur Bestimmung der Konzentrationen an Ammonium, Nitrit, Nitrat, Acetat, CSB, Glycerin, gelöstem Protein und zellulärem Protein werden 2 mL-Proben bei 4 °C in Eppendorfreaktionsgefäßen in der Zentrifuge 202 M mit Rotor 12045 (Sigma, Osterode am Harz) abzentrifugiert (30 min, 13000 Upm). Die Messung erfolgt entweder sofort im Überstand (Ammonium, Nitrit, Nitrat, Acetat, CSB, Glycerin), oder dieser bzw. das Pellet wird bis zur Bestimmung bei -18 °C eingefroren (gelöstes bzw. zelluläres Protein).

2.6.4.3 Berechnung der Umsatzraten

Die Stoffmengenbilanz für Ammonium in einem kontinuierlichen Prozeß (Abbildung 2.2) kann bei vollständiger Durchmischung, konstantem Flüssigkeitsvolumen V und vernachlässigbar kleiner Flußrate F_K ($F_E=F_A=F$) entsprechend Gleichung 2.1 formuliert werden. Mit $r_{\text{NH}_4^+}$ [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$] ist die Rate des Ammoniumverbrauchs (negativ) bezeichnet.

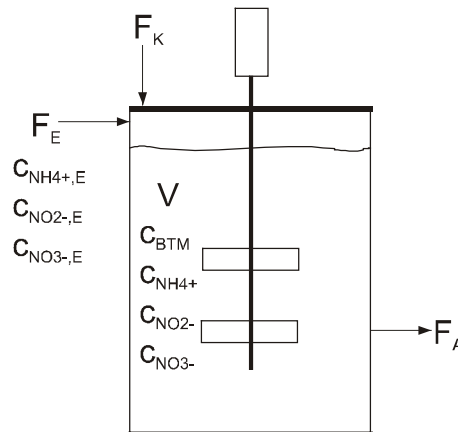


Abb. 2.2: Schema eines Nitrifikations-/ Denitrifikationsprozesses in einem kontinuierlich betriebenen Reaktor mit zellfreiem Zulauf. F =Flußrate [$\text{L}\cdot\text{h}^{-1}$], c_{BTM} =Biotrockenmassekonzentration [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$], $c_{\text{NH}_4^+}$, $c_{\text{NO}_2^-}$, $c_{\text{NO}_3^-}$ =Konzentrationen an Ammonium, Nitrit und Nitrat [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$], E= Einlauf, A=Auslauf, K=Korrekturmittel.

$$\frac{dc_{\text{NH}_4^+}}{dt} = r_{\text{NH}_4^+} + \frac{F}{V} \cdot c_{\text{NH}_4^+,E} - \frac{F}{V} \cdot c_{\text{NH}_4^+} \quad [\text{mmol NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2.1)$$

Zur Berechnung der Nitrifikationsrate muß neben der Rate des Ammoniumverbrauchs auch der Einbau des Ammoniumstickstoffs in die Biomasse berücksichtigt werden (ROBERTSON et al., 1988). Nach Einführung der Verdünnungsrate D ($D=F/V$) werden die volumetrische Nitrifikationsrate $v\text{NR}$ und die spezifische Nitrifikationsrate $s\text{NR}$ unter steady-state-Bedingungen ($dc_{\text{NH}_4^+}/dt=0$) durch die Gleichungen 2.2 und 2.3 beschrieben (LUKOW, 1996).

$$v\text{NR} = D \cdot (\Delta c_{\text{NH}_4^+} + c_{\text{N-BTM}}) \quad [\text{mmol NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2.2)$$

$$s\text{NR} = D \cdot (\Delta c_{\text{NH}_4^+} + c_{\text{N-BTM}}) / c_{z\text{Prot}} \quad [\text{mmol NH}_4^+ \cdot (\text{mg } z\text{Prot})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2.3)$$

- D = Verdünnungsrate [h^{-1}]
 $\Delta c_{\text{NH}_4^+}$ = Konzentrationsdifferenz (Auslauf-Einlauf) für Ammonium [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]
 $c_{\text{N-BTM}}$ = Konzentration des in der BTM festgelegten Stickstoffs [$\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$]
 $c_{z\text{Prot}}$ = Konzentration des zellulären Proteins [$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$]

Zur Berechnung der (totalen) Denitrifikationsraten müssen oxidiertes und anschließend reduziertes Ammonium plus reduziertes Nitrit und Nitrat sowie der Einbau des Ammoniumstickstoffs in die Biomasse berücksichtigt werden (ROBERTSON et al., 1988). Unter steady-state-Bedingungen werden die volumetrische Denitrifikationsrate vDR und die spezifische Denitrifikationsrate sDR durch die Gleichungen 2.4 und 2.5 beschrieben (LUKOW, 1996).

$$vDR = D \cdot (\Delta c_{\text{NH}_4^+} + \Delta c_{\text{NO}_2^-} + \Delta c_{\text{NO}_3^-} + c_{\text{N-BTM}}) \quad [\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2.4)$$

$$sDR = D \cdot (\Delta c_{\text{NH}_4^+} + \Delta c_{\text{NO}_2^-} + \Delta c_{\text{NO}_3^-} + c_{\text{N-BTM}}) / c_{z\text{Prot}} \quad [\text{mmol} \cdot (\text{mg } z\text{Prot})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2.5)$$

D	= Verdünnungsrate [h ⁻¹]
$\Delta c_{\text{NH}_4^+}$	= Konzentrationsdifferenz (Auslauf-Einlauf) für Ammonium [mmol·L ⁻¹]
$\Delta c_{\text{NO}_2^-}$	= Konzentrationsdifferenz (Auslauf-Einlauf) für Nitrit [mmol·L ⁻¹]
$\Delta c_{\text{NO}_3^-}$	= Konzentrationsdifferenz (Auslauf-Einlauf) für Nitrat [mmol·L ⁻¹]
$c_{\text{N-BTM}}$	= Konzentration des in der BTM festgelegten Stickstoffs [mmol·L ⁻¹]
$c_{z\text{Prot}}$	= Konzentration des zellulären Proteins [mg·L ⁻¹]

Für den Fall des konstanten Volumens V bei nicht vernachlässigbar kleiner Flußrate des Korrekturmittels F_K (F_E+F_K=F_A=F) und Vorliegen des steady-state müssen die Durchflußrate und die Konzentrationsdifferenzen anders als in den Gleichungen 2.2 bis 2.5 berechnet werden. Sie sind durch die Gleichungen 2.6 und 2.7 (exemplarisch für Ammonium) gegeben.

$$D = \frac{(F_E + F_K)}{V} = \frac{F_A}{V} \quad [\text{h}^{-1}] \quad (2.6)$$

$$\Delta c_{\text{NH}_4^+} = c_{\text{NH}_4^+} - \frac{F_E}{(F_E + F_K)} \cdot c_{\text{NH}_4^+,E} \quad [\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}] \quad (2.7)$$

Die Stoffmengenbilanzen für Ammonium, Nitrit und Nitrat und die Massenbilanzen der Biotrockenmasse und des gelösten Proteins des in Abbildung 2.3 dargestellten Prozesses können bei vollständiger Durchmischung mit den Gleichungen 2.8 bis 2.12 formuliert werden.

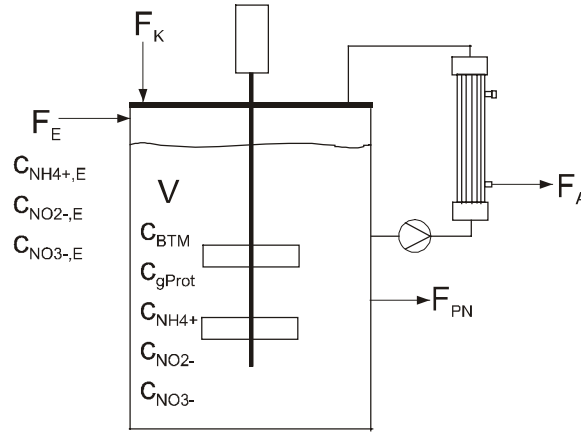


Abb. 2.3: Schema eines Nitrifikationsprozesses in einem kontinuierlich betriebenen Reaktor mit vollständiger Biomasserückhaltung und zell- und proteinfreiem Zulauf. F =Flußrate [$L \cdot h^{-1}$], c_{BTM} = Biotrockenmassekonzentration [$mg \cdot L^{-1}$], c_{gProt} =Konzentration des gelöst vorliegenden Proteins [$mg \cdot L^{-1}$], c_{NH4+} , c_{NO2-} , c_{NO3-} =Konzentrationen an Ammonium, Nitrit und Nitrat [$mmol \cdot L^{-1}$], E=Einlauf, A=Auslauf, K=Korrekturmittel, PN=Probenahme.

Mit r_{NH4+} , r_{NO2-} und r_{NO3-} [$mmol \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$] sind die Raten des Ammoniumverbrauchs (negativ) und der Nitrit- bzw. Nitratbildung (positiv) bezeichnet. r_{BTM} und r_{gProt} [$mg \cdot L^{-1} \cdot h^{-1}$] sind die Bildungsrate (positiv) der Biotrockenmasse und des gelösten Proteins.

$$\frac{d(V \cdot c_{NH4+})}{dt} = r_{NH4+} \cdot V + F_E \cdot c_{NH4+,E} - (F_A + F_{PN}) \cdot c_{NH4+} \quad [mmol \cdot h^{-1}] \quad (2.8)$$

$$\frac{d(V \cdot c_{NO2-})}{dt} = r_{NO2-} \cdot V + F_E \cdot c_{NO2-,E} - (F_A + F_{PN}) \cdot c_{NO2-} \quad [mmol \cdot h^{-1}] \quad (2.9)$$

$$\frac{d(V \cdot c_{NO3-})}{dt} = r_{NO3-} \cdot V + F_E \cdot c_{NO3-,E} - (F_A + F_{PN}) \cdot c_{NO3-} \quad [mmol \cdot h^{-1}] \quad (2.10)$$

$$\frac{d(V \cdot c_{BTM})}{dt} = r_{BTM} \cdot V - F_{PN} \cdot c_{BTM} \quad [mg \cdot h^{-1}] \quad (2.11)$$

$$\frac{d(V \cdot c_{gProt})}{dt} = r_{gProt} \cdot V - (F_A + F_{PN}) \cdot c_{gProt} \quad [mg \cdot h^{-1}] \quad (2.12)$$

Für den Fall des konstanten Volumens V bei vernachlässigbar kleiner Flußrate F_{PN} ($F_E + F_K = F_A$) und Vorliegen des steady-state werden die Nitrifikationsraten vNR und sNR durch die Gleichungen 2.13 und 2.14 beschrieben. Die Durchflußrate und die Konzentrationsdifferenzen sind dabei entsprechend Gleichung 2.6 und 2.7 zu berechnen. Mit $c_{N-gProt}$ ist die Konzentration des im gelösten Protein vorhandenen Stickstoffs [$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$] bezeichnet.

$$vNR = D \cdot (\Delta c_{\text{NH}_4^+} + c_{\text{N-gProt}}) \quad [\text{mmol NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2.13)$$

$$sNR = D \cdot (\Delta c_{\text{NH}_4^+} + c_{\text{N-gProt}}) / c_{zProt} \quad [\text{mmol NH}_4^+ \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2.14)$$

Für den allgemeinen Fall werden die Nitrifikationsraten vNR und sNR durch die Gleichungen 2.15 und 2.16 beschrieben. Der Einbau des Ammoniumstickstoffs in die Biomasse bzw. in gelöstes Protein wird mit den Raten r_{N-BTM} bzw. $r_{N-gProt}$ berücksichtigt. Man erhält sie aus den Massenbilanzen (Gleichungen 2.11 und 2.12) unter Berücksichtigung der Konzentrationen des in der BTM bzw. im gelösten Protein festgelegten Stickstoffs.

$$vNR = r_{\text{NH}_4^+} + r_{\text{N-BTM}} + r_{\text{N-gProt}} \quad [\text{mmol NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2.15)$$

$$sNR = (r_{\text{NH}_4^+} + r_{\text{N-BTM}} + r_{\text{N-gProt}}) / c_{zProt} \quad [\text{mmol NH}_4^+ \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}] \quad (2.16)$$

2.7 Meß- und Analysemethoden

2.7.1 Optische Dichte

Die Bestimmung der optischen Dichte OD_{578} erfolgt mit dem Photometer 1101 M (Eppendorf Gerätebau, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 578 nm unter Verwendung der Rechteckblende 1770 und der Schlitzblende $2,5 \cdot 5$ mm in Plastikkuvetten von 1 cm Schichtdicke. Die Proben werden mit Leitungswasser auf eine OD_{578} zwischen 0,1 und 0,3 eingestellt und gegen Leitungswasser gemessen.

2.7.2 Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl wird mit der Thoma-Zählkammer (Hecht, Sondheim/Rhön) mit einer Tiefe von 0,02 mm bestimmt. Vier diagonale Großquadrate werden mit einem Standard-Labormikroskop (Zeiss, Oberkochen) bei 400facher Vergrößerung ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wird mit der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Zellen/mL} = \frac{\text{Zellen pro Großquadrat}}{8} \cdot 10^7 \quad (2.17)$$

2.7.3 Biotrockenmasse

Die Biotrockenmassekonzentration wird wie bei BEUSE (1998) beschrieben mit der Membranfiltermethode (KOCH, 1994) bestimmt. Celluloseacetat-Membranfilter OE66 (Schleicher und Schüll GmbH, Dassel) werden 10 Minuten im Exsikkator getrocknet und auf der Analysenwaage A 120 S (Sartorius GmbH, Göttingen) gewogen. Ein Aliquot Probe (je nach OD_{578} -Wert 20 bis 30 mL) wird auf den mit bidestilliertem Wasser vollständig befeuchteten Filter gegeben und abgenutscht. Es wird mit 10 mL Bidest gewaschen. Nach sieben Trocknungszyklen in der Mikrowelle über je 2 Minuten mit aufsteigender Leistungsstufe und anschließender Trocknung für 10 Minuten im Exsikkator erfolgt die Ermittlung der Gewichts Differenz Δm_{BTM} . Unter Berücksichtigung des durch die Mikrowellenbehandlung verursachten Gewichtsverlusts des Filters Δm_{Filter} (gemittelt aus 4 Einzelmessungen) und dem filtrierten Probenvolumen V_P wird die Biotrockenmassekonzentration c_{BTM} berechnet:

$$c_{\text{BTM}} = \frac{\Delta m_{\text{BTM}} + \Delta m_{\text{Filter}}}{V_P} \quad (2.18)$$

2.7.4 Protein

Die Bestimmung des Proteingehalts erfolgt nach der bei COOPER (1981) beschriebenen Methode von LOWRY et al. (1951). Die Extinktionsmessungen werden im Spektralphotometer LKB Ultrospec III (Pharmacia, Freiburg) bei 540 nm in Küvetten aus optischem Spezialglas (Helma, Mülheim) durchgeführt. Zusätzlich zu den Proben werden mit Rinderserumalbumin hergestellte Kalibrierstandards (0 bis 300 mg/L) bestimmt. Die Konzentrationen der Proben werden aus der mittels linearer Regression berechneten Kalibriergeraden ermittelt.

2.7.5 Ammonium

Die Bestimmung der Ammoniumkonzentration wird mit dem Küvettentest LCK 303 (Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin) durchgeführt. Der Meßbereich liegt bei 2,5 - 60 mg/L. Der Nachweis beruht auf der Reaktion von Ammoniumionen bei pH 12,6 mit Hypochloritionen und Saliylationen in Gegenwart von Natriumnitroprussid als Katalysator. Der Test wird entsprechend der beiliegenden Vorschrift durchgeführt. Das Photometer LP2W (Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin) rechnet die bei einer Wellenlänge von 695 nm gemessenen Extinktionen in Konzentrationen um.

2.7.6 Nitrit

Die Messung der Nitritkonzentration erfolgt mit dem Küvettentest LCK 341 (Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin). Der Meßbereich liegt bei 0,05 - 2,0 mg/L. Der Nachweis beruht auf der Reaktion von Nitriten mit primären, aromatischen Aminen in saurer Lösung unter Bildung von Diazoniumsalzen. Diese bilden mit aromatischen Verbindungen, die eine Amino- oder Hydroxygruppe enthalten, intensiv gefärbte Azofarbstoffe. Der Test wird entsprechend der mitgelieferten Vorschrift durchgeführt. Das Photometer LP2W (Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin) rechnet die bei einer Wellenlänge von 535 nm gemessenen Extinktionen in Konzentrationen um.

2.7.7 Nitrat

Die Konzentration an Nitrationen wird mit dem Küvettentest LCK 339 (Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin) erfaßt. Der Meßbereich liegt bei 1 - 60 mg/L. Der Nachweis beruht auf der in schwefel- und phosphorsaurer Lösung stattfindenden Reaktion von Nitrationen mit 2,6-Dimethylphenol zu 4-Nitro-2,6-dimethylphenol. Der Test wird entsprechend der beiliegenden Vorschrift durchgeführt. Das Photometer LP2W (Dr. Bruno Lange GmbH,

Berlin) rechnet die bei einer Wellenlänge von 340 nm gemessenen Extinktionen in Konzentrationen um. Da Nitritkonzentrationen über 2,0 mg/L zu Mehrbefunden führen, wird bei entsprechend hohen Nitritkonzentrationen eine Spatelspitze Amidosulfonsäure zugesetzt.

2.7.8 Distickstoffoxid

Distickstoffoxid wird mit dem Gaschromatographen CP 9002 (Chrompack B. V., Middelburg, Niederlande) unterstützt durch das Computerprogramm Maestro nachgewiesen. Als stationäre Phase dient eine PoraPLOT Q-Kapillarsäule (10 m x 0,32 mm). Stickstoff 5.0 (Linde AG, Höllriegelskreuth) wird als Träger-, Make-up bzw. Purge-Gas (Volumenströme 40, 35, 15 mL/min) verwendet. Die Temperaturen von Injektor, Säule und ECD-Detektor betragen 35, 30 und 200 °C. Mit einer gasdicht verschließbaren 250 µL-Spritze (Precision Sampling Corporation, Baton Rouge, Louisiana, USA) werden 50 µL-Proben injiziert.

2.7.9 Acetat

Die Bestimmung des Acetatgehaltes wird mit dem Gaschromatographen GC-9 AM mit angeschlossenem Integrator C-R6A Chromatopac (Shimadzu Corporation, Düsseldorf) durchgeführt. Als stationäre Phase dient eine mit Chromosorb (80/100 mesh) gefüllte PTFE-Säule von 3,0 m Länge. Als mobile Phase wird Stickstoff 5.0 (Linde AG, Höllriegelskreuth) mit einem Volumenstrom von 50 mL/min eingesetzt. Die Temperaturen von Injektor, Säule und FID-Detektor betragen 220, 160 und 220 °C. Vor der Injektion werden die Proben mit 4 %iger H₃PO₄-Lösung angesäuert (HEPPNER, 1992). Unter Verwendung einer 10 µL-Spritze mit fixierbarem Stempel (Hamilton Bonaduz AG, Bonaduz, Schweiz) werden jeweils 5 µL injiziert. Für die Kalibriermessungen wird ein mit 4 %iger H₃PO₄-Lösung angesäuertes 0,02 N Essigsäurestandard verwendet.

2.7.10 Glycerin

Die Glycerinkonzentration wird enzymatisch (Test 148270; Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim) erfaßt. Die Bestimmungsgrenze liegt bei 0,5 mg/L. Der Test wird entsprechend der Vorschrift durchgeführt. Die Messungen erfolgen am Festwellenphotometer 1101 M (Eppendorf Gerätebau, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 365 nm in 1 cm-Küvetten aus optischem Spezialglas.

2.7.11 Chemischer Sauerstoffbedarf

Die Bestimmung des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) erfolgt mit dem Küvettentest LCK 414 (Dr. Bruno Lange GmbH, Berlin). Der Meßbereich liegt bei 5 - 60 mg/L. Der Nachweis beruht auf der Reaktion oxidierbarer Stoffe mit schwefelsaurer Kaliumdichromatlösung in Gegenwart von Silbersulfat als Katalysator. Chlorid wird mit Quecksilbersulfat maskiert. Ausgewertet wird die Abnahme der Gelbfärbung des Cr^{6+} .

2.8 Taxonomische Untersuchungen

2.8.1 Mikroskopie

Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Untersuchungen werden an einem Standard-Labormikroskop 16 (Zeiss, Oberkochen) bei 1000facher Vergrößerung unter Verwendung eines Ölimmersionsobjektivs durchgeführt. Für Längenmessungen werden ein Okularmikrometer (10x) und ein Objektmikrometer (beide Zeiss, Oberkochen) eingesetzt.

Fluoreszenzmikroskopie

Fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen werden am Mikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen) bei 1000facher Vergrößerung unter Verwendung des Ölimmersionsobjektivs Plan Neofluar (100x/1,30) durchgeführt.

Rasterelektronenmikroskopie

Rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen werden an dem Digital Scanning Microscope DSM 940 (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Die Probenvorbereitung erfolgt nach CHANG und RITTMANN (1986) unter Verwendung der Kritisch-Punkt-Apparatur CPD 030 und der Kathodenzerstäubungsanlage SCD 040 (beide Balzers Union, Balzers, Liechtenstein), die Probenfixierung nach der Methode von ROBINSON et al. (1984). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden freundlicherweise von Frau Armgard Janczikowski angefertigt.

Transmissionselektronenmikroskopie

Transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen werden im Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover am Elektronenmikroskop EM 10A (Zeiss, Oberkochen) durchgeführt. Nach der Semi-Simultan-Fixierung (LEHMANN und SCHULZ, 1982) für 30 Minuten werden die Proben entwässert, zunächst über Nacht im Exsikkator über Aceton und CaCl_2 (PLATTNER, 1973) und anschließend in einer Reihe mit aufsteigender Acetonkonzentration (je 2x15 Minuten bei 80, 85, 90, 95, 100 und 100 % abs.). Die Präparate werden in Durcopan ACM eingebettet (Polymerisation für 24 Stunden bei 40 °C und anschließend für 48 Stunden bei 60 °C). Nach dem Trimmen der Kunststoffblöcke im Präparatebereich am Pyramitom LKB 11800 (LKB, Bromma, Schweden) werden am

Ultramikrotom FC 2 (Reichert, Wien, Österreich) mit Glasmessern Ultradünnschnitte angefertigt. Die Positivkontrastierung der Schnitte erfolgt mit Uranylacetat (WATSON, 1958) und Bleicitrat (REYNOLDS, 1963).

2.8.2 Wachstum auf verschiedenen Substraten

Die Untersuchung von TL1 auf Wachstum auf verschiedenen Substraten als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle erfolgt bei 37 °C und 120 Upm in 100 mL Medium 1 mit Kaliumnitrat. Acetat wird durch die jeweilige Verbindung (5 mM) ersetzt. Die aerobe Kultivierung erfolgt in 500 mL Erlenmeyerkolben ohne Schikane. Für die anaerobe Kultivierung werden 125 mL-Serumflaschen (anaerob) eingesetzt. Vor dem Autoklavieren wurde das Medium mit O₂-freiem Stickstoff begast (MILLER und WOLIN, 1974).

2.8.3 Optimale Wachstumstemperatur

Zur Ermittlung der optimalen Temperatur für das Wachstum wird TL1 als ruhende Kultur in 100 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane mit 12 mL Medium 2 kultiviert. In auf 34, 37, 40 und 44 °C temperierten Wasserbädern (Kontrolle mit einem amtlich geeichten Laborthermometer) werden je drei Parallelansätze inkubiert. Es wird zugrunde gelegt, daß im Bereich niedriger Werte der Zelldichte diese der optischen Dichte proportional ist (EINSELE et al., 1985); das Wachstum wird daher über die Messung der optischen Dichte OD₅₇₈ verfolgt. Die maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} wird aus dem linearen Bereich der einfach logarithmisch aufgetragenen Wachstumskurve ermittelt.

2.8.4 Poly- β -hydroxybuttersäure als Speicherprodukt

Der Nachweis auf PHB-Bildung erfolgt nach der bei SMIBERT und KRIEG (1994) beschriebenen Methode von OSTLE und HOLT (1982). TL1 wird als Schüttelkultur in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit 10 mL Medium 1 ohne und mit Nitrat angezogen. Nach zehnstündiger Inkubation bei 37 °C werden hitzefixierte Ausstriche der Kulturen hergestellt. Eine wäßrige Lösung (1 % w/v) von Nilblausulfat wird frisch angesetzt, filtriert (185 mm-Faltenfilter, Schleicher und Schüll, Dassel) und im Wasserbad auf 55 °C temperiert. Die Färbung der Ausstriche erfolgt für 10 Minuten. Überschüssiger Farbstoff wird mit Leitungswasser abgespült. Die Ausstriche werden für 1 Minute in eine wäßrige Essigsäurelösung (8 % w/v) getaucht, mit Leitungswasser abgespült und mit Filterpapier trocken getupft. Nach dem erneuten Befeuchten mit Leitungswasser werden die Ausstriche mit einem Deckglas versehen und mikroskopiert. Das Photomikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen) wird als Licht- und Fluoreszenzmikroskop

eingesetzt. Der verwendete Filtersatz 487905 (Zeiss, Oberkochen) besteht aus dem Anregungsfilter BP 395-440, dem Farbteiler FT 460 und dem Sperrfilter LP 470. Ausgezählt werden drei zufällig gewählte Gesichtsfelder mit ca. 35 einzeln liegenden Zellen pro Gesichtsfeld. Durch die Färbung mit Nilblausulfat-Lösung sind PHB-Granula an ihrem hellorangenen Fluoreszenzlicht zu erkennen.

2.8.5 N₂O-Bildung

Der Nachweis von N₂O als Produkt der Denitrifikation von TL1 unter anaeroben Bedingungen erfolgt nach den Angaben von FUCHS (persönliche Mitteilung) in gasdicht verschlossenen 60 mL-Serumflaschen mit 50 mL O₂-freiem Medium 1. Die Konzentration an Kaliumnitrat beträgt 1,20 g/L. Zwei Ansätze werden mit je 5 mL der resuspendierten Zellen (OD₅₇₈=20) beimpft und bei 37 °C und 170 Upm inkubiert. Mit einer gasdicht verschließbaren Spritze werden aus dem Gasraum der Ansätze 50 µL-Proben volumina entnommen und durch kurzzeitiges Öffnen des Verschlußventils entspannt. Die Analyse erfolgt gaschromatographisch (siehe 2.7.8).

2.8.6 Nitrat-Reduktase-Test

Die Bestimmung der Nitrat-Reduktase-Aktivität erfolgt photometrisch nach der Methode von JONES und GARLAND (1977) mit einfach reduziertem Benzylviologen (BV⁺) bzw. Methylviologen (MV⁺). Im Gegensatz zur Originalvorschrift wird die Konzentration an Kaliumnitrat im Ansatz auf 100 µM erhöht (BELL et al., 1990). Die Tests werden in Küvetten aus optischem Spezialglas mit durchbohrten Silikonstopfen durchgeführt. Das Testvolumen beträgt etwa 4,0 mL. Der Boden der Küvette wird mit Glasschrot (Kugeldurchmesser etwa 1 mm, Hecht, Sondheim/Röhn) bedeckt. Nach Zugabe von 100 µL Bakteriensuspension wird die Küvette mit 3,9 mL der sauerstofffreien und auf 30 °C temperierten Lösung des Viologenfarbstoffs (0,3 mM in 20 mM Tris/HCl, pH 6,8) befüllt. Durch das Verschließen der Küvette mit dem Silikonstopfen wird überschüssige Flüssigkeit verdrängt. Der Ansatz wird durch leichtes Schwenken gemischt. Für die Umsetzung des Viologenfarbstoffs zur einfach reduzierten Spezies werden ca. 70 µL einer frisch angesetzten Na₂S₂O₄-Lösung (25 mM in 10mM NaOH) durch den Silikonstopfen injiziert und verteilt. Es wird solange weiteres Reduktionsmittel nachgelegt bis die Extinktion E₆₀₀ bei etwa 1,0 liegt. Der Start der Reaktion erfolgt durch Injektion von 40 µL Kaliumnitrat-Lösung (10 mM). Die Kinetiken werden bei 30 °C mit dem Spektralphotometer PM 6 (Zeiss, Oberkochen) aufgenommen. Die Messungen

erfolgen gegen entionisiertes Wasser. Der Extinktionswert E_{600} wird alle 30 Sekunden abgelesen, dazwischen wird der Testansatz durch Schwenken der Testküvette gemischt. Mit den erhaltenen E_{600} -t-Wertepaaren wird eine lineare Regression (mit dem Programm ORIGIN 4.10) durchgeführt. Aus den Steigungen b [min^{-1}], den molaren Extinktionskoeffizienten ε von $13 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für MV^+ (THORNELEY, 1974) und $7,4 \cdot 10^3 \text{ L} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ für BV^+ (LESTER und DEMOSS, 1971), der Schichtdicke der Küvette d von 1 cm und den Konzentrationen des zellulären Proteins $c_{z\text{Prot}}$ [mg/L] werden die spezifischen Nitrat-Reduktase-Aktivitäten v [$\text{nmol NO}_3^- \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] berechnet. In dem Faktor K werden die notwendigen Umrechnungsfaktoren zusammengefaßt. Er beträgt $0,5 \cdot 10^9$.

$$v = \frac{b \cdot K}{\varepsilon \cdot d \cdot c_{z\text{Prot}}} \quad (2.19)$$

2.8.7 16S rDNA-Sequenzierung

Die Isolierung genomischer DNA, PCR-vermittelte Amplifikation der 16S rDNA und Reinigung der PCR-Produkte erfolgt nach einer Vorschrift von RAINEY et al. (1996). Die 16S rDNA-Sequenzierungen werden entsprechend der Herstellervorschrift mit dem Taq Dye-Deoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Die Reaktionsprodukte werden mit einem 310 DNA Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Weiterstadt) elektrophoretisch getrennt. Die 16S rDNA-Sequenzen von TL1 und *T. selenatis* ATCC 55363^T werden mit dem ae2 Editor (MAIDAK et al., 1994) mit den 16S rDNA-Sequenzen anderer Vertreter der β -Proteobacteria verglichen. Die evolutionären Distanzen zwischen zwei zu vergleichenden Sequenzen werden nach JUKES und CANTOR (1969) korrigiert. Die Konstruktion des Dendrogramms erfolgt nach der Methode von DE SOETE (1983). Die Untersuchungen wurden von Prof. Dr. F. Rainey, Department of Biological Sciences, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, USA, durchgeführt.

2.8.8 Bestimmung der DNA-Homologie (nach BUSSE, 1989, verändert)

DNA-Präparation

Die DNA-Präparation erfolgt nach der Methode von MARMUR (1961) ggf. mit einer zusätzlichen CTAB-Fällung (AUSUBEL, 1994) zur Abtrennung von Polysacchariden. In einem 250 mL-Erlenmeyerkolben mit Schliffstopfen werden je etwa 2 g BFM in 25 mL Tris-EDTA

(0,033 M Tris-HCl, 0,001 M EDTA, pH 8,0) vollständig suspendiert. Nach Zugabe von 0,5 mL Lysozymlösung (20 mg/mL Tris-EDTA) wird 10 Minuten im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Nacheinander werden 0,5 mL Proteinase-Lösung (2,5 mg/mL Tris-EDTA) und 0,5 mL SDS (25 %) zugegeben und gut verteilt. Im 37 °C-Wasserbad wird 60 Minuten inkubiert. Einer mit der Lyse der Zellen einhergehenden starken Zunahme der Viskosität wird durch Zugabe definierter Volumina Tris-EDTA entgegengewirkt. Nach Erhöhung der Temperatur auf 60 °C und Zugabe weiterer 1,5 mL SDS wird 15 Minuten inkubiert. Anschließend wird auf Raumtemperatur abgekühlt. Durch Zugabe von NaClO₄ (5 M, 5,8 mL pro 20 mL des Ansatzes) wird die Ionenstärke erhöht. Anschließend wird mit Chloroform-Isoamylalkohl (24/1 v/v) extrahiert, wobei pro 25 mL Volumen des Ansatzes 30 mL Chloroform-Isoamylalkohl eingesetzt werden. Der Ansatz wird kurz kräftig gemischt und 30 Minuten unter Schütteln (120 Upm) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Phasentrennung erfolgt durch Zentrifugation in Glasbechern in der Cryofuge 6-6 (Heraeus Christ GmbH, Osterode). Die die DNA enthaltende wäßrige Oberphase wird äußerst vorsichtig mit einer umgekehrten 10 mL-Pipette abgehoben. Die Zwischenphase und die organische Unterphase werden verworfen. Die Extraktion mit Chloroform-Isoamylalkohl wird wiederholt bis praktisch keine Zwischenschicht mehr erkennbar ist. Zur Präzipitation der DNA wird das zweifache Volumen Ethanol (96 %, vergällt) zugegeben und die beiden Schichten mit einem Glasstab vorsichtig gemischt. Die DNA wird durch gleichzeitiges Drehen des Glasstabes aufgespult. Nach dem Trocknen wird die DNA vom Glasstab abgelöst und über Nacht in etwa 20 mL 0,1 x SSC gelöst. Anschließend wird 0,5 mL Ribonuclease-Lösung (4 mg/mL 0,1 x SSC) zugesetzt und für 3 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 mL Proteinase-Lösung (3 mg Proteinase K/ml 0,1 x SSC) wird über Nacht bei 37 °C inkubiert. Zur Ermittlung von Konzentration und Reinheit der jeweiligen DNA-Lösung werden die Extinktionswerte bei 230, 260 und 280 nm gemessen und die Extinktionsquotienten E_{230}/E_{260} und E_{280}/E_{260} berechnet. Liegen beide Quotienten oder nur E_{230}/E_{260} über dem jeweiligen Sollwert (s. u.), so wird eine CTAB-Fällung mit anschließender Chloroform-Isoamylalkohl-Extraktion durchgeführt (AUSUBEL, 1994). Ist nur der Quotient E_{280}/E_{260} erhöht, so wird nach Erhöhung der Pufferkonzentration auf 1 x SSC erneut mit Chloroform-Isoamylalkohl extrahiert. Die jeweilige Reinigungsprozedur wird so lange wiederholt, bis die Quotienten bei bzw. unter 0,450 (E_{230}/E_{260}) und 0,515 (E_{280}/E_{260}) liegen, die erforderliche DNA-Reinheit somit erreicht ist (AULING et al., 1980). Bis zu ihrer weiteren Verwendung wird die DNA bei -20 °C eingefroren.

Fragmentierung und Dialyse

Die DNA-Lösungen werden mit 1 x SSC auf eine Konzentration von etwa 300 µg/mL eingestellt. Es wird zugrundegelegt, daß ein Wert E_{260} von 1 etwa einer Konzentration von 50 µg/mL an doppelsträngiger DNA entspricht (PROVENCE und CURTISS, 1994). Je 2,5 mL dieser DNA-Lösungen werden für die Fragmentierung eingesetzt. Diese erfolgt mit dem Ultraschall Desintegrator Branson B-12 (Branson, Danbury, Connecticut, USA) mit Mikrospritze im Eisbad. Es wird mehrfach für 35 Sekunden auf Stufe 2 bei 45 Watt (mit je 60 Sekunden Pause zwischen den Intervallen zum Abkühlen der Lösung) beschallt bis die Fragmente im Größenbereich von 2000 bis 600 bp liegen. Die Fragmentierung wird durch Auftrennung der Fragmente im Agarosegel (1,0 %) kontrolliert. Zu 4 bzw. 8 µL der jeweiligen DNA-Lösung werden 2 µL 6 x Auftragspuffer I für Nucleinsäuren (SAMBROOK et al., 1989) und 10 µL TE-Puffer (10 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA) gegeben. Die Taschen des Gels werden mit je 11 µL dieser Lösung beschickt. Als Längenstandard wird Lambda-Standard, verdaut mit Hind III, aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgt bei 80 V und maximaler Stromstärke und wird beendet, wenn die Farbstoffbande den Rand des Gels erreicht hat. Das Gel wird 15 Minuten mit Ethidiumbromid gefärbt, unter UV-Beleuchtung kontrolliert und mit der Digitalkamera des Systems Digit Store Duo (Intas, Göttingen) fotografiert.

Die Lösungen mit der entsprechend fragmentierten DNA werden zweimal 8 h bei 4 °C gegen 2 x SSC dialysiert. Die Dialyseschläuche werden zuvor für 30 Minuten in 10 mM EDTA gekocht und mit bidestilliertem Wasser gewaschen.

Bestimmung der DNA-Konzentration

Die Konzentration der gelösten DNA wird nach der Methode von RICHARDS (1974) ermittelt. Zuerst wird durch Messung der Extinktion bei 260 nm die Konzentration der DNA in den jeweiligen Lösungen überschlagsmäßig bestimmt. Durch entsprechende Verdünnung wird die Konzentration auf etwa 15 µg/mL eingestellt. Parallel dazu werden mit Kalbsthymus-DNA (Standard-Lösung mit 41,3 µg DNA/mL 0,02 N HClO₄) Kalibrierstandards mit Konzentrationen von 0 bis 30 µg/mL angesetzt. Für alle Verdünnungsschritte wird der 2 x SSC-Puffer aus dem letzten Dialyseschritt eingesetzt, die HClO₄-Konzentration beträgt jeweils 1,5 N. Den zu messenden DNA-Lösungen wie auch den Kalibrierstandards werden jeweils 900 µl Diphenylaminreagenz-Lösung (0,01 % Paraldehyd und 4 % Diphenylamin in Eisessig) zugesetzt. Nach 16-24 h (Inkubation abgedeckt bei Raumtemperatur) werden die Extinktionswerte bei 600 nm im Spektralphotometer LKB Ultrospec III (Pharmacia, Freiburg)

gemessen. Die Konzentrationen der Proben werden aus der mittels linearer Regression berechneten Kalibriergeraden ermittelt.

DNA-DNA-Hybridisierungen

Die miteinander zu hybridisierenden DNAs werden basierend auf den Ergebnissen der chemischen DNA-Konzentrationsbestimmung mit dem 2 x SSC-Puffer aus dem letzten Dialyseschritt auf dieselbe Konzentration von 50 µg/mL (HUSS et al., 1983) eingestellt. Die DNA-DNA-Hybridisierungen werden mit einem Gilford Spectrophotometer 2600 mit 4-Kanalküvette, angeschlossenem Thermoprogrammer 2527 und Hewlett Packard Plotter 7225B (IMA Gilford Analystechnik, Gießen) bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt. In je eine Kammer der Thermoküvette wird die DNA-Lösung von einem der beiden zu untersuchenden Stämme gefüllt, in die beiden übrigen die Mischung der beiden DNA-Lösungen. In der Mischung sind die beiden DNAs in gleicher Konzentration vorhanden. Die DNA-Lösungen in der Thermoküvette werden mit einer Aufheizrate von 1 °C/min von 80 auf 105 °C erhitzt, diese Temperatur wurde für etwa 5 Minuten beibehalten. Anschließend wird auf die optimale Renaturierungstemperatur T_{OR} von 81 °C abgekühlt. Diese wird aus dem GC-Gehalt berechnet (GILLIS et al., 1970):

$$T_{OR} = 0,51 \cdot [\text{mol}\% \text{G} + \text{C}] + 47,0 \quad (2.20)$$

Die Temperatur in der Thermoküvette wird für 40 Minuten konstant bei T_{OR} gehalten. Die mit der Renaturierung der geschmolzenen DNA einhergehenden Abnahmen der Extinktion E_{260} werden bestimmt und zur Berechnung der DNA-Homologie herangezogen (DE LEY, 1970):

$$\%D = 100 \cdot \frac{4 \cdot v_m - (v_a + v_b)}{2 \cdot \sqrt{v_a \cdot v_b}} \quad (2.21)$$

%D = Homologie [%]

v_m = Renaturierungsrate der DNA-Mischung [min^{-1}]

v_a = Renaturierungsrate der DNA von Stamm A [min^{-1}]

v_b = Renaturierungsrate der DNA von Stamm B [min^{-1}]

2.8.9 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) ist eine leistungsfähige Methode zur quantitativen Analyse der mikrobiellen Zusammensetzung. Sie beruht auf der Verwendung von mit

einem Fluoreszenzfarbstoff markierten einzelsträngigen Oligonukleotiden (Sonden), deren Sequenz zu einer für die nachzuweisende Gruppe von Zielorganismen spezifischen Sequenz der 16S rRNA komplementär ist (AMANN et al., 1995). Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 2.2 angegeben.

Tab. 2.2: Zur Charakterisierung autotropher Nitrifizierer, heterotropher Denitrifizierer und anaerober Ammonium-Oxidierer eingesetzte Sonden.

Sonde	Spezifität	Literatur
Nso190	Ammoniak-oxidierende β -Proteobacteria	MOBARRY et al., 1996
S*-Nse-1472-a-A-18 ^a	<i>N.europaea</i> -Linie	JURETSCHKO et al., 1998
Nsv443	<i>Nitrosospira</i> spp. ^b	MOBARRY et al., 1996
Nsr1156	alle Süßwasser- <i>Nitrosospira</i> spp.	SCHRAMM et al., 1998
Nsr447	einige Süßwasser- <i>Nitrosospira</i> spp.	SCHRAMM et al., 1998
Nit3-CNit3 ^c	<i>Nitrobacter</i> spp.	WAGNER et al., 1996
Pla46	Planctomycetales	NEEF et al., 1998
Amx820	Anaerobe Ammonium-Oxidierer	SCHMID et al., 2000
AT1458	<i>Azoarcus/Thauera</i> -Cluster ^d	RABUS et al., 1999
ALF1b	α -Proteobacteria	MANZ et al., 1992
BET42a-GAM42a ^e	β -Proteobacteria	MANZ et al., 1992

^a Nachfolgend mit S*-Nse abgekürzt.

^b Entsprechend dem Vorschlag von HEAD et al., 1993 und UTAKER et al., 1995 wurden die Gattungen *Nitrosovibrio* und *Nitrosolobus* in der Gattung *Nitrosospira* vereinigt.

^c Zur kompetitiven Absättigung wurde die nicht markierte Sonde CNit3 zusammen mit der Sonde Nit3 eingesetzt.

^d Mit der Sonde AT1458 werden auch *Alcaligenes defragans* und *Spirillum volutans* erfaßt.

^e Zur kompetitiven Absättigung wurde die nicht markierte Sonde GAM42a zusammen mit der Sonde BET42a eingesetzt.

Die Fixierung der Zellen in Paraformaldehyd, Durchführung der Hybridisierungen und Färbung mit DAPI erfolgt nach MANZ et al. (1992). Das Photomikroskop Axiophot (Zeiss, Oberkochen) wird als Fluoreszenzmikroskop eingesetzt. Es werden die Filtersätze HQ-Cy3 (Chroma, Brattleboro, VT, USA) und 487902 (Zeiss, Oberkochen) verwendet. In Proben, die Biofilm und Abwasser enthalten, werden diese zunächst in der Laborzentrifuge Junior III (Heraeus-Christ GmbH, Osterode am Harz) getrennt (7 min bei 1000 Upm) und dann separat analysiert. Die Analysen wurden von Dipl.-Biol. J. Hamzavi durchgeführt (HAMZAVI, 2000).

3 Ergebnisse

Zu Beginn der Arbeiten an diesem Projekt lagen keine Informationen über die Zusammensetzung der Bakterienpopulation in der Mechernicher Anlage vor. Es wurden daher Anreicherungsversuche unternommen. Im Verlauf der Arbeit gelang es dann, die Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) zu etablieren. Diese ermöglicht es, Bakteriengruppen mit fluoreszenzgekoppelten Oligonukleotiden spezifisch zu markieren und zu quantifizieren. Damit wurden im Verlauf der vorliegenden Dissertation a) die Zusammensetzung der Anreicherungskulturen, b) die Populationsdynamik während des Reaktorbetriebs und c) die Bakterienflora des Scheibentauchkörpers der Mechernicher Anlage untersucht. Die Analysen wurden in diesem Laboratorium von Dipl.-Biol. J. Hamzavi durchgeführt. Eine Probe des Biofilms der STK-Anlage wurde parallel in diesem Labor und am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München durch Herrn Dipl.-Biol. M. Schmid untersucht. Die Ergebnisse dieser FISH-Analysen werden hier unter 3.1 dargestellt, bevor nachfolgend die zeitlich wesentlich früher erzielten Ergebnisse von Anreicherung und Reaktorbetrieb beschrieben werden.

3.1.1 Populationsanalyse des Biofilms auf dem Scheibentauchkörper der Kläranlage Mechernich

Im April 2000 wurde der Mechernicher Scheibentauchkörper-Anlage eine Probe (1,0 L) entnommen, die Biofilm und Abwasser enthielt. Nach Zentrifugation (siehe 2.8.9) wurden im Sediment und Überstand Zellzahlen von $420 \cdot 10^{10}$ bzw. $69 \cdot 10^{10} \text{ L}^{-1}$ bestimmt und die Bakterienflora durch FISH analysiert. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.1.

Tab. 3.1: Durch FISH ermittelte Anteile verschiedener Bakteriengruppen an der Gesamtpopulation im Scheibentauchkörper.

Physiologische bzw. taxonomische Gruppe	Sonde (vgl. Tab. 2.2)	Anteil [%]	
		Sediment	Überstand
Ammoniak-Oxidierer	Nso190	26	25
Nitrit-Oxidierer	Nsr1156	29	31
Planctomycetales	Pla46	20	21
Anaerobe Ammonium-Oxidierer	Amx820	7	0
<i>Thauera/Azoarcus</i> -Cluster ^a	AT1458	9	7

^a Mit der Sonde AT1458 werden auch *Alcaligenes defragans* und *Spirillum volutans* erfaßt (RABUS et al., 1999).

Die mit den verschiedenen Sonden ermittelten Anteile an der Gesamtpopulation lassen (mit einer, allerdings wesentlichen Ausnahme) keine Unterschiede zwischen Sediment („Biofilm“) und Überstand („Abwasser“) erkennen: Mit den Sonden Nso190, Nsr1156 und Pla46 können sowohl im Biofilm als auch im Abwasser je etwa 25 % und somit insgesamt bereits drei Viertel der DAPI-positiven Organismen erfaßt werden. Auffallend ist, daß mit der Sonde Amx820 im Abwasser keine Zellen erfaßt wurden, während der Anteil Amx820-positiver Zellen im Biofilm immerhin 7 % beträgt. Die Sonde AT1458 erfaßt neben dem *Azoarcus/Thauera*-Cluster auch *Alcaligenes defragans* und *Spirillum volutans* (RABUS et al., 1999). Während *S. volutans* aufgrund seiner Morphologie leicht zu erkennen sein sollte, würde die Anwesenheit von *A. defragans* in der Probe zur Ermittlung falscher (da zu hoher) *Azoarcus/Thauera*-Anteile führen (vgl. Diskussion). Die vorläufige Bestimmung der α - bzw. β -Proteobacteria (mit den Sonden ALF1b und BET42a) ergab Anteile von 8 bzw. 19 % im Biofilm und 14 bzw. 11 % im Überstand. Die für die β -Proteobacteria ermittelten Anteile sind unerwartet niedrig, da sie deutlich unter der Summe der mit Nso190 und AT1458 ermittelten Anteile liegen (vgl. Diskussion).

3.2 Anreicherung autotropher Nitrifizierer aus der Kläranlage Mechernich

Im Juli 1998 wurden an sieben verschiedenen Stellen der Anlage zur biologischen Vorbehandlung (Abbildung 1.3) Proben genommen. Die Temperatur des Abwassers betrug 27 °C, der pH-Wert lag bei 8,3. Nach Lagerung der Proben für drei Tage bei 25 °C wurden Reagenzgläser mit 4 mL *Nitrosomonas*-Medium 221 beimpft (1 bis 5 % Inokulum). Die Inkubation erfolgte für elf Wochen ohne pH-Korrektur bei 27 °C im Dunkeln. Die Kulturen wurden in 4 mL Mineralmedium (BOCK et al., 1995) überimpft (5 % Inokulum) und für weitere drei Wochen unter ansonsten unveränderten Bedingungen inkubiert. Nach Überimpfen auf frisches Mineralmedium wurde für weitere vier Wochen inkubiert. Fünf der sieben Kulturen bildeten Nitrit; Nitrat konnte dagegen nicht nachgewiesen werden. Der pH-Wert wurde zunächst mit NaOH, später mit Kaliumcarbonatlösung (50 %) auf etwa 7,4 gehalten. Die Kulturen mit Nitrifikationsaktivität wurden wie unter 2.6.2 beschrieben erhalten und physiologisch sowie hinsichtlich ihrer mikrobiellen Zusammensetzung charakterisiert. Es gelang nicht, durch Verdünnungsausstriche auf Mineralmedium (BOCK et al., 1995) und *Nitrosomonas* Medium (ATCC, 1992) Reinkulturen autotropher Nitrifizierer herzustellen.

3.3 Charakterisierung der Anreicherungskulturen

Die Anreicherungskulturen (Abschnitt 3.2) wurden auf Verbrauch von Ammonium sowie halbquantitativ auf Bildung von Nitrit und Nitrat (Merckoquant-Test, 0-80 bzw. 0-500 mg/L, Merck, Darmstadt) untersucht. Zusätzlich wurde in mit Durham-Röhrchen versehenen Reagenzgläsern auf Gasbildung getestet, um die mögliche Denitrifikation der Nitrifikationsprodukte erkennen zu können (JENNEMAN et al., 1986). Die Anteile Ammoniak-oxidierender β -Proteobacteria und Süßwasser-*Nitrospira* spp. wurden mittels Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung unter Verwendung der Oligonukleotidsonden Nso190 und Nsr1156 ermittelt. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 3.2.

Tab. 3.2: Eigenschaften von Anreicherungskulturen autotropher Nitrifizierer. + positiv, - negativ, ND nicht bestimmt.

Probenahmestelle (vgl. Abb. 1.3)	Anreicherungs- kultur	vNR ^a	Produktion von		Gas- bildung	Nso190 ^b [%]	Nsr1156 ^c [%]
			NO ₂ ⁻	NO ₃ ⁻			
Denitrifikation	1	0,014	+	-	-	17	ND
Zwischenbelüftung	2	0,031	+	-	-	31	ND
Zwischenklärung	3	0,012	+	-	-	75	7
STK	4	0,025	+	-	-	20	ND
Zulauf Denitrifikation	6	0,012	+	-	-	65	ND

^a Mittlere volumetrische Nitrifikationsrate [mmol NH₄⁺·L⁻¹·h⁻¹]. Wie in der Literatur üblich, werden positive Zahlenwerte angegeben, obwohl es sich um eine Verbrauchsrate handelt.

^b Anteil der Nso190-positiven Zellen. Das DAPI-Signal entspricht 100 %.

^c Anteil der Nsr1156-positiven Zellen. Das DAPI-Signal entspricht 100 %.

In allen genannten Anreicherungskulturen wurde Ammonium zu Nitrit umgesetzt, jedoch kein Nitrat produziert. Die Anteile Ammoniak-oxidierender β -Proteobacteria an der Gesamtpopulation variierten beträchtlich. Eine Korrelation zwischen dem Anteil der mit der Sonde Nso190 erfaßten Zellen an der Gesamtpopulation und den Raten vNR war nicht zu erkennen. Durch keine der Kulturen wurde Gas gebildet, auch nicht nach Verzehnfachung der Konzentration an Kupferionen durch Verwendung einer anderen Spurenelementlösung (PRUDÊNCIO et al., 1999). Die Anreicherungskulturen 3 und 6 wurden aufgrund ihres hohen Anteils an Ammoniak-oxidierenden β -Proteobacteria für Chemostatexperimente ausgewählt.

3.4 Chemostat-Experimente mit Anreicherungskulturen autotropher Nitrifizierer

Für physiologische Untersuchungen können ebenso wie Reinkulturen auch definierte bzw. undefinierte Mischkulturen eingesetzt werden. Experimente mit Reinkulturen oder definierten Mischkulturen bieten den Vorteil, daß die beteiligten Organismen bekannt sind. Aus diesem Grund sind diese Experimente in der Regel einfacher zu interpretieren und mit Literaturdaten zu vergleichen als Versuche, die mit undefinierten Mischkulturen durchgeführt wurden.

In dieser Arbeit sollten Labor-Versuche unter Bedingungen durchgeführt werden, die den in Kläranlagen herrschenden ähneln. Daher wurde mit der Verwendung undefinierter, nitrifizierender Mischkulturen, die aus der Kläranlage Mechernich angereichert wurden, bewußt ein anderer Weg beschritten. Diese Kulturen wurden sowohl hinsichtlich ihres biochemischen Verhaltens (Ermittlung der Raten, mit denen Metabolite umgesetzt werden) als auch hinsichtlich der Populationszusammensetzung und -dynamik (durch FISH-Analysen) untersucht (vgl. Diskussion).

Nach 16wöchigem Chemostatbetrieb besaß die ursprünglich ausschließlich nitritierende Anreicherungskultur 3 Nitratationsaktivität (s. u.). Mit dieser Kultur wurde daraufhin untersucht, wie durch Veränderung der Betriebsparameter die Nitrifikation auf der Stufe des Nitrits angehalten werden kann und inwieweit Änderungen der Stoffbilanz mit solchen der Bakterienpopulation korrelieren (Abschnitt 3.4.1).

In den Chemostatexperimenten mit Anreicherungskultur 6 (Abschnitt 3.4.2) wurde ermittelt, welche Umsatzraten erzielt werden können und ob die Denitrifikation des gebildeten Nitrits möglich ist. Besonderes Interesse bestand darin zu untersuchen, inwieweit NO_2 die autotrophe Denitrifikation (Tabelle 1.1) stimuliert.

3.4.1 Anreicherungskultur 3

Anreicherungskultur 3 wurde bei 28 °C und 50 Upm in der Versuchsanlage 2 ohne Belüftung in Mineralmedium (10 mM Ammonium) kultiviert. Zur pH-Statisierung (Sollwert: 7,40) und Versorgung der Zellen mit CO_2 wurde eine Kaliumcarbonatlösung (50 %) eingesetzt. Nach dem Animpfen (10 % Inokulum) wurde die Kultur für 50 Stunden als Batch und dann kontinuierlich ($D = 0,005 \text{ h}^{-1}$) betrieben. Die in den ersten 17 Tagen der Kultivierung aufgenommenen Meßdaten zeigt Abbildung 3.1.

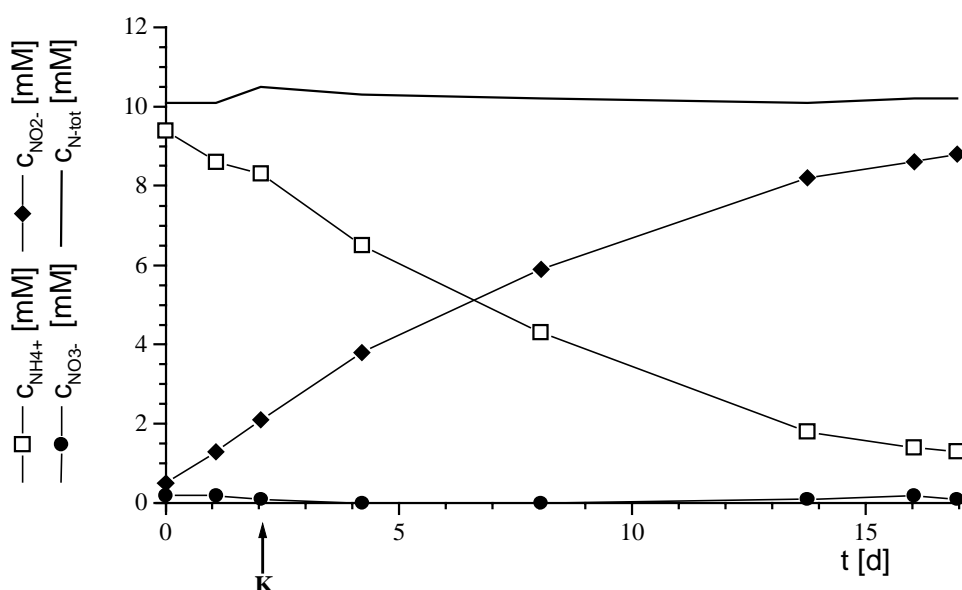


Abb. 3.1: Kultivierung von Anreicherungskultur 3. Gehalte an Ammonium, Nitrit, Nitrat und Gesamtstickstoff für den Zeitausschnitt von 0 –17 d. **K**=Beginn des kontinuierlichen Betriebs.

Die Ammoniumkonzentration nimmt von 9,5 mM auf knapp 1,5 mM ab. Die Konzentration an Nitrit steigt im gleichen Zeitraum von 0,5 mM auf 8,5 mM an. Nitrat liegt nur in Spuren vor. Die Konzentration des Gesamtstickstoffs liegt konstant um 10 mM. Der $p\text{O}_2$ ging in dem dargestellten Zeitraum von 100 auf 0 % zurück (Werte nicht dargestellt).

Die Kultur wurde unter unveränderten Betriebsbedingungen mit einem $p\text{O}_2$ -Wert um 0 % weitergeführt. Es wurde vermehrt Nitrat gebildet, nach drei Monaten war dieses nahezu ausschließliches Nitrifikationsprodukt (Beginn der Meßpunkte in Abbildung 3.2 A).

Abb. 3.2 (folgende Seite): Kultivierung von Anreicherungskultur 3.

P=Ammoniumpuls, I= Erhöhung der Ammoniumkonzentration im Einlauf von 10 mM auf 32 mM, T=Temperaturshift von 28 auf 35 °C, D=Shift der Verdünnungsrate von 0,005 auf 0,008 h^{-1} , O=Erhöhung des $p\text{O}_2$ von 0 auf >30 %.

A: Konzentrationen an Ammonium, Nitrit, Nitrat und Gesamtstickstoff.

B: Anteile verschiedener nitrifizierender Bakterien an der Gesamtpopulation (HAMZAVI, 2000). Das DAPI-Signal entspricht 100 %. Offensichtlich falsche Werte wurden eingeklammert.

- Nso190 (Ammoniak-oxidierende β -Proteobacteria)
- ▼ S*-Nse (*N. europaea*-Linie)
- Nsv443 (*Nitrospira*-Cluster)
- Nsr1156 (alle Süßwasser-*Nitrospira* spp.)
- + Nsr447 (einige Süßwasser-*Nitrospira* spp.)

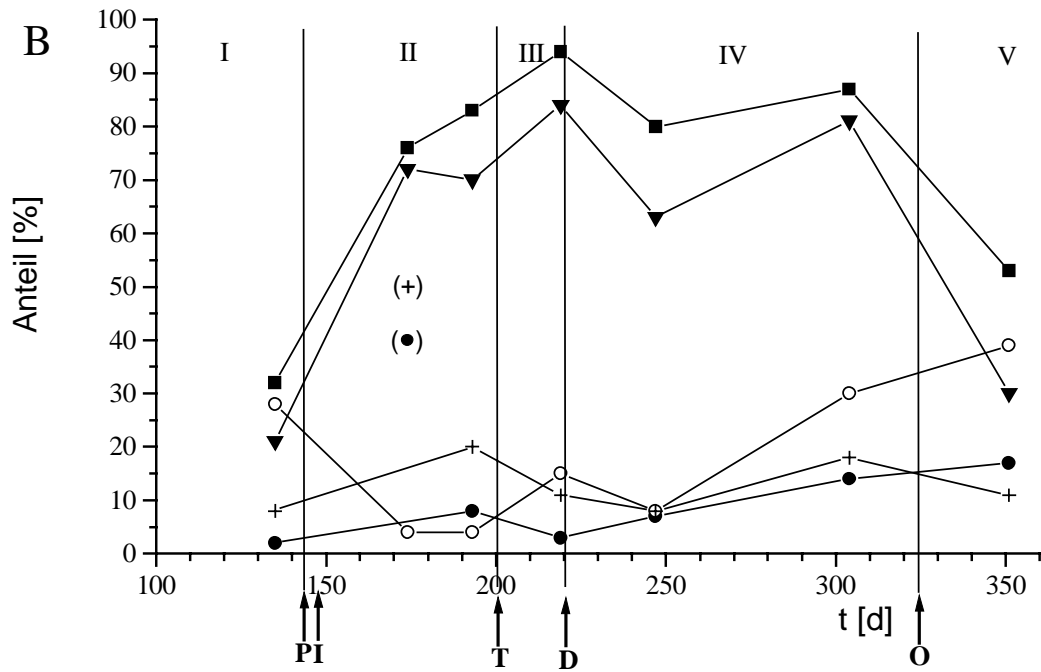
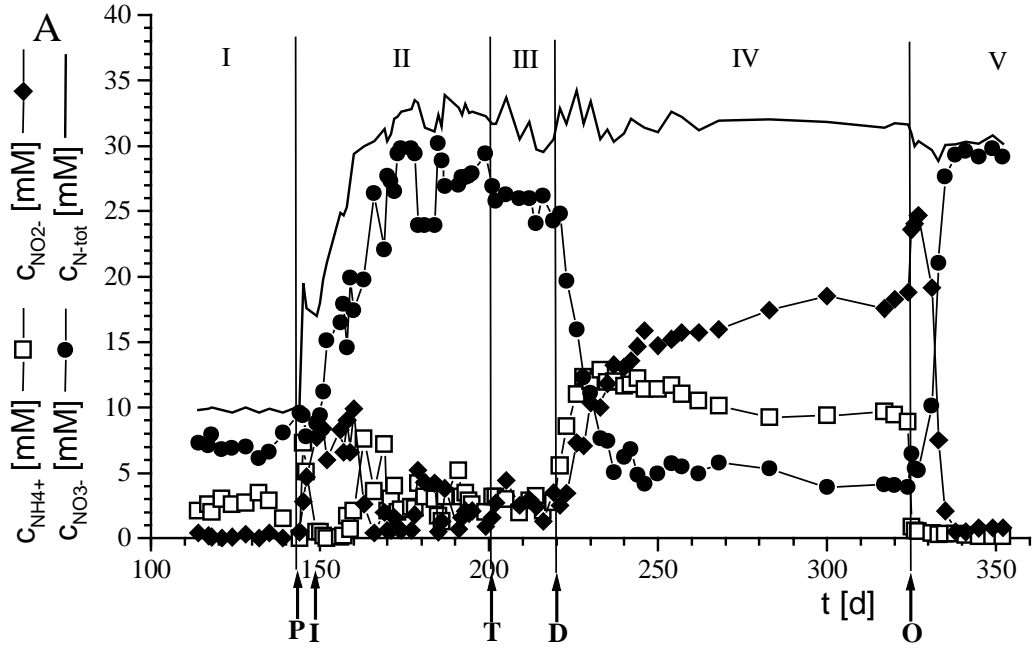


Abbildung 3.2 zeigt, wie sich die Konzentrationen verschiedener Stickstoffverbindungen (A) bzw. die Anteile verschiedener nitrifizierender Bakterien an der Gesamtpopulation (B) während der Kultivierung von Anreicherungskultur 3 entwickeln. Der Betriebszeitraum ist in fünf Phasen (I bis V) unterteilt. In Tabelle 3.3 sind für die stationären Zustände, während der die Metabolitkonzentrationen annähernd konstant bleiben, die eingestellten Betriebsbedingungen und die wichtigsten Meßdaten dargestellt.

Tab. 3.3: Betriebsbedingungen, ermittelte Konzentrationen und mit den Sonden Nso190 und Nsr1156 bestimmte Anteile Ammoniak-oxidierender und Nitrit-oxidierender Bakterien an der Gesamtpopulation in der kontinuierlichen Kultivierung mit Anreicherungskultur 3.

Phase / Tag ^a	T	D	pO ₂	c _{NH₄⁺}	c _{NO₂⁻}	c _{NO₃⁻}	c _{ZProt}	Z ^b	Nso190 ^c	Nsr1156 ^c
	[°C]	[h ⁻¹]	[%]	[mM]	[mM]	[mM]	[mg·L ⁻¹]		[%]	[%]
I / 117-135	28	0,005	0	2,8	0,2	6,9	2,1	1,7	32	28
III / 207-219	35	0,005	0	2,5	2,7	26,2	8,6	5,5	94(86)	15(14)
IV / 283-324	35	0,008	0	9,0	18,4	4,2	9,4	12,5	87(74)	30(26)
V / 338-352	35	0,008	>30	0,2	0,7	29,4	12,0	10,8	53	39

^a Zeitraum (Abbildung 3.2), der zur Bestimmung der steady-state-Konzentrationen herangezogen wurde.

^b Zellzahl [10¹⁰ L⁻¹]

^c Das DAPI-Signal entspricht 100 %. In den Fällen, in denen die Summe der Anteile über 100 % liegt, wurden diese auf 100 % normiert. Entsprechende Werte sind in Klammern angegeben.

Berechnete Umsatzraten und Zellzahlen Ammoniak- und Nitrit-oxidierender Bakterien sind in Tabelle 3.4 und 3.5 enthalten. Die Sauerstoffaufnahmeraten wurden aus den Stöchiometrien der Gleichungen 1.4 und 1.6 ermittelt. Zur Berechnung der Konzentration des in der Bio-trockenmasse festgelegten Stickstoffs c_{N-BTM} aus c_{ZProt} wurden Massenanteile des zellulären Proteins von 50 und des Stickstoffs von 14 % an der BTM zugrundegelegt (SCHLEGEL, 1992).

Tab. 3.4: Für Anreicherungskultur 3 aus Tabelle 3.3 ermittelte volumetrische Nitrifikationsraten vNR und daraus berechnete Sauerstoffaufnahmeraten OUR.

Phase / Tag ^a	vNR [*]	vNR ^{**}	OUR ^b
I / 117-135	0,036	0,035	0,072 (0,054 + 0,018)
III / 207-219	0,147	0,131	0,287 (0,221 + 0,066)
IV / 283-324	0,182	0,034	0,290 (0,273 + 0,017)
V / 338-352	0,252	0,235	0,496 (0,378 + 0,118)

^a Zeitraum (Abbildung 3.2), der zur Bestimmung der steady-state-Konzentrationen herangezogen wurde.

^{*} Volumetrische Nitrifikationsrate Ammoniak-oxidierender Bakterien [mmol NH₄⁺·L⁻¹·h⁻¹] nach Gleichung 2.2. Wie in der Literatur üblich werden positive Werte angegeben, obwohl es sich um eine Verbrauchsrate handelt.

^{**} Volumetrische Nitrifikationsrate Nitrit-oxidierender Bakterien [mmol NO₂⁻·L⁻¹·h⁻¹]. Erfasst ausschließlich die Rate, mit der Nitrit zu Nitrat oxidiert wird (berechnet aus der Rate der Nitratbildung D·Δc_{NO₃⁻}).

^b Sauerstoffaufnahmerate [mmol O₂·L⁻¹·h⁻¹]. In Klammern sind die einzelnen aus vNR^{*} und vNR^{**} berechneten Sauerstoffaufnahmeraten angegeben.

Tab. 3.5: Für Anreicherungskultur aus den Zellzahlen und Sondendaten (Tabelle 3.3) berechnete Zellzahlen Z und zelluläre Nitrifikationsraten zNR Ammoniak-oxidierender und Nitrit-oxidierender Bakterien.

Phase / Tag ^a	Z^*	zNR^*	Z^{**}	zNR^{**}
I / 117-135	0,5	7,2	0,5	7,0
III / 207-219	4,7	3,1	0,8	16,4
IV / 283-324	9,3	2,0	3,3	1,0
V / 338-352	5,7	4,5	4,2	5,6

^a Zeitraum (Abbildung 3.2), der zur Bestimmung der steady-state-Konzentrationen herangezogen wurde.

* Zellzahl [$10^{10} \cdot L^{-1}$] und zelluläre Nitrifikationsrate [$fmol NH_4^+ \cdot Zelle^{-1} \cdot h^{-1}$] Ammoniak-oxidierender Bakterien.

** Zellzahl [$10^{10} \cdot L^{-1}$] und zelluläre Nitrifikationsrate [$fmol NO_2^- \cdot Zelle^{-1} \cdot h^{-1}$] Nitrit-oxidierender Bakterien.

Zu Beginn der Kultivierung (Abbildung 3.2) wird Ammonium hauptsächlich zu Nitrat umgesetzt, Nitrit kommt nur in Konzentrationen unter 0,5 mM vor (I). Sowohl die Anteile Ammoniak- und Nitrit-oxidierender Bakterien (Tabelle 3.3) als auch die volumetrischen Nitrifikationsraten vNR^* und vNR^{**} (Tabelle 3.4) sind annähernd gleich. Nach dem Ammoniumpuls und der Verdreifachung der Ammoniumkonzentration im Einlauf (auch die Rührerdrehzahl wurde schrittweise auf 150 min^{-1} erhöht) werden kurzzeitig Nitrit und Ammonium angehäuft (Tage 143-172 in Phase II). Anschließend wird wie in Phase I Ammonium hauptsächlich zu Nitrat umgesetzt. Die Anhebung der Temperatur von 28 auf 35 °C hat alleine keinen Einfluß auf die Umsetzungen (Phase III in Abbildung 3.2). Wie aufgrund des gegenüber Phase I erhöhten Stickstoff- und Sauerstoffangebots zu erwarten, werden im stationären Zustand III deutlich höhere Raten vNR^* , vNR^{**} und OUR erzielt (Tabelle 3.4). Obwohl sich auch hier die volumetrischen Nitrifikationsraten vNR^* und vNR^{**} kaum unterscheiden, wird eine deutlich veränderte Zusammensetzung der Bakterienpopulation ermittelt. Der Anteil der Ammoniak-Oxidierer hat sich gegenüber Phase I annähernd verdreifacht, während der Anteil der Nitritoxidierer auf die Hälfte zurückgegangen ist. Diese Veränderungen äußern sich insbesondere in einem deutlichen Anstieg der berechneten Zellzahl der Ammoniak-Oxidierer Z^* (Tabelle 3.5). Nach Erhöhung der Verdünnungsrate D von $0,005 \text{ h}^{-1}$ auf $0,008 \text{ h}^{-1}$ sinkt die Nitrat-Konzentration deutlich ab (auf etwa 4 mM), während die Gehalte an Ammonium und Nitrit sichtbar (auf etwa 9 bzw. 18 mM) ansteigen (Phase IV). Die Kultur ist sauerstofflimitiert, denn trotz des erhöhten Ammonium- und Nitritangebots entspricht die für den stationären Zustand (Tage 283-324 in Phase IV) berechnete Sauerstoffaufnahme OUR derjenigen des steady state in Phase III. Ein Vergleich der Raten vNR^* und vNR^{**} zeigt, daß die Nitrifikation des Ammoniums an Bedeutung gewonnen, die

Nitrifikation des Nitrits deutlich an Bedeutung verloren hat (Tabelle 3.4). Die in Tabelle 3.5 enthaltenen Werte sprechen dafür, daß diese Veränderungen hauptsächlich durch die Verdopplung der Zellzahl der Ammoniak-oxidierenden Bakterien Z^* und den deutlichen Rückgang der zellulären Nitrifikationsrate der Nitrit-oxidierenden Bakterien zNR^{**} bedingt sind. Unmittelbar nach Erhöhung des Sauerstoffangebots durch Belüftung (324. Tag in Abbildung 3.2) kommt es zur Abnahme der Ammonium- und zu einem vorübergehenden Anstieg der Nitritkonzentration. Im stationären Zustand (Tage 338-352 in Phase V) wird Ammonium nahezu vollständig in Nitrat überführt. Die Werte für vNR^* und vNR^{**} (Tabelle 3.4) zeigen, daß gegenüber dem stationären Zustand in Phase IV insbesondere die Nitrifikationsrate Nitrit-oxidierender Bakterien zugenommen hat. Auch die Populationszusammensetzung hat sich deutlich verändert. Der Anteil der Ammoniak-Oxidierer ist sichtbar zurückgegangen, wohingegen für die Nitrit-Oxidierer der höchste Wert während des gesamten Untersuchungszeitraums ermittelt wird.

FISH-Analysen mit der für *Nitrobacter* spp. spezifischen Sonde Nit3 ergaben unrealistisch hohe Anteile von bis zu 55 %. Zur Kontrolle wurde eine Probe der Kultur am Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München mit den Sonden Nso190 und Nit3 hybridisiert und am konfokalen Laserscanningmikroskop untersucht. Da keine Nit3-positiven Zellen nachgewiesen werden konnten, während der Anteil der Nso190-positiven gut mit den von HAMZAVI (2000) ermittelten übereinstimmte (M. SCHMID, persönliche Mitteilung), beruhen die von HAMZAVI für *Nitrobacter* spp. ermittelten Anteile mit großer Wahrscheinlichkeit auf falsch positiven Signalen. Sie wurden daher in Abbildung 3.2 B nicht berücksichtigt.

Die am 193. und 219. Betriebstag der Anlage entnommenen Proben (Abb. 3.2) wurden rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Auswertung der REM-Bilder ist in Tabelle 3.6 den Ergebnissen der dazugehörigen FISH-Analysen gegenübergestellt, wobei die in derselben Zeile aufgeführten REM- und FISH-Daten nicht in einem direkten Zusammenhang stehen (vgl. Diskussion).

Tab. 3.6: Auswertung der REM-Bilder und der FISH-Analysen (Anreicherungskultur 3).

Tag	REM		FISH	
	Morphotyp ^a , Abmessungen ^b	Anteil [%]	Sonde ^c	Anteil ^d [%]
193	Ellipsoide, z. T. zerklüftet (0,8x1,5)	64	Nso190	83
	Zylinder mit runden Enden (0,5x1,1)	20	S*-Nse	70
	Kugeln (1,0)	7	Nsv443	8
	Zylinder mit runden Enden (0,3x0,8)	4	Nsr1156	4
	Spiralen mit runden Enden (0,5x3,2)	4	Nsr447	20
219	Zylinder mit runden Enden (0,4x1,3)	34	Nso190	94
	Ellipsoide, zerklüftet (0,7x0,9)	23	S*-Nse	84
	Zylinder mit runden Enden (0,5x2,2)	18	Nsv443	3
	Ellipsoide, zerklüftet (0,9x1,7)	16	Nsr1156	15
	nierenförmige (0,4x0,9)	7	Nsr447	11

^a Bezeichnungen in Anlehnung an STARR und SCHMIDT, 1981

^b Breite x Länge bzw. Durchmesser [μm]

^c Durch Einrückungen sind Sonden gekennzeichnet, deren Zielbereich durch darüberstehende Sonden abgedeckt wird.

^d Das DAPI-Signal entspricht 100 %.

Die Probe vom 193. Betriebstag wird zahlenmäßig von zwei Morphotypen dominiert. Hauptvertreter mit einem Anteil von über 60 % sind Ellipsoide mit zum Teil zerklüfteter Oberfläche, einer Breite von 0,8 μm und einer Länge von 1,5 μm (in Abbildung 3.3 durch Pfeile gekennzeichnet). Zylindrische Bakterien mit runden Enden (0,5 x 1,1 μm) sind mit 20 % vertreten. Ein Drittel der in der Probe vom 219. Betriebstag vorhandenen Organismen sind zylindrische Morphotypen mit runden Enden (0,4 x 1,3 μm). Mit je etwa 20 % sind kleinere (0,7 x 0,9 μm) und größere (0,9 x 1,7 μm) Ellipsoide mit zerklüfteter Oberfläche und zylindrische Bakterien mit runden Enden (0,5 x 2,2) vertreten.

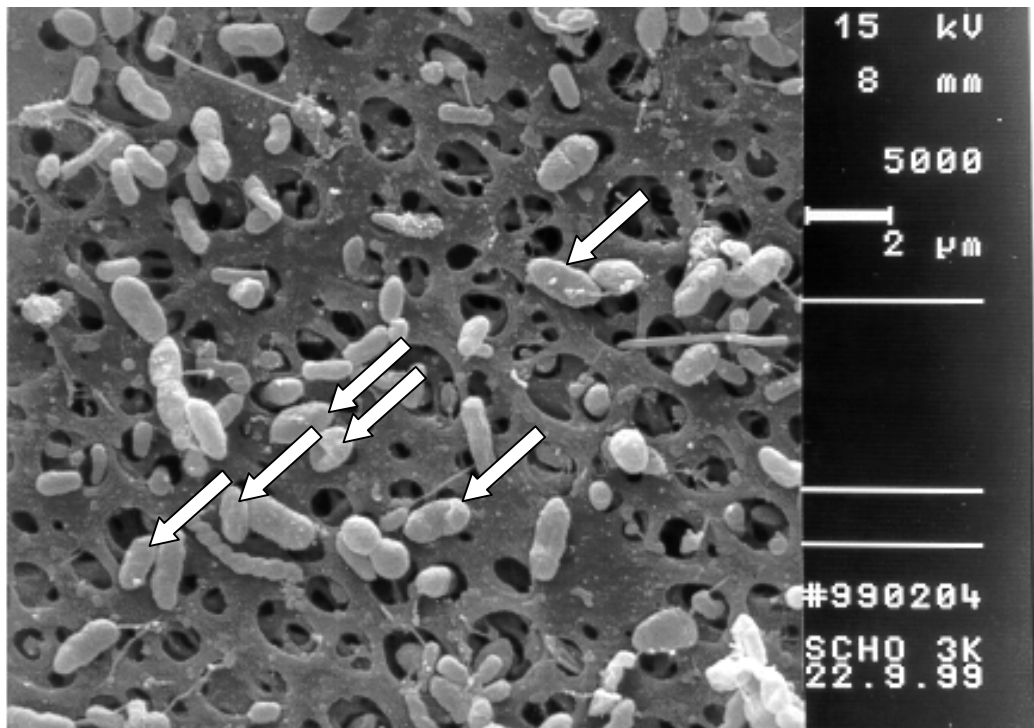


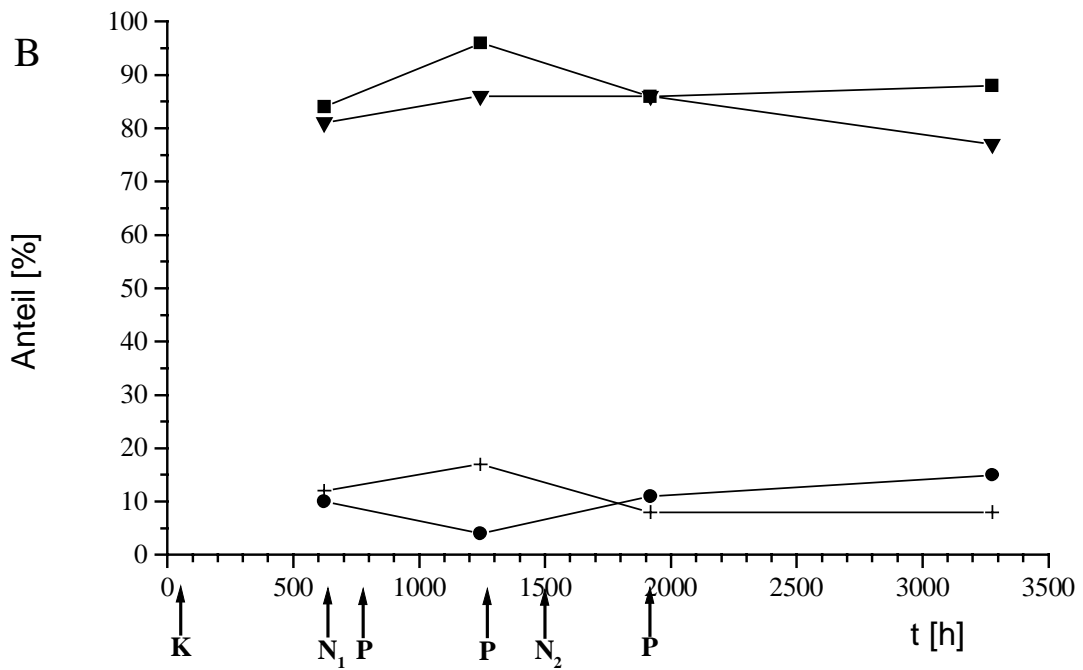
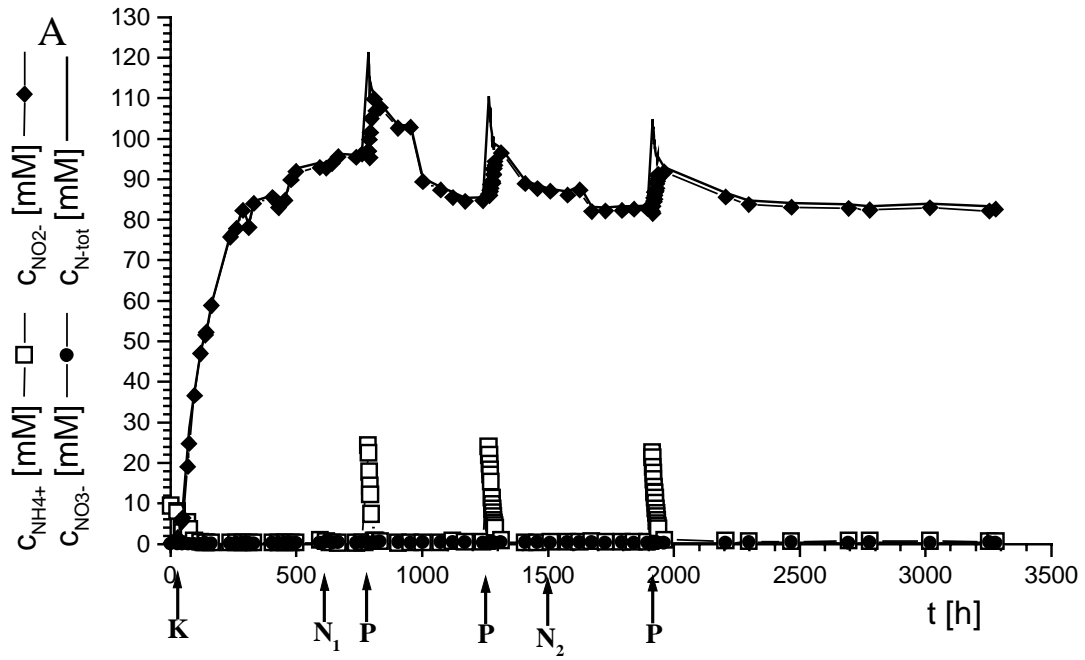
Abb. 3.3: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (5000fache Vergrößerung) der Mikroorganismenpopulation in Anreicherungskultur 3 nach 193tägigem Betrieb der kontinuierlichen Kultur. Durch die Pfeile sind Vertreter des zahlenmäßig dominierenden ellipsenförmigen Morphotypen mit zum Teil zerklüfteter Oberfläche gekennzeichnet.

3.4.2 Anreicherungskultur 6

3.4.2.1 Ablauf

Die Anreicherungskultur 6 wurde bei 28 °C in der Versuchsanlage 1 in Mineralmedium kultiviert. Zur vollständigen Biomasserückhaltung wurde ein außerhalb des Kultivierungsgefäßes installiertes Hohlfaser-Membranmodul eingesetzt (ZART, 1997). Die Bakterien-suspension wurde mit einer separaten Pumpe permanent auf der Retentatseite in das Membranmodul und nach Passage desselben wieder in den Fermenter geführt. Während die Bakterien vollständig zurückgehalten wurden, trat ein Teil der Kulturflüssigkeit auf die Filtratseite über und lief ab. Die Ammoniumkonzentration im Einlauf lag um 100 mM. Zur Versorgung der Kultur mit Sauerstoff wurde zunächst mit Luft (20 mL/min) begast, die Sauerstoffsättigung wurde über die Drehzahl auf 40 % geregelt. Zur pH-Statisierung (Sollwert: 7,40) und Versorgung der Zellen mit CO₂ wurde eine Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 %) eingesetzt (KOOPS und MÖLLER, 1992). Die Ammoniumkonzentration des Kultivierungsmediums lag zu Beginn bei 10 mM. Nach dem Animpfen (10 % Inokulum) wurde die Kultur zunächst für 50 h als Satzkultur und danach kontinuierlich mit einer Verdünnungsrate D von 0,006 h⁻¹ betrieben. Um zu untersuchen, inwieweit NO₂ die Denitrifikation des gebildeten Nitrits stimuliert (ZART und BOCK, 1998), wurde zwischen der 624. und der 1509. Betriebsstunde mit 50 ppm NO₂ dotierte Luft zur Begasung verwendet (Abschnitt 3.4.2.3). Dreimal wurde die Ammoniumkonzentration im Reaktor durch einen Puls auf etwa 25 mM erhöht. In Abbildung 3.4 sind die während der ersten 135 Tage der Kultivierung gemessenen Konzentrationen an Ammonium, Nitrit, Nitrat und die daraus berechnete Konzentration des Gesamtstickstoffs c_{N-tot} (A) und die mittels FISH bestimmten Anteile verschiedener nitrifizierender Bakterien an der Gesamtpopulation (B) dargestellt.

Mit Beginn der kontinuierlichen Betriebsweise steigt die Gesamtstickstoffkonzentration bis auf den durch die Ammoniumkonzentration des Einlaufs und die Flußraten F_E und F_K bedingten Wert von 95 mM an (Abbildung 3.4 A). Während der ersten 700 Stunden der Kultivierung wird Ammonium nahezu vollständig in Nitrit überführt, die Konzentrationen an Ammonium und Nitrat liegen jeweils unter 1 mM. Die Kultur ist Ammonium-limitiert. Es werden volumetrische Nitrifikationsraten von 0,56 mmol NH₄⁺·L⁻¹·h⁻¹ erzielt. Auch nach Erhöhung der im Reaktionsraum vorhandenen Ammoniumkonzentration durch Pulse auf etwa 25 mM kommt es nicht zu einem Anstieg der Nitratkonzentration.



3.4.2.2 FISH- und REM-Analysen

Die FISH-Analysen (Abbildung 3.4 B) zeigen, daß die Kultur zahlenmäßig von Ammoniak-oxidierenden β -Proteobacteria dominiert wird und daß mehr als 80 % der Organismen der *Nitrosomonas europaea*-Linie angehören. Das *Nitrospira*-Cluster ist mit 10 % vertreten. Obwohl kein Nitrat gebildet wird, können mit der Sonde Nsr447 auch *Nitrospira* Spezies (im Mittel etwa 10 %) nachgewiesen werden (vgl. Diskussion). Während der Kultivierung ändert sich die mikrobielle Zusammensetzung der Kultur kaum. FISH-Analysen mit der für *Nitrobacter* spp. spezifischen Sonde Nit3 ergaben unrealistisch hohe Anteile von bis zu 80 %. Sie wurden aufgrund der Ergebnisse des in 3.3.1 beschriebenen Kontrollexperimentes nicht berücksichtigt.

Die nach 620 bzw. 1250 Betriebsstunden aus der Anlage entnommenen Proben wurden ebenfalls rasterelektronenmikroskopisch untersucht. Die Auswertung der REM-Bilder ist in Tabelle 3.7 den Ergebnissen der dazugehörigen FISH-Analysen gegenübergestellt. Die in derselben Zeile aufgeführten REM- und FISH-Daten stehen nicht in einem direkten Zusammenhang (vgl. Diskussion).

Die Mikroorganismenpopulation setzte sich im wesentlichen aus drei unterschiedlichen Morphotypen zusammen. Hauptvertreter mit einem Anteil von über 70 % waren in beiden Fällen schlanke, ellipsenförmige Bakterien mit glatter Oberfläche, einer Breite von 0,7 - 0,8 μm und einer Länge von 1,5 - 1,7 μm (in Abbildung 3.5 durch Pfeile gekennzeichnet). Mit Anteilen von je etwa 10 % waren größere (0,4 - 0,5 x 1,3 - 1,8 μm) bzw. kleinere (0,4 - 0,5 x 0,8 - 0,9 μm) zylindrische Bakterien mit runden Enden vorhanden.

Abb. 3.4 (vorhergehende Seite): Kultivierung von Anreicherungskultur 6.

K=Beginn des kontinuierlichen Betriebs, N₁, N₂=Beginn und Ende der Begasung mit NO₂-haltiger Luft, P=Ammoniumpuls.

A: Konzentrationen an Ammonium, Nitrit, Nitrat und Gesamtstickstoff.

B: Anteile verschiedener nitrifizierender Bakterien an der Gesamtpopulation (HAMZAVI, 2000). Das DAPI-Signal entspricht 100 %.

- Nso190 (Ammoniak-oxidierende β -Proteobacteria)
- ▼ S*-Nse (*N. europaea*-Linie)
- Nsv443 (*Nitrospira*-Cluster)
- + Nsr447 (einige Süßwasser-*Nitrospira* spp.)

Tab. 3.7: Auswertung der REM-Bilder und der FISH-Analysen (Anreicherungskultur 6).

Stunde	REM		FISH	
	Morphotyp ^a , Abmessungen ^b	Anteil [%]	Sonde ^c	Anteil ^d [%]
620	Ellipsoide, glatt (0,7x1,5)	87	Nso190	84
	Zylinder mit runden Enden (0,5x1,8)	8	S*-Nse	81
	Zylinder mit runden Enden (0,5x0,9)	4	Nsv443 Nsr447	10 12
1250	Ellipsoide, glatt (0,8x1,7)	75	Nso190	96
	Zylinder mit runden Enden (0,9x1,7)	14	S*-Nse	86
	Zylinder mit runden Enden (0,4x0,8)	11	Nsv443 Nsr447	4 17

^a Bezeichnungen in Anlehnung an STARR und SCHMIDT, 1981

^b Breite x Länge [μm]

^c Durch das Einrücken sind Sonden gekennzeichnet, deren Zielbereich durch linksbündig darüberstehende Sonden abgedeckt wird.

^d Das DAPI-Signal entspricht 100 %.

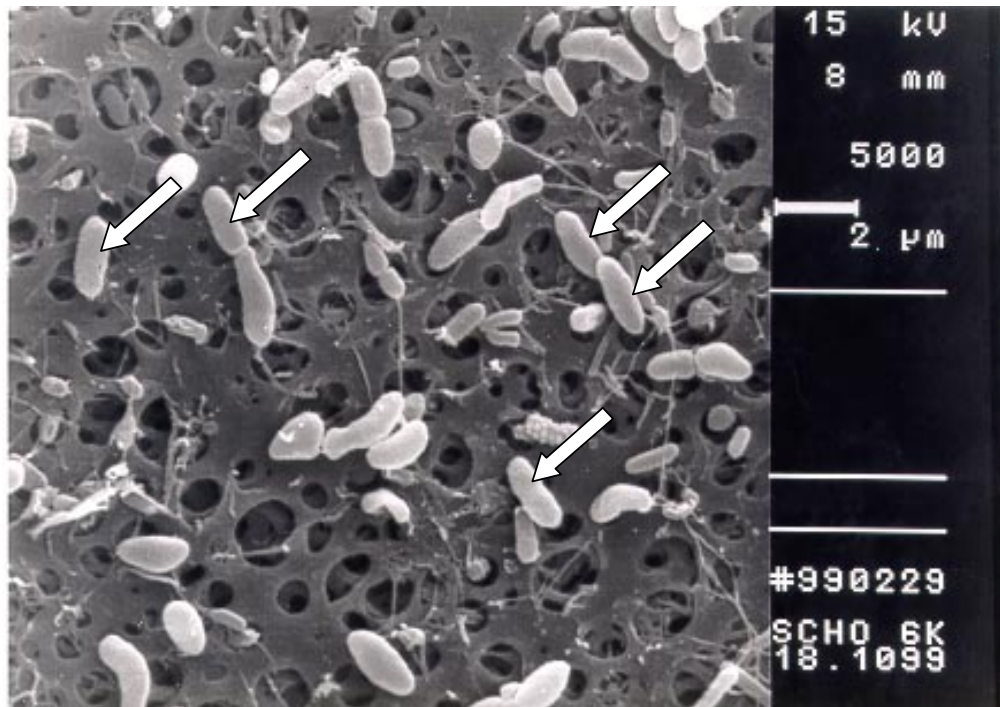


Abb. 3.5: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Mikroorganismenpopulation nach 1250stündigem Betrieb der kontinuierlichen Kultur bei 5000facher Vergrößerung. Durch die Pfeile sind Vertreter des zahlenmäßig dominierenden ellipsenförmigen Morphotypen gekennzeichnet.

3.4.2.3 Einfluß von NO₂

Um festzustellen, inwieweit NO₂ die Denitrifikation des Nitrits stimuliert (ZART und BOCK, 1998), wurde zwischen der 624. und der 1509. Betriebsstunde (Abbildung 3.4) mit 50 ppm NO₂ dotierte Luft zur Begasung der Kultur eingesetzt. Tabelle 3.8 enthält die im steady-state (vor den in der 1265. und 1914. Betriebsstunde durchgeführten Ammoniumpulsen) ermittelten Konzentrationen bzw. Konzentrationsdifferenzen. Zur Berechnung der Konzentration des im gelösten Protein vorhandenen Stickstoffs $c_{N-gProt}$ wurde ein Massenanteil des Stickstoffs von 16 % zugrundegelegt (WILSON und WALKER, 1994, LOTTSPEICH und ZORBAS, 1998). Mit dem prozentualen Stickstoffverlust ist derjenige Anteil des entfernten Ammoniumstickstoffs bezeichnet, der nicht als gebildetes Nitrit, Nitrat bzw. im gelösten Protein wiedergefunden werden kann.

Tab. 3.8: Bei der kontinuierlichen Kultivierung ($D=0,006 \text{ h}^{-1}$) mit Anreicherungskultur 6 unter Ammoniumlimitation ($c < 0,5 \text{ mM}$) ermittelte Stoffwechselgrößen. Δc =Konzentrations-differenz zwischen Aus- und Einlauf, + Zunahme, - Abnahme, N-gProt, N-zProt = im gelösten bzw. im zellulären Protein festgelegter Stickstoff, c_{zProt} =Konzentration des zellulären Proteins.

NO ₂ - Gehalt ^a	t [h]	$\Delta c_{NH_4^+}$ [mM]	$\Delta c_{NO_2^-}$ [mM]	$\Delta c_{NO_3^-}$ [mM]	$\Delta c_{N-gProt}$ [mM]	$\Delta c_{N-zProt}$ [mM]	c_{gProt} [mg·L ⁻¹]	c_{zProt} [mg·L ⁻¹]	Z ^b	N-Verlust [%]
50	1264	-85,7	+85,5	+0,3	+0,2	0	20,2	33,1	29	0 ^c
0	1913	-83,0	+82,1	+0,2	+0,2	0	18,9	32,4	38	0,6

^a Gehalt an Stickstoffdioxid in der Begasungsluft [ppm]

^b Zellzahl [10^{10} L^{-1}]

^c In diesem Fall wird rechnerisch geringfügig mehr Stickstoff (0,4 %) im gebildeten Nitrit, Nitrat und gelösten Protein wiedergefunden, als aufgrund der entfernten Ammoniummenge zu erwarten wäre.

Tabelle 3.9 enthält die mit den Gleichungen 2.13 und 2.14 berechneten Nitrifikationsraten vNR und sNR sowie die über die Massenabnahme des Kontrollmittelgefäßes berechneten Baseverbrauchsraten BCR.

Tab. 3.9: Berechnete Nitrifikationsraten und Baseverbrauchsraten.

t [h]	vNR^a	sNR^b	BCR ^c	BCR/ vNR
1264	0,513	0,015	1,04	2,03
1913	0,497	0,015	1,00	2,01

^a Volumetrische Nitrifikationsrate [$\text{mmol NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

^b Spezifische Nitrifikationsrate [$\text{mmol NH}_4^+ \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

^c Baseverbrauchsrate [$\text{mmol HCO}_3^- \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$]

Aus Tabelle 3.8 geht hervor, daß unter steady-state Bedingungen sowohl mit 50 ppm NO₂ in der Begasungsluft (1264. Betriebsstunde) als auch bei Begasung mit NO₂-freier Luft (1913. Betriebsstunde) der entfernte Ammoniumstickstoff vollständig wiedergefunden werden kann, Stickstoffverluste somit nicht erkennbar sind. Etwa 99 % des entfernten Ammoniums werden zu Nitrit umgesetzt. Die Nitrifikationsraten v_{NR} und s_{NR} liegen um $0,500 \text{ mmol NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ bzw. $0,015 \text{ mmol NH}_4^+ \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Tabelle 3.9). Das BCR/ v_{NR} -Verhältnis zeigt, daß - wie zu erwarten (GERNAEY et al., 1997) - zwei Moleküle Hydrogencarbonat pro Molekül nitrifiziertes Ammonium dosiert werden müssen. Der Zusatz von 50 ppm NO₂ zur Begasungsluft hat keinen Einfluß auf die Umsetzungen.

Um den Einfluß von NO₂ bei deutlich höheren Ammoniumkonzentrationen zu ermitteln, wurden Pulseexperimente durchgeführt. Dazu wurde die Niveauregelung ausgeschaltet, der Reaktor kontinuierlich mit einer konstanten Flußrate des Auslaufs F_A betrieben und die Konzentration an Ammonium im Reaktionsvolumen durch Pulse auf etwa 25 mM erhöht.

In den Abbildungen 3.6 (Begasungsluft mit 50 ppm NO₂) und 3.7 (NO₂-freie Begasungsluft) sind Zeitintervalle von 24 Stunden unmittelbar nach Durchführung der Ammoniumpulse vergrößert dargestellt. Sie umfassen neben den Konzentrationen an Ammonium, Nitrit und Nitrat (A), die Konzentrationen an gelöstem und zellulärem Protein und die Kulturtrübung OD₅₇₈ (B) sowie einzelne Online-Daten (C).

Abbildung 3.6 zeigt, daß die Rührerdrehzahl n unmittelbar nach dem Ammoniumpuls von etwa 400 auf knapp 500 Upm ansteigt, während der folgenden knapp 14 Stunden weitgehend konstant bleibt und anschließend annähernd linear abfällt. Der Verbrauch an Natriumhydrogencarbonat-Lösung ist zu Beginn am größten (während der ersten drei Stunden werden etwa 8,5 mL pro Stunde dosiert). Er sinkt dann zunächst langsam und ab dem Zeitpunkt, an dem die Rührerdrehzahl sichtbar abfällt, schneller. Zuletzt werden nur noch etwa 3 mL pro Stunde dosiert. Die Abnahme der Ammoniumkonzentration setzt ohne sichtbare zeitliche Verzögerung ein und korrespondiert mit dem Korrekturmittelverbrauch. Sie ist während der ersten drei Stunden am steilsten (etwa $1,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), liegt anschließend für ca. 10 Stunden annähernd konstant um $1,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ und nimmt zu dem Zeitpunkt deutlich ab, ab dem auch die Rührerdrehzahl sichtbar abfällt. Während der letzten drei Stunden des dargestellten Zeitintervalls liegt sie bei etwa $0,4 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. Die Konzentration des Nitrits nimmt über den gesamten dargestellten Zeitraum annähernd konstant von etwa 86 mM bis auf knapp 95 mM

zu. Die Nitratkonzentration liegt konstant unter 0,3 mM. Die Konzentration des zellulären Proteins c_{zProt} und die Kulturtrübung OD_{578} lassen keine Veränderung erkennen, sie liegen konstant um $32 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. um 0,35. Die Konzentration des gelösten Protein c_{gProt} liegt zu Beginn und am Ende des dargestellten Zeitbereichs konstant bei etwa $20 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Zwischenzeitlich ist ein rascher Anstieg auf fast $25 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ und ein allmählicher Rückgang auf den Ausgangswert zu erkennen. Zu keinem Zeitpunkt konnte Glycerin im Medium nachgewiesen werden (bei Zusatz von 50 ppm NO_2 zur Begasungsluft gibt *N. eutropha* N904 Glycerin ins Medium ab [ZART und BOCK, 1998]).

Abbildung 3.7 zeigt hinsichtlich der Online-Daten einen ähnlichen Verlauf wie Abbildung 3.6. Unmittelbar nach dem Ammoniumpuls steigt die Rührerdrehzahl von 400 auf über 480 Upm an, bleibt für etwa 13 Stunden annähernd konstant bei knapp 480 Upm und sinkt dann sichtbar ab. Der Verbrauch an Natriumhydrogencarbonat ist zu Beginn am größten, sinkt zunächst langsam und erst ab dem Zeitpunkt schneller, ab dem auch die Rührerdrehzahl sichtbar zurückgeht. Die Ammoniumkonzentration nimmt in den ersten 1,5 Stunden vergleichsweise langsam (etwa $0,8 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) und unmittelbar danach schneller ($1,6 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) ab. Anschließend fällt sie zuerst annähernd konstant (etwa $1,1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$) und ab der 1229. Betriebsstunde sichtbar langsamer ab. Zwischenzeitlich (zwischen der 1223. und 1224,5. Stunde) bleibt die Ammoniumkonzentration annähernd unverändert. Die Konzentration des Nitrits nimmt annähernd konstant von etwa 82 mM auf etwa 91 mM zu. Die Nitratkonzentrationen liegt in allen Fällen unter 0,3 mM. Die Konzentration des zellulären Proteins c_{zProt} und die optische Dichte OD_{578} lassen keine Veränderung erkennen, sie liegen konstant um $33 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ bzw. um 0,36. Bei der Konzentration des gelösten Proteins c_{gProt} ist ein schwacher Anstieg zu erkennen, sie nimmt von $18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ auf $23 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ zu. Während des dargestellten Zeitbereichs konnte ebenfalls kein Glycerin im Medium nachgewiesen werden.

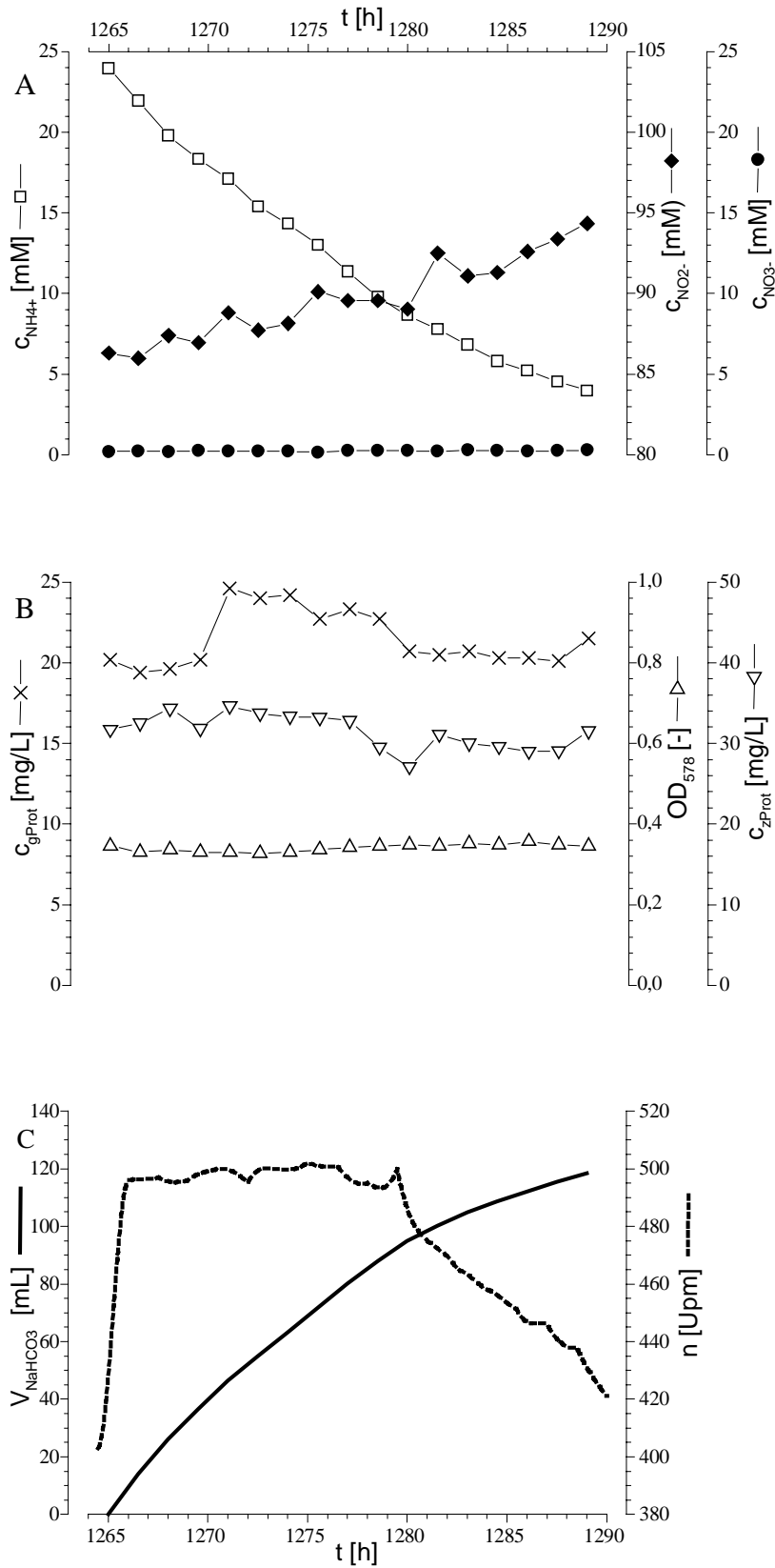


Abb. 3.6: Daten für den Zeitausschnitt von 1265 - 1289 h (Abb. 3.4). Etwa 90 Sekunden nach dem Puls wurde die erste Probe genommen. A, B: Metabolite (offline), C: Carbonat-Verbrauch und Drehzahl (online).

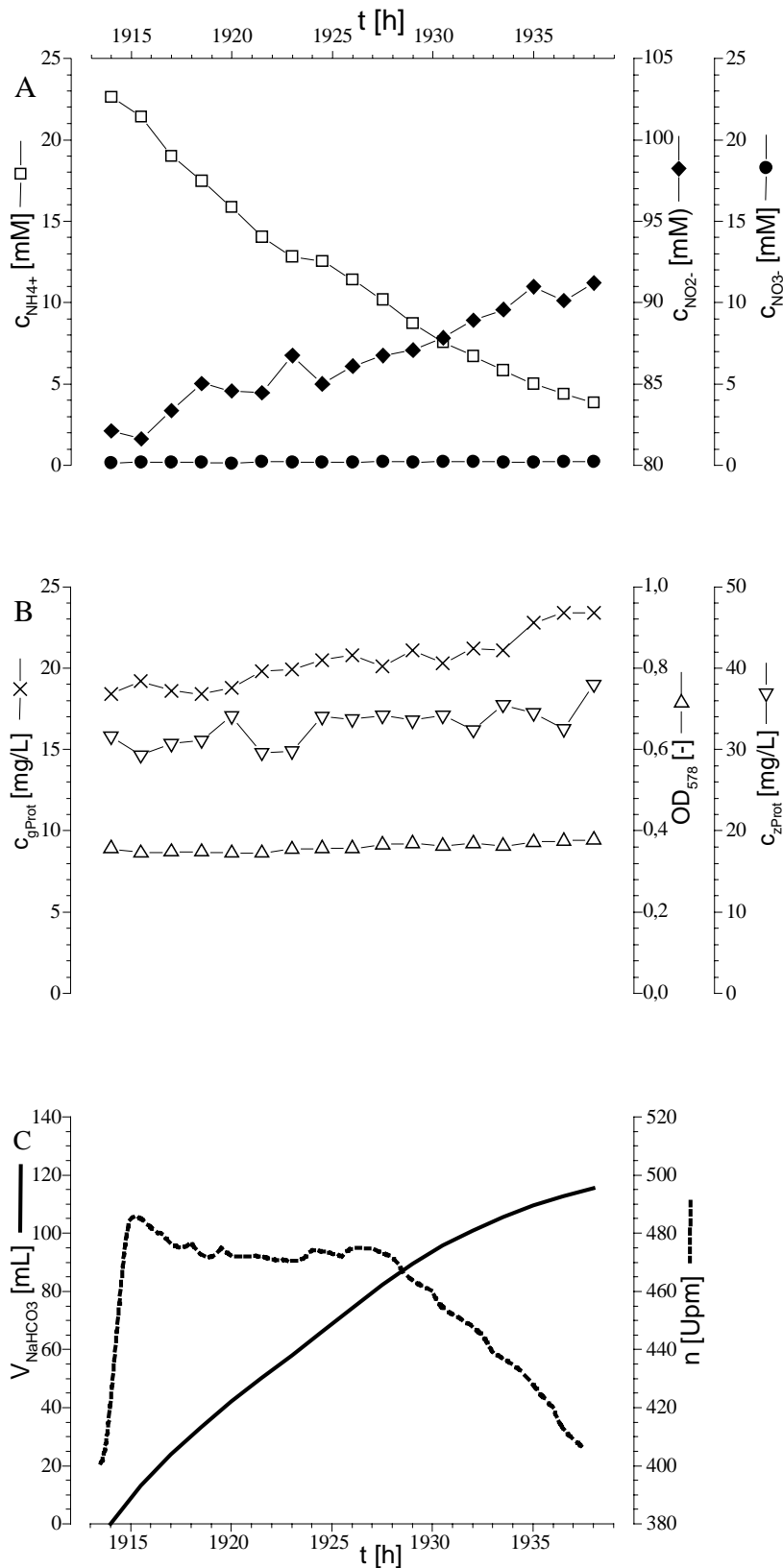


Abb. 3.7: Daten für den Zeitausschnitt von 1914 - 1938 h (Abb. 3.4). Etwa 90 Sekunden nach dem Puls wurde die erste Probe genommen. A, B: Metabolite (offline), C: Carbonat-Verbrauch und Drehzahl (online).

Die Auswertung der in den Abbildungen 3.6 und 3.7 dargestellten Pulsversuche erfolgte unter Verwendung der Bilanzen für Ammonium, Nitrit, Nitrat, Biotrockenmasse und gelöstes Protein (Gleichungen 2.8 bis 2.12). Es wurde jeweils ein Zeitpunkt mit einer Konzentration an Ammonium von etwa 20 mM und ein Zeitpunkt mit einer Konzentration an Ammonium um 5 mM betrachtet. Da nicht ausgeschlossen werden kann, daß der Reaktor zum Zeitpunkt der nach dem Puls erfolgten ersten Probenahme noch nicht vollständig durchmischt war (NOGGLE, 1993), wurden die entsprechenden Werte bei der Auswertung nicht berücksichtigt. Die zeitliche Änderung der Konzentration des jeweiligen Metaboliten wurde durch das Anlegen der Tangente an den jeweiligen Kurvenverlauf ermittelt. Das zu jedem Probenahmezeitpunkt vorhandene Reaktionsvolumen $V(t)$ wurde aus dem Reaktionsvolumen zu Beginn des Pulsversuchs $V(0)$, den konstanten Flußraten des Einlaufs F_E , des Auslaufs F_A und der Probenahme F_{PN} sowie dem in der Zeit t dosierten Volumen des Kontrollmittels $V_K(t)$ berechnet (Gleichung 3.1). $V_K(t)$ wurde aus der Massenabnahme der Korrekturmittelflasche und der Dichte der Natriumhydrogencarbonat-Lösung (10 %) von $1,067 \text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (DANS-LAX, 1967) ermittelt. Die Probenahme (alle 1,5 Stunden wurden 13,5 mL aus dem Reaktionsraum entnommen) wurde durch eine konstante Flußrate F_{PN} von $9 \text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$ berücksichtigt.

$$V(t) = V(0) + F_E \cdot t + V_K(t) - F_A \cdot t - F_{PN} \cdot t \quad (3.1)$$

Die zeitliche Änderung des Reaktionsvolumens dV/dt wurde durch Differentiation der $V(t)$ -t-Kurve mit dem Programm ORIGIN 4.10 ermittelt. Für die Bestimmung von v_{NR} (Gleichung 2.15) wurden die Biotrockenmassekonzentrationen durch Multiplikation der Proteingehalte c_{zProt} mit dem Faktor 2 berechnet und konstante Massenanteile des Stickstoffs von 14 % an der Biotrockenmasse (STANIER et al., 1986; SCHLEGEL, 1992) und 16 % am gelösten Protein (WILSON und WALKER, 1994; LOTTSPPEICH und ZORBAS, 1998) angenommen. Tabelle 3.10 enthält die volumetrischen Nitrifikationsraten v_{NR} [$\text{mmol NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] und die Summen der Raten der Nitrit- und Nitratbildung $r_{NO_2^-} + r_{NO_3^-}$ [$(\text{mmol NO}_2^- + \text{mmol NO}_3^-) \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] für den Zeitpunkt I mit hoher Ammoniumkonzentration (ca. 20 mM, 3 h nach dem Puls) und den Zeitpunkt II mit niedriger Ammoniumkonzentration (ca. 5 mM, 21 h nach dem Puls).

Tab. 3.10: Volumetrische Nitrifikationsraten vNR [$\text{mmol NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] und Summen der Raten der Nitrit- und Nitratbildung $r_{\text{NO}_2^-} + r_{\text{NO}_3^-}$ [$(\text{mmol NO}_2^- + \text{mmol NO}_3^-) \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$] für Zeitpunkt I mit hoher Ammoniumkonzentration (ca. 20 mM, 3 h nach dem Puls) und Zeitpunkt II mit niedriger Ammoniumkonzentration (ca. 5 mM, 21 h nach dem Puls).

	Puls in der 1265. Stunde		Puls in der 1914. Stunde	
	(50 ppm NO_2 in der Begasungsluft)		$(\text{NO}_2$ -freie Begasungsluft)	
	I	II	I	II
vNR^a	1,50	1,02	1,52	0,99
$r_{\text{NO}_2^-} + r_{\text{NO}_3^-}$	1,12	1,07	1,19	1,03
$(r_{\text{NO}_2^-} + r_{\text{NO}_3^-})/vNR$ [%]	75	105	78	104

^a Wie in der Literatur üblich, werden positive Zahlenwerte angegeben, obwohl es sich um eine Verbrauchsrate handelt.

Tabelle 3.10 zeigt, daß in beiden Pulsexperimenten im Bereich hoher Ammoniumkonzentrationen (um 20 mM, Zeitpunkt I) mehr Ammonium durch Nitrifikation verschwindet, als Nitrit und Nitrat gebildet werden. Kurzzeitig treten N-Verluste von etwa 25 % auf. Bei Konzentrationen an Ammonium um 5 mM (Zeitpunkt II) dagegen sind vNR und $r_{\text{NO}_2^-} + r_{\text{NO}_3^-}$ annähernd gleich, N-Verluste sind in beiden Fällen nicht zu verzeichnen. Ein Einfluß von NO_2 ist nicht zu erkennen.

Die spezifischen Nitrifikationsraten sNR liegen um $0,05 \text{ mmol NH}_4^+ \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Zeitpunkt I) bzw. um $0,03 \text{ mmol NH}_4^+ \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (Zeitpunkt II).

Die Pulsexperimente legten nahe, daß für das Auftreten von N-Verlusten Konzentrationen an Ammonium erforderlich sind, die über 5 mM liegen. Daher wurde (bei Begasung der Kultur mit NO_2 -freier Luft) die Verdünnungsrate D schrittweise von 0,006 auf $0,015 \text{ h}^{-1}$ erhöht, was zu erhöhten Ammoniumgehalten führte (Werte nicht in Abbildung 3.4 dargestellt). Für 14 Tage wurde ein stationärer Zustand mit Ammoniumkonzentrationen im Auslauf um 19 mM aufrechterhalten. Die gemessenen Konzentrationen bzw. Konzentrationsdifferenzen sind in Tabelle 3.11 dargestellt. Zur Berechnung der Konzentrationen des im gelösten Protein vorhandenen Stickstoffs wurde ein Massenanteil von 16 % zugrundegelgt (WILSON und WALKER, 1994; LOTTSPEICH und ZORBAS, 1998). Mit dem prozentualen Stickstoffverlust ist derjenige Anteil des entfernten Ammoniumstickstoffs bezeichnet, der nicht als gebildetes Nitrit, Nitrat bzw. gelöstes Protein wiedergefunden werden kann. Tabelle 3.12 enthält die mit den Gleichungen 2.13 und 2.14 ermittelten Nitrifikationsraten vNR und sNR sowie die über die Massenabnahme des Kontrollmittelgefäßes berechnete Baseverbrauchsrate BCR.

Tab. 3.11: Bei der kontinuierlichen Kultivierung (Begasung mit NO₂-freier Luft, D=0,015 h⁻¹) der Anreicherungskultur 6 nach Aufhebung der Ammonium-Limitierung (c_{NH₄⁺} ≈ 19 mM) ermittelte Stoffwechselgrößen. Δc=Konzentrationsdifferenz zwischen Aus- und Einlauf, + = Zunahme, - = Abnahme, N-gProt, N-zProt = im gelösten bzw. im zellulären Protein festgelegter Stickstoff, c_{zProt}=Konzentration des zellulären Proteins.

Δc _{NH₄⁺}	Δc _{NO₂⁻}	Δc _{NO₃⁻}	Δc _{N-gProt}	Δc _{N-zProt}	c _{gProt}	c _{zProt}	Z ^a	N-Verlust	CSB
[mM]	[mM]	[mM]	[mM]	[mM]	[mg·L ⁻¹]	[mg·L ⁻¹]		[%]	[mg/L]
-70,6	+65,8	+0,1	+0,2	0	13,5	38,4	28	6,4	1148

^a Zellzahl [10¹⁰ L⁻¹]

Tabelle 3.11 zeigt, daß nach Aufhebung der Ammonium-Limitierung ein Stickstoffverlust von ca. 6 % auftritt. Ca. 93 % des entfernten Ammoniums werden zu Nitrit umgesetzt. Wie im Fall der Ammonium-limitierten Kulturen (Tabelle 3.8) liegt der Nitratgehalt im Ablauf deutlich unter 1 mM. Der hohe stationäre CSB-Wert ist nicht etwa auf organische Verbindungen zurückzuführen. Er wird zu über 90 % durch das vorhandene Nitrit verursacht, da dieses im Gegensatz zu Ammonium bei der CSB-Bestimmung miterfaßt wird (HENZE et al., 1997). Wie Tabelle 3.12 zeigt, liegen die im stationären Zustand erzielten Nitrifikationsraten etwa doppelt so hoch wie die im Fall der Ammoniumlimitierung ermittelten (Tabelle 3.8). Das BCR/vNR-Verhältnis liegt bei dem für die Ammoniak-Oxidation typischen Wert von 2,0 (GERNAEY et al., 1997). Mit den N-Verlusten geht demnach kein Protonenverbrauch einher.

Tab. 3.12: Berechnete Nitrifikationsraten und Baseverbrauchsrate.

vNR ^a	sNR ^b	BCR ^c	BCR/vNR
1,056	0,028	2,11	2,00

^a Volumetrische Nitrifikationsrate [mmol NH₄⁺·L⁻¹·h⁻¹]

^b Spezifische Nitrifikationsrate [mmol NH₄⁺·(mg zProt)⁻¹·h⁻¹]

^c Baseverbrauchsrate [mmol HCO₃⁻·L⁻¹·h⁻¹]

Die Inbetriebnahme des Biostat B war mit den Informationen des Betriebshandbuchs (BRAUN BIOTECH INTERNATIONAL, 1996) problemlos. Die MFCS/win-Software konnte dagegen nicht sofort eingesetzt werden, weil ein Bestandteil des Betriebssystems (Service Pack) fehlte. Nach der Behebung dieses Mangels lief das gesamte System sehr zuverlässig. Während des Dauerbetriebs über mehr als 180 Tage führte mikrobieller Bewuchs auf dem Membranmodul der Sauerstoffelektrode zu Signalschwankungen. Die mechanische Entfernung des Biofilms mit einem weichen Lappen und anschließende Reinigung mit 1 M Citronensäure (20 min) erwiesen sich als geeignete Maßnahmen zur Behebung des Problems.

3.5 Charakterisierung und Klassifizierung von *T. mechernichensis* TL1

Bei den ersten Versuchen zur Charakterisierung der Mikroorganismenflora der Mechernicher STK-Anlage wurde ein Anreicherungsmedium, das dem von *Thiosphaera pantotropha* entspricht, verwendet. Aus dem Biofilm der STK-Anlage (Abbildung 1.3) wurde damit ein heterotropher Nitrifizierer/aerober Denitrifizierer, Stamm TL1, isoliert und teilweise charakterisiert (LUKOW, 1996). Im Gegensatz zu *T. pantotropha*, der zur α -Gruppe der Proteobacteria gehört, gehört TL1 zur β -Gruppe der Proteobacteria. Die Analyse von Teilsequenzen der 16S rDNA ergab, daß er der Gattung *Thauera* nahesteht (LUKOW und DIEKMANN, 1997). In dieser Gattung finden sich Stämme, die unter anaeroben Bedingungen Aromaten abbauen und denitrifizieren; nitrifizierende Eigenschaften waren bisher nicht festgestellt worden. Deshalb war es notwendig, den Stamm TL1 näher zu untersuchen.

3.5.1 Phänotypische Tests und Physiologie

3.5.1.1 Transmissionselektronenmikroskopie

Bei einigen Gattungen autotropher Nitrifizierer wurden intracytoplasmatische Membranen nachgewiesen, die in Form von Lamellenpaketen vorliegen (REMSEN et al., 1967; WATSON et al., 1981). Inwieweit auch heterotrophe Nitrifizierer intracytoplasmatische Membranen besitzen, ist nicht bekannt. Deshalb wurden transmissionselektronenmikroskopische Untersuchungen mit TL1 durchgeführt (Abbildung 3.8).

Aerob auf mineralischem Medium mit Acetat und Ammonium angezogene Zellen enthalten keine intracytoplasmatischen Membranen. Bei Abwesenheit von Nitrat werden intracellulär Granula angehäuft, die z. T. transparent sind (Abbildung 3.8b). Nach Anzucht in demselben Medium mit Nitrat werden keine Granula gebildet (Abbildung 3.8a).

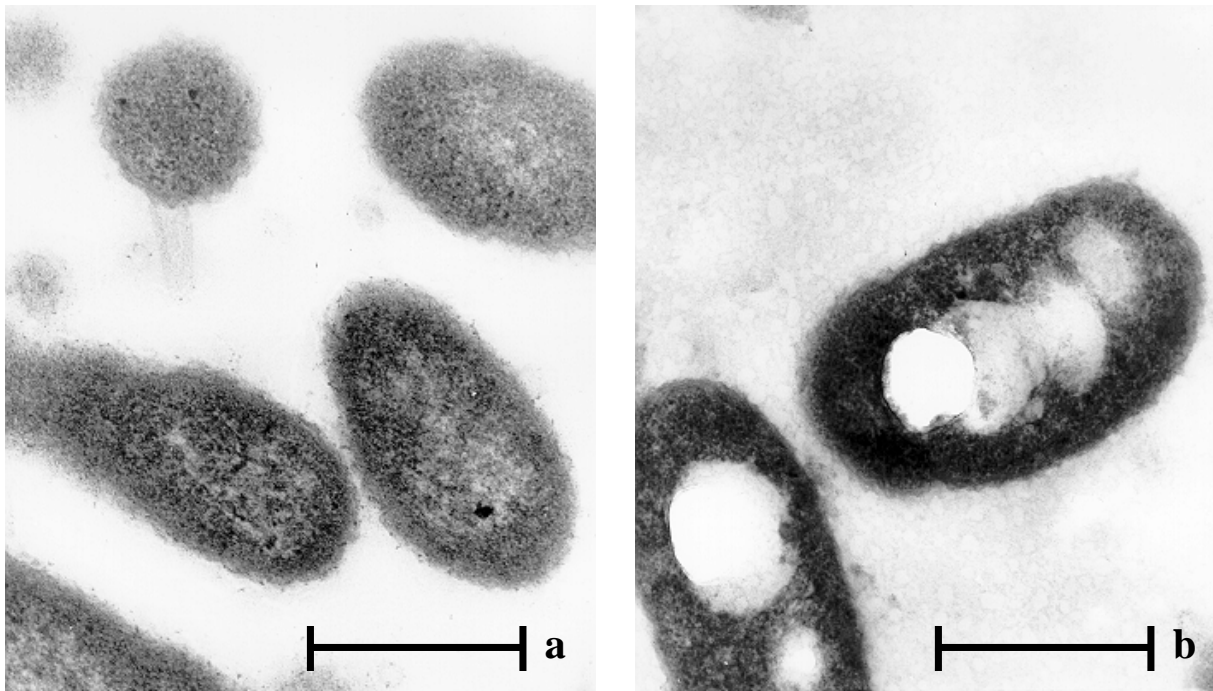


Abb. 3.8: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von Stamm TL1. Dünnschnitte von Zellen nach zehnstündiger aerober Kultivierung auf Medium 1 **a** mit und **b** ohne Nitrat. Die Balken entsprechen 0,5 µm.

3.5.1.2 Akkumulation von Poly- β -hydroxybuttersäure (PHB)

In Ultradünnschnitten ist ein transparentes Aussehen für Granula aus Poly- β -hydroxybuttersäure (PHB) charakteristisch (MAYER, 1986). Es wurde daher untersucht, ob es sich bei den in Abbildung 3.8b erkennbaren Einschlüssen um PHB-Granula handelt. Nach Anfärbung mit Nilblausulfat (OSTLE und HOLT, 1982) besitzt der überwiegende Teil der in Medium 1 ohne Nitrat angezogenen Zellen (91 %) hellorange fluoreszierende PHB-Einschlüsse (Tabelle 3.13). Diese sind im Hellfeld stark lichtbrechend. Die Zellen enthalten in der Regel zwei bis vier solcher Einschlüsse. Nach Anzucht der Zellen in Medium 1 mit Nitrat ist der Anteil PHB-haltiger Zellen mit 8 % deutlich niedriger (Tabelle 3.13). Die Granula sind deutlich kleiner, pro Zelle liegt nur ein Einschluß vor.

Tab. 3.13: Anzahl PHB-haltiger und PHB-freier Zellen von TL1 nach Anzucht in Medium 1 ohne bzw. mit Nitrat.

	Anzucht ohne Nitrat	Anzucht mit Nitrat
Anzahl PHB-haltiger Zellen	96	8
Anzahl PHB-freier Zellen	10	92
Anteil PHB-haltiger Zellen [%]	91	8

3.5.1.3 Wachstum auf verschiedenen Substraten

Der Stamm TL1 wurde auf aerobes und anaerobes Wachstum auf verschiedenen aliphatischen und aromatischen Verbindungen als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle untersucht. Die Kultivierung erfolgte in 100 mL Medium 1 und bei 120 Upm in 500 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane (aerob) bzw. in gasdicht verschlossenen 125 mL-Serumflaschen (anaerob). Vor dem Autoklavieren wurde das Medium in den Anaerobansätzen mit O₂-freiem Stickstoff begast (MILLER und WOLIN, 1974). Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.14 dargestellt.

Tab. 3.14: Wachstum von TL1 unter aeroben und anaeroben Bedingungen mit verschiedenen Verbindungen als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Kultivierung erfolgte für drei Tage bei 37 °C in Medium 1, die Konzentration der jeweiligen Verbindung betrug 5 mM. + Wachstum, (+) schwaches Wachstum, - kein Wachstum.

Substrat	aerob	anaerob
Acetat	+	+
2-Aminobenzoat	+	+
Benzoat	+	+
L-Glutamat	+	+
4-Hydroxybenzoat	+	+
L-Leucin	+	+
Phenol	-	+
Phenylacetat	+	+
DL-Phenylalanin	(+)	(+)
Propionat	+	+

Unter aeroben Bedingungen verwertet TL1 alle der getesteten Substanzen außer Phenol. In Abwesenheit von Sauerstoff werden alle Verbindungen einschließlich Phenol verwertet. Mit DL-Phenylalanin als einziger Kohlenstoff- und Energiequelle erfolgt sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Bedingungen nur schwaches Wachstum.

3.5.1.4 Wachstumstemperatur

Die Werte der für TL1 bei verschiedenen Inkubationstemperaturen ermittelten maximalen spezifischen Wachstumsraten μ_{\max} und der daraus berechneten Verdopplungszeiten t_d sind in Tabelle 3.15 aufgelistet.

Tab. 3.15: Maximale spezifische Wachstumsraten μ_{\max} und Verdopplungszeiten t_d des Stammes TL1 in Medium 2 bei verschiedenen Inkubationstemperaturen.

Inkubationstemperatur [°C]	μ_{\max} [h ⁻¹]	t_d [h]
34	0,36	1,93
37	0,60	1,16
40	1,04	0,67
44	0,50	1,39

Die höchste maximale spezifische Wachstumsrate μ_{\max} wird bei einer Inkubationstemperatur von 40 °C erreicht und liegt etwa um den Faktor zwei über den für 37 bzw. 44 °C ermittelten.

3.5.1.5 N₂O als Denitrifikationsprodukt

Der Nachweis von N₂O als Produkt der Denitrifikation unter anaeroben Bedingungen erfolgt, wie unter 2.6.13 beschrieben, gaschromatographisch. Das N₂O-Signal erscheint bei Retentionszeiten um 1,25 min (Abbildung 3.9).

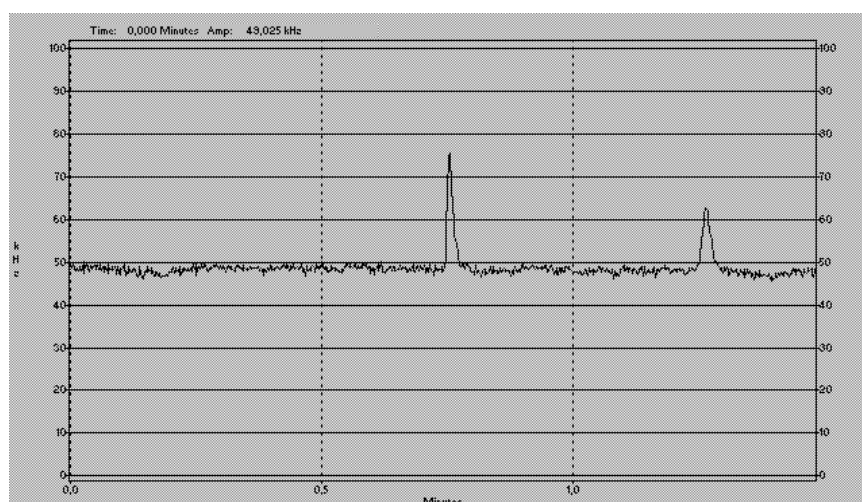


Abb. 3.9: Chromatogramm der nach 3 h aus dem Gasraum von Ansatz 1 entnommenen Probe. Bei Retentionszeiten um 1,25 min erscheint das N₂O-Signal. Das Signal bei 0,75 min wird durch den Luftsauerstoff in der Kanüle der Gasspritze verursacht.

Nach dreistündiger Inkubation ist N_2O im Gasraum der Ansätze eindeutig nachweisbar (Abbildung 3.9). Die N_2O -Signale nehmen mit zunehmender Inkubationsdauer wieder ab und sind nach 18stündiger Inkubation nicht mehr nachzuweisen (Tabelle 3.16).

Tab. 3.16: Entwicklung der N_2O -Peakhöhen h bei der Denitrifikation von TL1 unter anaeroben Bedingungen in zwei Parallelansätzen A und B.

Inkubationsdauer [h]	$h_{\text{Ansatz A}}$ [cm]	$h_{\text{Ansatz B}}$ [cm]
3,0	1,1	0,6
4,5	0,3	0,3
18,0	0	0

3.5.1.6 Nitrit-Toleranz und -reduktion

TL1 wurde bei 37 °C als Schüttelkultur (150 Upm) in 100 mL-Erlenmeyerkolben ohne Schikane mit 50 mL nitratfreiem Medium 1 mit verschiedenen Anfangskonzentrationen an Nitrit kultiviert. Abbildung 3.10 zeigt die bei Nitritgehalten von 0, 5 und 10 mM ermittelten Werteverläufe.

In allen Fällen steigt die Konzentration des zellulären Proteins $c_{z\text{Prot}}$ von gut 30 mg/L (dem durch das Inokulum bedingten Wert) bis auf etwa 160 mg/L an. Das Ende des zellulären Wachstums und des Ammoniumverbrauchs fällt dabei jeweils mit dem Zeitpunkt zusammen, an dem kein Acetat mehr im Medium nachgewiesen werden kann. Mit zunehmender Nitritkonzentration im Medium ist ein verzögertes Einsetzen des Wachstums und des Acetat- und Ammoniumverbrauchs zu erkennen. Während im nitritfreien Ansatz (A) bereits innerhalb der ersten beiden Stunden die genannten Veränderungen der Metabolitkonzentrationen deutlich sichtbar sind, treten diese im Ansatz mit 10 mM Nitrit (C) erst nach vier Stunden auf. Bei Nitritkonzentrationen von 20 mM und darüber konnte weder zelluläres Wachstum noch Acetat- bzw. Ammoniumverbrauch nachgewiesen werden (Werte nicht dargestellt). Die Abnahme der Nitritkonzentration (B und C) setzt jeweils zu einem Zeitpunkt ein, an dem die Konzentration des zellulären Proteins bereits deutlich (bis auf etwa 60 mg/L) angestiegen und der Ammoniumverbrauch noch in vollem Gange ist.

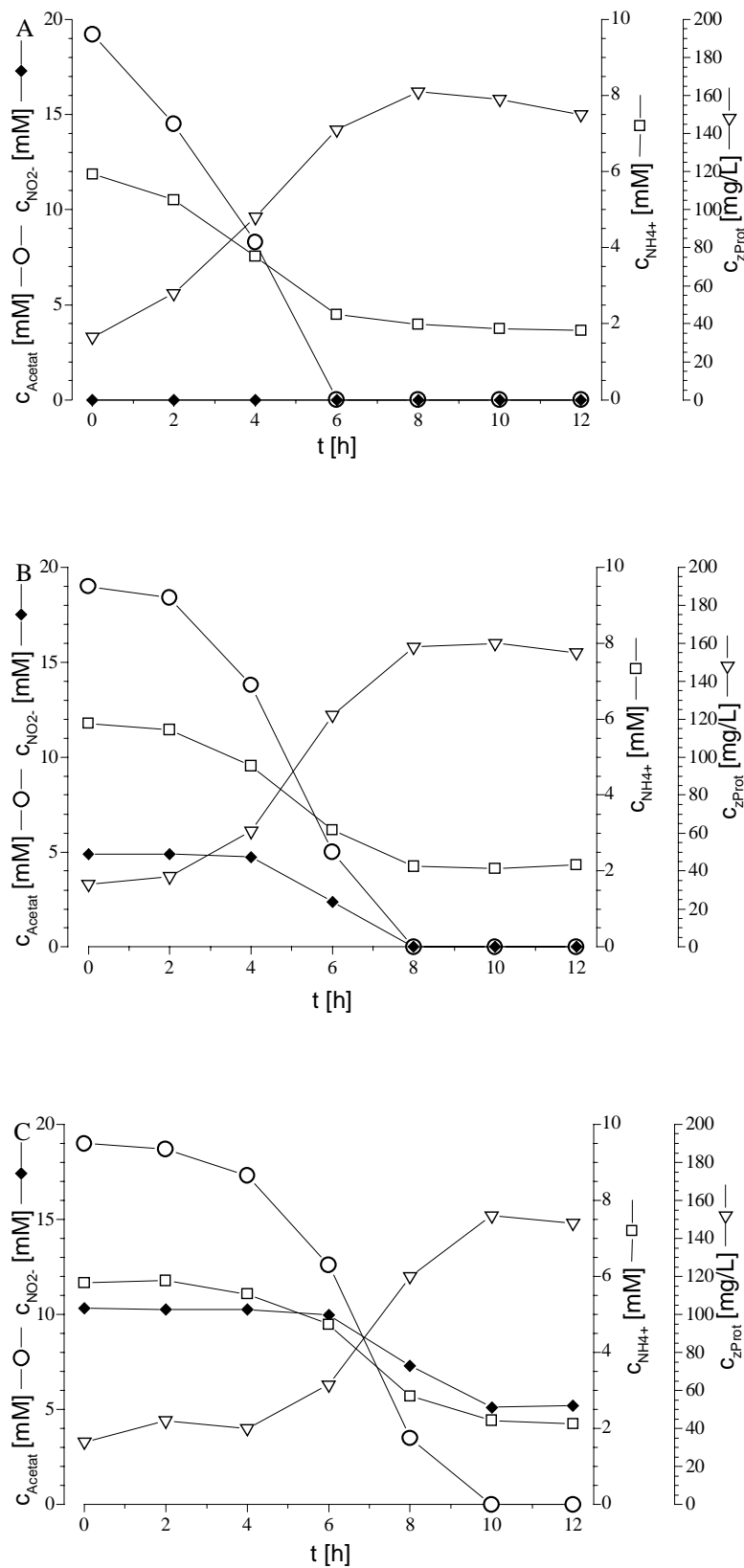


Abb. 3.10: Aerobes Wachstum von TL1 in Batchkultur auf Medium 1 mit Nitritkonzentrationen von 0 mM (A), 5 mM (B) und 10 mM (C). Die Nitrat-Konzentration lag in allen Fällen unter 0,10 mM.

3.5.1.7 Periplasmatische Nitrat-Reduktase

In verschiedenen aerob denitrifizierenden Bakterien wurde (zusätzlich zu einer membran-gebundenen) eine im periplasmatischen Raum lokalisierte Nitrat-Reduktase nachgewiesen (BELL et al., 1990, BERKS et al., 1994, CARTER et al., 1995a, CARTER et al., 1995b) und mit der Fähigkeit zur aeroben Denitrifikation in Verbindung gebracht (BELL et al., 1990, BERKS et al., 1995, CARTER et al., 1995b). Die Ermittlung der in Zellen des Stammes TL1 vorhandenen Nitrat-Reduktase-Aktivitäten erfolgte im Küvettentest wie unter 2.8.6 beschrieben mit einfach reduziertem Methylviologen (MV^+) und einfach reduziertem Benzylviologen (BV^+) als Elektronendonator. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.17 dargestellt.

Tab. 3.17: Spezifische Nitrat-Reduktase-Aktivitäten v [$\text{nmol NO}_3^- \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$] in Ansätzen mit unter aeroben und anaeroben Bedingungen angezogenen ganzen Zellen von TL1. v_{MV^+} =Aktivität mit MV^+ , v_{BV^+} =Aktivität mit BV^+ .

	aerob	anaerob
v_{MV^+}	405	186
v_{BV^+}	700	171
v_{BV^+}/v_{MV^+}	1,7	0,9

Für die Entscheidung, welche Typen von Nitrat-Reduktasen in einem Organismus vorliegen, sind nicht die absoluten spezifischen Nitrat-Reduktase-Aktivitäten relevant, sondern vielmehr die Verhältnisse v_{BV^+}/v_{MV^+} (CARTER et al., 1995a). Sie sind in Zeile 3 angegeben. Das nahe 1 liegende Verhältnis v_{BV^+}/v_{MV^+} , das nach aerober Anzucht ermittelt wurde, spricht für das Vorhandensein einer periplasmatischen Nitrat-Reduktase. Die Tatsache, daß sich das Verhältnis nach anaerober Anzucht nicht erhöht hat, ist ein Beleg für die Abwesenheit einer membrangebundenen Nitrat-Reduktase.

3.5.2 Beschreibung von *Thauera mechernichensis* sp. nov.

3.5.2.1 16S rDNA-Sequenz (durch F. A. Rainey)

Weil die phänotypischen Merkmale keine eindeutige Artzuordnung für TL1 zuließen, wurde die Untersuchung genotypischer Merkmale notwendig. Der Vergleich von Teilsequenzen hatte bereits Ähnlichkeiten zwischen TL1 und Vertretern der Gattung *Thauera* ergeben (LUKOW und DIEKMANN, 1997).

Von TL1 und *T. selenatis* ATCC 55363^T wurden 1491 Nukleotide lange Sequenzen der 16S rDNA ermittelt. Für den Sequenzvergleich wurde eine 1428 Nukleotide lange Teilsequenz, die in allen Stämmen zwischen den Positionen 38 und 1482 vorlag (*E. coli*-Positionen nach BROSIUS et al., 1981), herangezogen. TL1 besaß eine 16S rDNA-Sequenzidentität von 98,5-98,7 % mit den Vertretern der Gattung *Thauera* (Tabelle 3.18). Die Ähnlichkeiten mit Vertretern der Gattung *Azoarcus* lagen mit Werten von 94,7-95,0 % deutlich niedriger.

Tab. 3.18: 16S rDNA-Ähnlichkeitswerte für TL1 und Vertreter der Gattungen *Thauera*.

Stamm	1.	2.	3.	4.
1. TL1	-			
2. mXyN1	98,7	-		
3. <i>T. aromatica</i> K172 ^T	98,5	99,7	-	
4. <i>T. selenatis</i> ATCC 55363 ^T	98,5	98,1	97,7	-

3.5.2.2 DNA-Homologie

Für den Vergleich mittels DNA-DNA-Hybridisierung wurden die Stämme TL1, mXyN1 (RABUS und WIDDEL, 1995), *T. selenatis* ATCC 55363^T (MACY et al., 1993) und *T. aromatica* K172^T (ANDERS et al., 1995) herangezogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.19 aufgeführt.

Tab. 3.19: Werte der DNA-Homologie %D für TL1 und Vertreter der Gattungen *Thauera*.

Stamm	DNA-Homologie %D			
	1.	2.	3.	4.
1. TL1	-			
2. mXyN1	39 (2) ^a	-		
3. <i>T. aromatica</i> K172 ^T	27 (4)	90 (3)	-	
4. <i>T. selenatis</i> ATCC 55363 ^T	25 (2)	27 (2)	43 (2)	-

^a Die jeweilige Anzahl der Einzelbestimmungen ist in Klammern angegeben.

Mit durchschnittlich 90 % DNA-Homologie zwischen den Stämmen *T. aromatica* K172^T und mXyN1 wurde die Artidentität bestätigt; der Stamm mXyN1 gehört somit der Spezies *T. aromatica* an. Die DNA-Homologie zwischen TL1 und den drei anderen Stämmen der Gattung *Thauera* ist mit 25-39 % gering. TL1 wird daher als eigenständige Art der Gattung *Thauera* angesehen.

3.5.3 pO₂-Abhängigkeit der Denitrifikation

Aus den Untersuchungen von LUKOW (1996) war bekannt, daß die Reduktion des Nitrats durch TL1 bei einer Sauerstoffsättigung zwischen 30 und 10 % einsetzt. Die genaue pO₂-Abhängigkeit sollte in Chemostatexperimenten ermittelt werden. Die Kultivierungen wurden bei 37 °C in der Versuchsanlage 1 bei Luftbegasung (50 mL/min) in Medium 1 mit Nitrat (40 mM) durchgeführt. Zur pH-Statisierung (Sollwert: 8,00) wurden 1 N NaOH und 1N HCl an das Kultivierungsgefäß angeschlossen. Die Einstellung der Totzone betrug 0,5 %, d. h. die pH-Regelung setzte erst dann ein, wenn der pH-Wert um mehr als 0,05 pH-Einheiten vom Sollwert abwich. In allen Fällen konnte kein Acetat im Ablauf nachgewiesen werden, die Kulturen waren somit immer kohlenstofflimitiert.

Kontinuierliche Kultur bei 8 % Sauerstoffsättigung

Während der Kultivierung wurde die Sauerstoffsättigung über die Drehzahl auf 8 % geregelt. Gemessen wurden im Zulauf die Konzentrationen an Nitrat, Nitrit, Ammonium und Acetat, im Ablauf zusätzlich zu den genannten Parametern die Kulturtrübung OD₅₇₈ und die Konzentrationen des zellulären Proteins c_{zProt} und der Biotrockenmasse c_{BTM} . Für die Ermittlung der steady-state-Konzentrationen wurden mindestens vier Proben analysiert, jede Messung erfolgte als Doppelbestimmung. Die in Tabelle 3.20 enthalten Werte sind Mittelwerte bzw. wurden aus solchen berechnet. Für die Berechnung der Konzentration des in der Biomasse festgelegten Stickstoffs c_{N-BTM} wurde ein Massenanteil des Stickstoffs von 14 % an der Biotrockenmasse zugrundegelegt (STANIER et al., 1986; SCHLEGEL, 1992).

Tab. 3.20: Bei der kontinuierlichen Kultivierung von Stamm TL1 in Medium 1 mit Nitrat bei 8 % Sauerstoffsättigung ermittelte Stoffwechselgrößen. Δc =Konzentrationsdifferenz zwischen Aus- und Einlauf, +=Zunahme, -=Abnahme, c_{N-BTM} = Konzentration des in der BTM festgelegten Stickstoffs.

D [h ⁻¹]	$\Delta c_{NO_3^-}$ [mM]	$\Delta c_{NO_2^-}$ [mM]	$\Delta c_{NH_4^+}$ [mM]	Δc_{Acetat} [mM]	OD ₅₇₈ [-]	c_{zProt} [mg/L]	c_{BTM} [mg/L]	c_{N-BTM} [mM]
0,020	-0,2	0	-2,99	-21,7	0,61	106	236	2,36
0,032	0	0	-3,14	-21,9	0,65	128	257	2,57
0,043	0	0	-3,40	-21,8	0,68	131	284	2,84
0,061	0	0	-3,57	-21,6	0,71	142	288	2,88
0,091	+0,1	0	-3,69	-21,6	0,74	160	314	3,14
0,119	-0,2	0	-3,71	-22,2	0,77	167	322	3,22

Aus Tabelle 3.20 geht hervor, daß keine Reduktion von Nitrat stattfindet. Nitrit wird nicht gebildet. Mit zunehmender Verdünnungsrate D steigen die im steady-state vorhandenen Konzentrationen des zellulären Proteins und der Biotrockenmasse sowie die Kulturtrübung OD_{578} an. Die Konzentration des in der Biotrockenmasse festgelegten Stickstoffs liegt in allen Fällen deutlich (um 14 bis 21 %) unter der aus dem Medium entfernten Ammoniummenge. LUKOW (1996) hat aus ähnlichen Befunden geschlossen, daß der nicht in der BTM festgelegte Teil des aus dem Medium entfernten Ammoniums heterotroph nitrifiziert und aerob denitrifiziert wurde. Die aus den in Tabelle 3.20 enthaltenen Meßdaten berechneten Nitrifikationsraten liegen zwischen $0,013$ und $0,058 \text{ mmol NH}_4^+ \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (vNR) bzw. zwischen $0,1 \cdot 10^{-3}$ und $0,4 \cdot 10^{-3} \text{ mmol NH}_4^+ \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (sNR). Die Denitrifikationsraten bewegen sich zwischen $0,017$ und $0,082 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (vDR) bzw. zwischen $0,1 \cdot 10^{-3}$ und $0,5 \cdot 10^{-3} \text{ mmol} \cdot (\text{mg zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (sDR).

Sauerstoffsättigung, bei der die Nitratreduktion einsetzt

Zur Ermittlung des Schwellenwertes der Sauerstoffsättigung, bei der die Nitratreduktion durch TL1 einsetzt, wurde der pO_2 -Sollwert stufenweise herabgesetzt. Die kontinuierliche Kultivierung wurde bei einer konstanten Verdünnungsrate D von $0,043 \text{ h}^{-1}$ unter ansonsten identischen Bedingungen durchgeführt. Ausgehend von 8 % wurde der pO_2 -Sollwert in 1 %-Schritten bis auf 0 % (bei Luftbegasung) herabgesetzt. Die jeweilige SollwertEinstellung wurde für mindestens 22 h beibehalten.

Nach einem etwa 120stündigen Betrieb bei einem Sollwert von 1 % zum Erreichen des steady-state wurde der pO_2 -Sollwert auf 0 % (bei Stickstoffbegasung) herabgesetzt. Abbildung 3.11 umfaßt neben den Konzentrationen an Nitrat, Nitrit und Ammonium (A), die des zellulären Proteins und die Kulturtrübung OD_{578} (B) sowie einzelne, durch das MFCS/win-System aufgezeichnete Online-Daten (C).

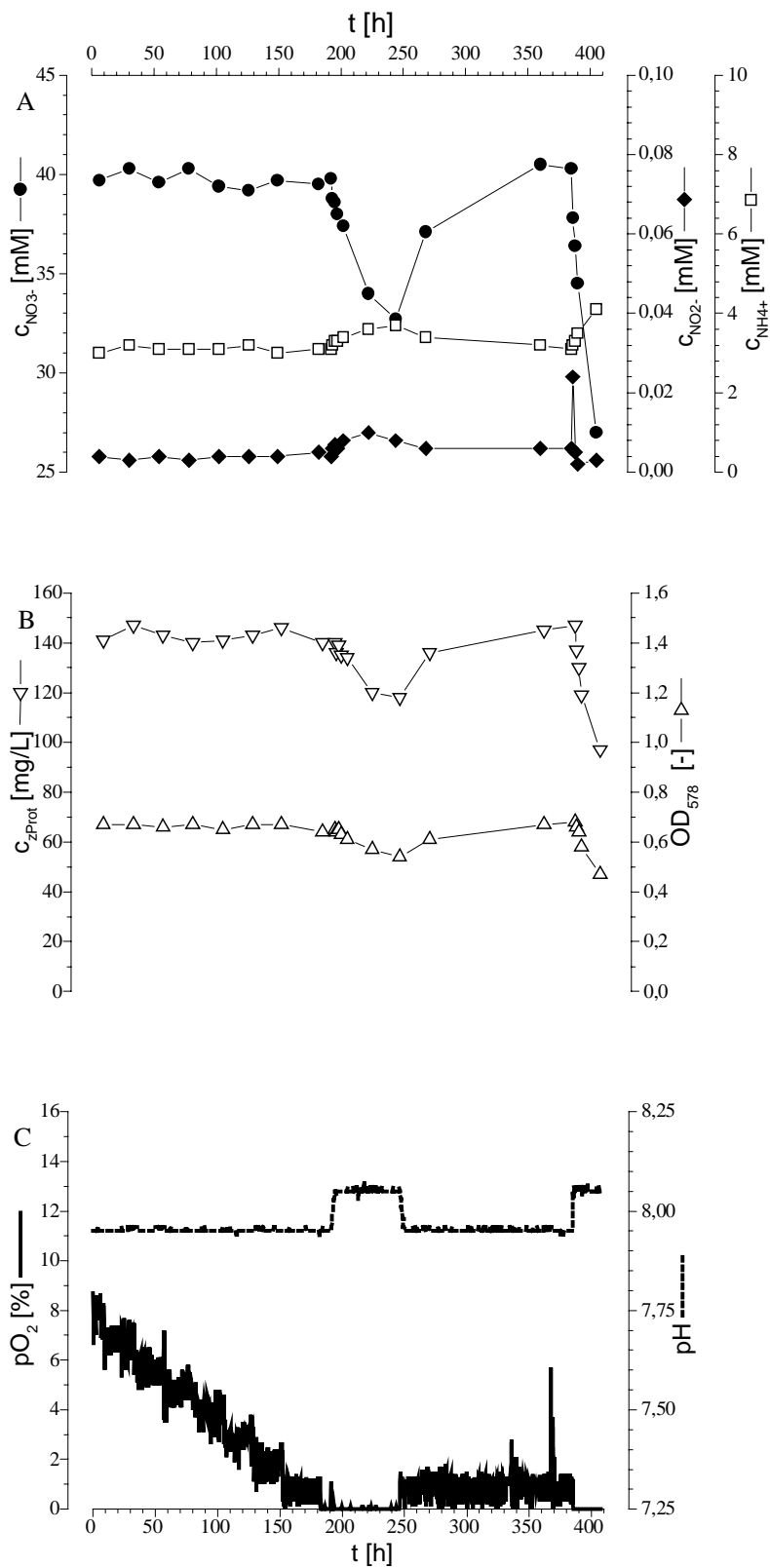


Abb. 3.11: Schrittweise Herabsetzung des pO₂-Wertes während der kontinuierlichen Kultivierung von TL1. A, B: Metabolite (offline), C: physikalische Parameter (online).

Während des Betriebs bei pO_2 -Sollwerten zwischen 8 und 1 % ist keine Veränderung der Meßdaten zu erkennen. In diesem Bereich der Sauerstoffsättigung setzt somit die Reduktion des Nitrats noch nicht ein. Eine Abnahme der Zelldichte mit sinkendem pO_2 , etwa durch Erreichen bzw. Überschreiten der kritischen Sauerstoffkonzentration (EINSELE et al., 1985) ist ebenfalls nicht erkennbar.

Erst nach Herabsetzung des pO_2 auf 0 % (bei Luftbegasung) treten deutliche Veränderungen auf. Mit einer Verzögerung von etwa neun Stunden kommt es zu einem Anstieg des pH-Wertes von 7,95 auf 8,05, dem durch die Reglereinstellung bedingten Maximalwert. Ab diesem Zeitpunkt setzt auch die Reduktion des Nitrats ein. Während der weiteren, etwa 50stündigen Kultivierung bei 0 % Sauerstoffsättigung, sinkt die Nitratkonzentration von 40 auf 32 mM ab, die Konzentration des zellulären Proteins und die OD_{578} gehen im diesem Zeitintervall von 140 auf 118 mg/L bzw. von 0,65 auf 0,54 zurück.

Nach der erneuten Einstellung von 1 % Sauerstoffsättigung kehrt das System in den alten Zustand zurück. Der Abfall des pH-Wertes auf 7,95 erfolgt ohne nennenswerte zeitliche Verzögerung. Die ursprüngliche Nitratkonzentration wird nach etwa 100 Stunden wieder erreicht.

Unmittelbar nach Herabsetzung des pO_2 von 1 auf 0 % (bei Stickstoffbegasung) steigt der pH-Wert auf 8,05, auch die Abnahme von Nitratkonzentration und Kulturtrübung setzt ohne sichtbare zeitliche Verzögerung ein.

In den Abbildungen 3.12 und 3.13 sind Zeitintervalle von 20 Stunden unmittelbar nach Herabsetzung des pO_2 von 1 auf 0 % (bei Luftbegasung) bzw. auf 0 % (bei Stickstoffbegasung) vergrößert dargestellt.

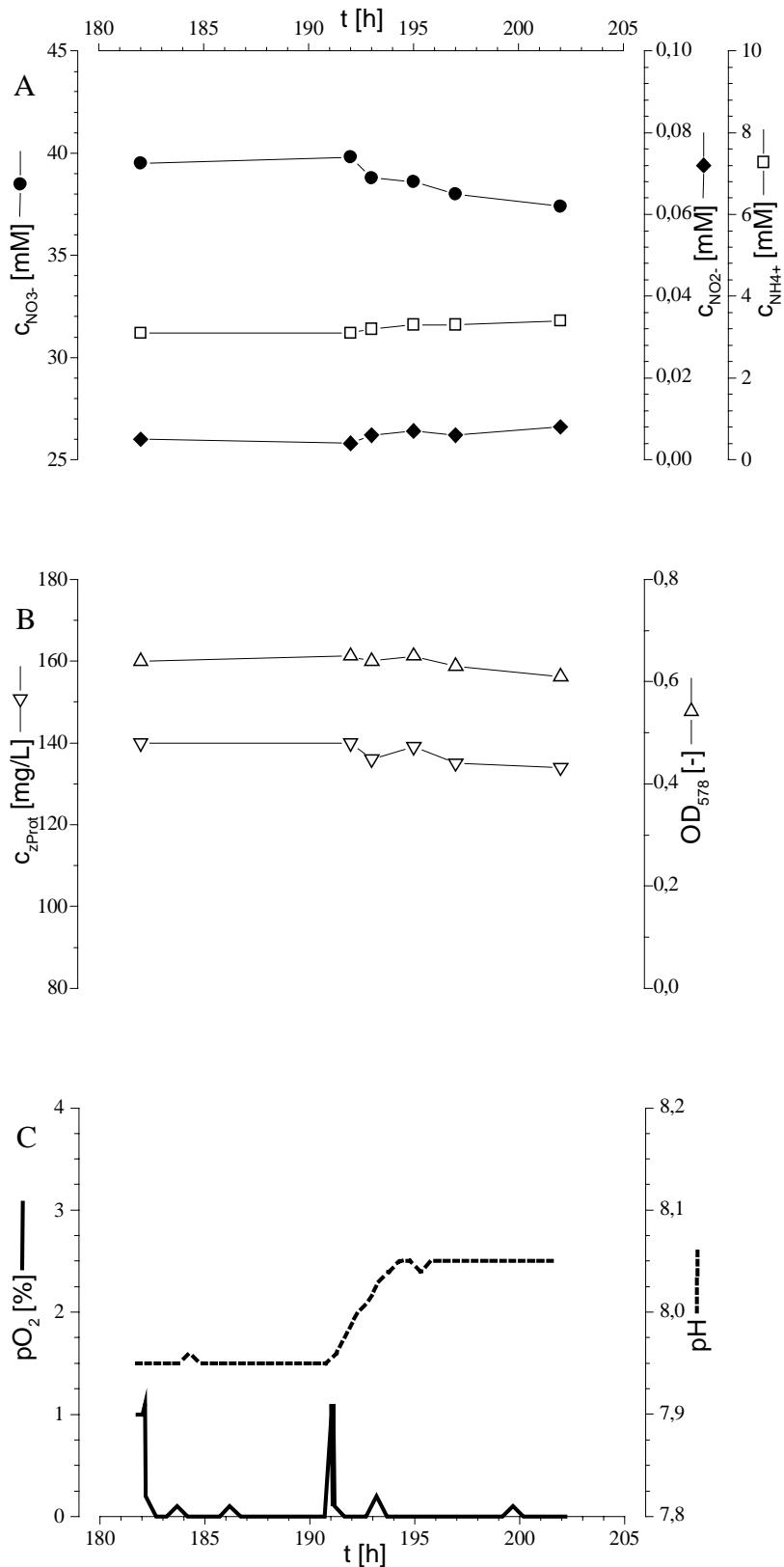


Abb. 3.12: Daten für den Zeitausschnitt von 182 – 202 h (Abb. 3.11). Unmittelbar nach der Probenahme bei 182 h wurde der $p\text{O}_2$ von 1 auf 0 % (bei Luftbegasung) herabgesetzt. A, B: Metabolite (offline), C: physikalische Parameter (online).

Abbildung 3.12 zeigt, daß der pH-Wert erst neun Stunden nach Herabsetzung des pO_2 von 1 auf 0 % (bei Luftbegasung) ansteigt. Bis zum Erreichen des durch die Reglereinstellung bedingten Maximalwertes von 8,05 vergehen etwa drei Stunden. Der Beginn des pH-Anstiegs fällt mit einer kurzzeitigen Erhöhung des pO_2 -Wertes, vermutlich bedingt durch einen Abfall der Sauerstoffzehrung, zusammen. Auch die Reduktion des Nitrats setzt erst nach einer entsprechenden Verzögerung ein. Innerhalb von 10 Stunden sinken die Konzentrationen an Nitrat (von 40 auf 38 mM) und zellulärem Protein (von 140 auf 134 mg/L) sowie die OD_{578} (von 0,65 auf 0,61) allenfalls geringfügig ab. Die Konzentrationen an Ammonium und Nitrit bleiben in diesem Zeitraum unverändert.

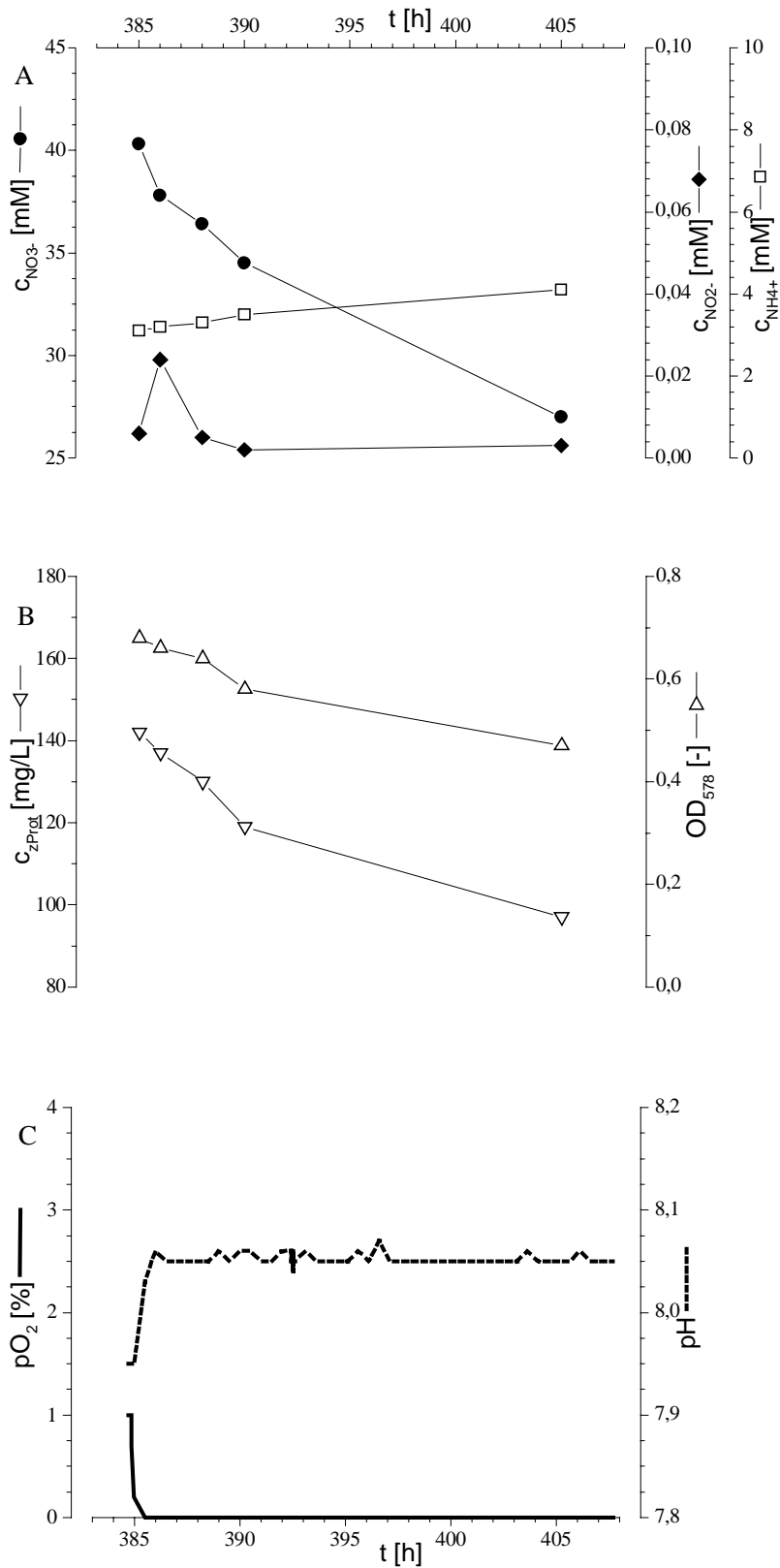


Abb. 3.13: Daten für den Zeitausschnitt von 385 – 405 h (Abb. 3.11). Unmittelbar nach der Probenahme bei 385 h wurde der pO₂ von 1 auf 0 % (bei Stickstoffbegasung) herabgesetzt. A, B: Metabolite (offline), C: physikalische Parameter (online).

Nach Herabsetzung des pO_2 von 1 auf 0 % (bei Stickstoffbegasung) steigt der pH-Wert ohne erkennbare zeitliche Verzögerung an (Abbildung 3.13). Der pH-Anstieg erfolgt deutlich schneller als nach dem Shift von 1 auf 0 % bei fortgeführter Luftbegasung. In weniger als 1 h wird der Wert von 8,05 erreicht. Auch die Abnahme der Konzentrationen an Nitrat und zellulärem Protein sowie der Kulturtrübung setzen ohne sichtbare zeitliche Verzögerung ein. Der Rückgang der Werte erfolgt ebenfalls deutlich schneller als nach dem Shift von 1 auf 0 % bei fortgeführter Luftbegasung. Innerhalb von 20 Stunden sinken die Konzentrationen an Nitrat (von 40 auf 27 mM) und zellulärem Protein (von 147 auf 97 mg/L) sowie die OD_{578} (von 0,68 auf 0,47) signifikant ab. Die Nitritkonzentration steigt nach der Herabsetzung des pO_2 vorübergehend auf etwa 0,25 mM an. Bei der Ammoniumkonzentration ist ein schwacher linearer Anstieg von 3,1 auf 4,1 mM zu verzeichnen.

Da die N-Verluste in der STK-Anlage überwiegend auf die Umsetzungen autotropher Bakterien zurückzuführen sein müssen (vgl. Einleitung), wurde die heterotrophe Nitrifikation/aerobe Denitrifikation durch TL1 nicht weiter untersucht.

4 Diskussion

Die von SEYFRIED konzipierte Kläranlage in Mechernich hat die Erwartungen erfüllt und insofern übertroffen, als die Ammoniumentfernung keine Methanolzugabe erfordert. Zunächst konnten die Stickstoffverluste, die in der STK-Anlage auftreten, mit den bekannten Mechanismen der biologischen Stickstoffeliminierung durch autotrophe Nitrifikation/heterotrophe Denitrifikation nicht erklärt werden (BAUMGARTEN und SEYFRIED, 1996). Zu diesem Zeitpunkt lagen keine Informationen über die Zusammensetzung der vorhandenen Bakterienpopulation sowie über die Bedeutung einzelner mikrobieller Umsetzungen für die Stickstoffverluste vor. Über den Beitrag der heterotrophen Nitrifikation/aeroben Denitrifikation (z. B. durch *Thiosphaera pantotropha*) bzw. der autotrophen Nitrifikation/autotrophen Denitrifikation (z. B. durch *Nitrosomonas* spp.) konnte nur spekuliert werden (BAUMGARTEN und SEYFRIED, 1996). Um die Ursache für die beobachteten Stickstoffverluste herauszufinden wurde eine Analyse der Bakterienpopulation in der Mechernicher Anlage (insbesondere des STK) vorgenommen.

Im Rahmen des gemeinsamen Projekts mit dem Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover wurde der Biofilm der STK-Anlage durch HELMER und KUNST untersucht. Dabei wurden die N-Verluste in Batch-Experimenten bestätigt und Ammoniak-oxidierende Bakterien nachgewiesen (HELMER und KUNST, 1998; HELMER et al., 1999).

Bei den ersten Versuchen zur Charakterisierung der Mikroorganismenflora war in unserem Laboratorium mit einem Anreicherungsmedium, das dem von *P. pantotrophus* entspricht, ein neuer heterotropher Nitrifizierer/aerober heterotropher Denitrifizierer isoliert worden (LUKOW, 1996).

Mit Beginn der Arbeit an der vorliegenden Dissertation wurde aber deutlich, daß die beobachteten Stickstoffverluste schon alleine wegen des niedrigen C/N-Eliminierungsverhältnisses (HIPPEL et al., 1998a und 1998b) überwiegend auf die Umsetzungen autotropher Bakterien zurückzuführen sein müssen. Neben der autotrophen Nitrifikation/autotrophen Denitrifikation mußte auch die inzwischen nachgewiesene Anammox-Reaktion (MULDER et al., 1995; VAN DE GRAAF et al., 1995) als mikrobielle Umsetzung, die möglicherweise zu den Stickstoffverlusten in der STK-Anlage beiträgt, in Betracht gezogen werden. Zur Physiologie

der Anammox-Bakterien lagen zu jener Zeit nur wenige Informationen vor (VAN DE GRAAF et al., 1996 und 1997), zur Taxonomie war nichts bekannt.

Bei der Charakterisierung der Mikroorganismenflora in der Mechernicher Anlage wurden zwei Wege verfolgt. Zum einen wurden aus Proben der Anlage zur biologischen Vorbehandlung autotrophe Nitrifizierer angereichert und in Chemostatexperimenten untersucht. Dabei wurde mit nitratierenden Kulturen untersucht, wie durch Veränderung der Betriebsparameter die Nitrifikation auf der Stufe des Nitrits angehalten werden kann. In Experimenten mit nitritierenden Kulturen wurde insbesondere untersucht, inwieweit die Denitrifikation des gebildeten Nitrits durch NO_2 stimuliert wird.

Zum anderen wurden nach Etablierung der Methode der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung in einer parallel laufenden Diplomarbeit im Verlauf der vorliegenden Dissertation a) die Zusammensetzung der Anreicherungskulturen, b) die Populationsdynamik während des Reaktorbetriebs und c) die Bakterienflora des Scheibentauchkörpers der Mechernicher Anlage analysiert.

Wegen des äußerst langsamen Wachstums der Anammox-Bakterien ($t_d \approx 11$ d [JETTEN et al., 1999]) wurden entsprechende Anreicherungen in unserem Laboratorium nicht durchgeführt. Wir haben jedoch nach Charakterisierung (VAN DE GRAAF et al., 1996 und 1997; STROUS et al., 1997; SCHALK et al., 1998) und Klassifizierung der Anammox-Bakterien (STROUS et al., 1999a und 2000; SCHMID et al., 2000) die Bakterienflora des Scheibentauchkörpers mit geeigneten Oligonukleotidsonden per FISH analysiert.

Anreicherung autotropher Nitrifizierer

Die nach der Anreicherung autotropher Nitrifizierer unternommenen Versuche, über Verdünnungsausstriche auf festem Medium zu Reinkulturen zu gelangen, waren erfolglos. Dieser Befund ist angesichts der vergeblichen Bemühungen anderer Arbeitsgruppen, auf dieselbe Weise autotrophe Nitrifizierer zu isolieren (MCCAIG et al., 1994; LOGEMANN et al., 1998; BURRELL et al., 1998) und der Anstrengungen, die zur Lösung dieses Problems unternommen werden (HESSELSØE und SØRENSEN, 1999), nicht überraschend. Es ist anzunehmen, daß es sich bei den aus den Anreicherungskulturen gewonnenen Isolaten um heterotrophe Bakterien handelt, obwohl rein mineralische Medien verwendet wurden (BURRELL et al., 1998; HESSELSØE und SØRENSEN, 1999).

Die für die Anreicherungskulturen 1, 2, 3, 4 und 6 ermittelten volumetrischen Nitrifikationsraten (Tabelle 3.2) liegen allesamt in derselben Größenordnung. Es fällt jedoch auf, daß die höchsten Raten für die Kulturen 2 und 4 ermittelt wurden, deren Anteil Ammoniakoxidierender β -Proteobacteria vergleichsweise niedrig ist. Gegebenenfalls sind die hohen volumetrischen Nitrifikationsraten der Kulturen 2 und 4 darauf zurückzuführen, daß das jeweilige Inokulum aus aeroben Bereichen der Anlage zur biologischen Vorbehandlung (Abbildung 1.3) entnommen wurde. In keinem der Ansätze – auch nicht in der mit Probenmaterial aus der Denitrifikationsstufe beimpften Anreicherungskultur 1 – trat Gasbildung auf. Es ist kaum anzunehmen, daß die Anreicherungskulturen zu diesem Zeitpunkt bereits keine (autotrophen oder heterotrophen) Denitrifizierer mehr enthielten. Vielmehr dürften die vorliegenden Bedingungen nicht für die Denitrifikation des Nitrits geeignet gewesen sein. Da auch nach Verzehnfachung des Gehalts an Kupferionen keine Gasbildung auftrat, kommt eine entsprechende Limitierung nicht als Ursache in Betracht. Möglicherweise lag die Konzentration des gelösten Sauerstoffs zu hoch bzw. die Konzentration geeigneter Elektronenquellen zu niedrig. Weiterhin stellt sich die Frage, warum in keiner der Anreicherungskulturen Nitrat nachgewiesen werden konnte. Daß in Bereichen der Anlage zur biologischen Vorbehandlung Nitrat gebildet wird, ergibt sich unzweifelhaft aus den aufgenommenen Meßdaten (HIPPEN et al., 1998).

Nitritakkumulation in nitratierenden Kulturen

Sowohl die Ammoniumeliminierung durch autotrophe Nitrifikation/autotrophe Denitrifikation als auch durch autotrophe Nitrifikation/Anammox erfordert, daß Ammonium nur bis zum Nitrit oxidiert wird (siehe Einleitung). Mit nitratierenden Kulturen sollte daher untersucht werden, wie durch Veränderung der Betriebsparameter die Nitrifikation auf der Stufe des Nitrits angehalten werden kann. Diese Fragestellung wurde mit Anreicherungskultur 3 bearbeitet, durch die nach etwa viermonatiger kontinuierlicher Kultivierung Ammonium nahezu ausschließlich (Phase I in Abbildung 3.2 A) bzw. überwiegend (Phase II und III) zu Nitrat oxidiert wurde.

Im steady-state der Phase III wurde das im Zulauf befindliche Ammonium zu 92 % umgesetzt - zu Nitrit (9 %) und Nitrat (83 %). Die Anhebung der Temperatur hatte alleine keinen Einfluß auf die Umsetzungen. Erst nach Erhöhung der Verdünnungsrate D von 0,005 auf 0,008 h^{-1} wurde überwiegend Nitrit gebildet. Im steady-state der Phase IV wurde das im Zulauf befindliche Ammonium zu 72 % umgesetzt - zu Nitrit (58 %) und Nitrat (13 %). Dies ist von

Interesse, weil der Ablauf hauptsächlich Ammonium und Nitrit (und nur wenig Nitrat) enthält und sich insofern als Zulauf für einen nachgeschalteten Anammox-Reaktor eignet. Nach 250 Tagen lag das molare $\text{NH}_4^+/\text{NO}_2^-$ -Verhältnis kurzzeitig bei 11,5 zu 15,0 ($\approx 1/1,3$), wie es für einen Anammox-Reaktor anzustreben ist.

In kontinuierlich betriebenen Reaktoren, in denen die Biomasse suspendiert vorliegt, kann die Nitrifikation auf der Stufe des Nitrits angehalten werden, wenn die Temperatur oberhalb von 25 °C liegt (JETTEN et al., 1999). Aufgrund der unterschiedlichen Temperaturabhängigkeiten der spezifischen Wachstumsraten (HUNIK et al., 1994) ist es möglich, die Nitrit-Oxidierer auszuwaschen, während die Ammoniak-Oxidierer im System verbleiben (JETTEN et al., 1997a). Tabelle 4.1 enthält die von VAN LOOSDRECHT und JETTEN (1997) für den Betrieb eines Reaktors, mit dem die Hälfte des im Zulauf befindlichen Ammoniums zu Nitrit umgesetzt werden soll, angegebenen Parameter sowie die in dieser Untersuchung in Phase IV eingestellten.

Tabelle 4.1: Betriebsbedingungen, unter denen die Nitrifikation auf der Stufe des Nitrits stehen bleibt.

Parameter	VAN LOOSDRECHT und JETTEN ^a	diese Untersuchung
Temperatur [°C]	33	35
Verdünnungsrate [h^{-1}]	0,033	0,008
Sauerstoffsättigung [%]	20	0
$c_{\text{NH}_4^+, \text{E}}$ [mM] ^b	41	32

^a Angaben aus VAN LOOSDRECHT und JETTEN (1997)

^b Ammoniumkonzentration im Einlauf

Dabei ist zu beachten, daß eine Vergleichbarkeit nur gegeben ist, wenn Art und Anteil der beteiligten Bakterien übereinstimmen. Während bei unserer Untersuchung diese Angaben vorliegen (Aussagen über stamm-spezifische Eigenschaften können nicht gemacht werden), ist über die genaue Zusammensetzung der Population in den Versuchen von VAN LOOSDRECHT und JETTEN nichts bekannt.

Die Betriebsbedingungen, unter denen im Rahmen dieser Untersuchung Nitritakkumulation auftrat, unterscheiden sich insbesondere hinsichtlich der Verdünnungsrate und der Sauerstoffsättigung von den von VAN LOOSDRECHT und JETTEN angegeben (Tabelle 4.1). Bei einer Verdünnungsrate von $0,033 \text{ h}^{-1}$ und einer Sauerstoffsättigung von 20 % sollte eine starke Selektion auf schnell wachsende Organismen stattfinden, während die Sauerstoffaffinität eine

geringere Rolle spielt. Unter den in dieser Untersuchung (in Phase IV) eingestellten Bedingungen werden dagegen in erster Linie Organismen begünstigt, die ein geringes Sauerstoffangebot vertragen können, da die Kultur in dieser Phase sauerstofflimitiert ist. Der Sauerstoffmangel dürfte sich dabei insbesondere auf die Nitrit-Oxidierer negativ auswirken und damit zur Nitritakkumulation in Phase IV beitragen, denn aus Untersuchungen mit Misch- und Reinkulturen ist bekannt, daß Ammoniak-Oxidierer in der Regel eine höhere Sauerstoffaffinität als Nitrit-Oxidierer besitzen (KNOWLES et al., 1965; HELDER und DE VRIES, 1983; SIEGRIST und GUJER, 1987; LAANBROEK und GERARDS, 1993). Eventuell hat die größere Empfindlichkeit der Nitrit-Oxidierer gegenüber dem freien Ammoniak zusätzlich dazu beigetragen, daß die Nitritakkumulation über etwa 100 Tage aufrechterhalten wurde, denn unter den vorliegenden Bedingungen ($T=35\text{ °C}$, $c_{\text{NH}_4^+}=9,0\text{ mM}$, $\text{pH}=7,4$) kann bei Vernachlässigung des Effekts der Salzkonzentration auf das $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Gleichgewicht (ALBERS, 1991) eine Konzentration des freien Ammoniaks von etwa $0,3\text{ mM}$ angenommen werden (Anhang A1). Die in der Literatur angegebenen Konzentrationen, oberhalb der die Hemmung der Nitritoxidation auftreten kann, liegen mit $0,001\text{ mM}$ (PRAKASAM und LOEHR, 1972), $0,006\text{ mM}$ (ANTHONISEN et al., 1976), $0,06\text{ mM}$ (NYHUIS, 1985) bzw. $0,03\text{ mM}$ (ALBERS, 1991) deutlich darunter. Ein weitgehendes Auswaschen der Nitrit-Oxidierer und die dadurch bedingte Abnahme ihres Anteils an der Gesamtpopulation ist den FISH-Daten allerdings nicht zu entnehmen (diese lassen eher das Gegenteil vermuten). Dieser Widerspruch dürfte zumindest teilweise auf den wahrscheinlich fehlerbehafteten (da zu hohen) Anteil Nsr1156-positiver Zellen in Phase IV (s. u.) zurückzuführen sein. Die Tatsache, daß die Nitritbildung nicht gänzlich zum Erliegen kommt, ist eventuell dadurch bedingt, daß sich Nitrit-Oxidierer trotz zu geringer Wachstumsrate ($\mu < 0,008\text{ h}^{-1}$) dem Auswaschen durch Wandwachstum entziehen konnten (schon in Phase I lag im Bereich des Flüssigkeitsspiegels ein Biofilm vor). Auch JETTEN et al. (1997a und 1999) weisen im Zusammenhang mit einer unerwünschten Nitratbildung auf dieses Problem hin. Es sollte sich durch regelmäßige mechanische Reinigung der Oberflächen weitgehend lösen lassen bzw. im technischen Maßstab wegen des kleineren Oberfläche/Volumen-Verhältnisses eine deutlich geringere Bedeutung haben (JETTEN et al., 1997b).

Populationsdynamik in nitratierenden Kulturen

Das zweite wichtige Ziel des mit der Anreicherungskultur 3 durchgeführten Chemostatexperiments war, die Zusammensetzung der Kultur mittels FISH quantitativ zu erfassen. Besonderes Interesse bestand darin zu untersuchen, inwieweit Änderungen der Stoffbilanz sich mit solchen der Bakterienpopulation korrelieren lassen. Dabei waren die Sonden Nso190 und Nsr1156 als diejenigen mit den größten Zielbereichen von besonderer Bedeutung. Die Sonde Nso190 wurde ausgewählt, da mit ihr die beiden Gattungen *Nitrosomonas* und *Nitrospira* sowie *Nitrosococcus mobilis* erfaßt werden, deren Vertreter in verschiedenen Anlagen als zahlenmäßig dominierende Ammoniak-Oxidierer nachgewiesen wurden (SCHRAMM et al., 1996 und 1998; MOBARRY et al., 1996; JURETSCHKO et al., 1998). Die Sonde Nsr1156 deckt mit den Süßwasser-*Nitrospira* spp. die mengenmäßig wichtigsten Nitrit-Oxidierer in Kläranlagen ab (WAGNER et al., 1996; JURETSCHKO et al., 1998; KLOEP et al., 2000).

In Abbildung 4.1 sind die mit den Sonden Nso190 und Nsr1156 ermittelten Anteile (das DAPI-Signal entspricht 100 %) in einem Balkendiagramm dargestellt. Die Summe der Anteile sollte in allen Fällen unter bzw. nicht signifikant über 100 % liegen. Es zeigt sich, daß der Prozentsatz der mit den beiden Sonden Nso190 und Nsr1156 erfaßten Bakterien mit der

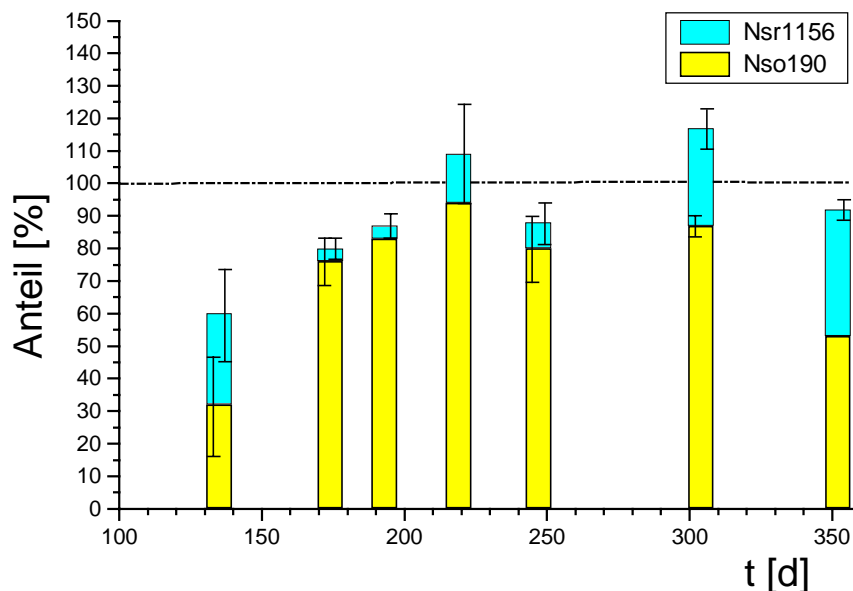


Abb. 4.1: Mit den Sonden Nso190 und Nsr1156 ermittelte Anteile Ammoniak-oxidierender β -Proteobacteria bzw. Süßwasser-*Nitrospira* spp. an der Gesamtpopulation der Anreicherungskultur 3. Das DAPI-Signal entspricht 100 %. Bei Vorliegen von mindestens vier Einzelwerten wurde das für eine Aussagesicherheit von 95 % gültige Konfidenzintervall ermittelt.

Betriebsdauer grundsätzlich zunimmt. Diese Tendenz ist insofern zu erwarten, als heterotrophe Bakterien, die sich von den (vermutlich in geringer Menge vorhandenen) durch Zellyse freigesetzten Bestandteilen ernähren, während der kontinuierlichen Betriebsweise vermehrt ausgewaschen werden sollten. Sieht man von den für den für den 135. Betriebstag ermittelten Werten ab, so liegt die Summe der Anteile in allen Fällen über bzw. bei 80 %. Angesichts der gut 30wöchigen Kultivierung auf mineralischem Medium mit Ammonium, die dem in Abbildung 3.2 dargestellten Betriebszeitraum vorausging, erscheint ein derart hoher Anteil durchaus plausibel.

Angesichts der weitgehend synchronen Entwicklung der mit den Sonden Nso190 und S*-Nse ermittelten Anteile (Abbildung 3.2) sind diese schlüssig. In allen Fällen ist die Mehrheit der mit der Sonde Nso190 erfaßten Ammoniak-oxidierenden β -Proteoabacteria der *Nitrosomonas europaea*-Linie (erfaßt mit S*-Nse) zuzuordnen.

Wie Abbildung 4.1 zeigt, ergibt sich lediglich für den 304. Betriebstag eine Überschreitung der 100 %-Schwelle, die nicht mit der Streuung der Einzelwerte erklärt werden kann. Es ist anzunehmen, daß der Anteil Nsr1156-positiver Zellen falsch (zu hoch) ist (s. o.). Davon abgesehen erscheinen die mit der Sonde Nsr1156 ermittelten Anteile plausibel, da sie sich prinzipiell gegensätzlich zu denen Nso190-positiver Zellen entwickeln (die höchsten Nso190-Anteile mit den niedrigsten Nsr1156-Anteilen zusammenfallen). Diese Daten und der Befund, daß bei den Kontrollexperimenten keine *Nitrobacter* spp. nachgewiesen werden konnten, decken sich somit mit mehreren Untersuchungen, bei denen in Proben aus Kläranlagen überwiegend (BURRELL et al., 1998) bzw. ausschließlich (WAGNER et al., 1996; JURETSCHKO et al., 1998; KLOEP et al., 2000) *Nitrospira* spp. und nicht *Nitrobacter* spp. nachgewiesen werden konnten. Es bleibt somit festzuhalten, daß die ermittelten FISH-Daten sich qualitativ gut mit den beobachteten Nitritions- und Nitrationsaktivitäten sowie mit den Ergebnissen anderer Autoren vereinbaren lassen.

Läge eine eindeutige Korrelation zwischen Stoffbilanz und Populationszusammensetzung vor, so würden sich die volumetrischen Nitrifikationsraten Ammoniak- bzw. Nitrit-oxidierender Bakterien (Tabelle 3.4) und die Zellzahlen der entsprechenden Organismengruppen (Tabelle 3.5) synchron entwickeln. Dies ist nicht der Fall. Die Veränderung der jeweiligen volumetrischen Rate ist somit nicht ausschließlich mit dem Anstieg/dem Abfall der Zellzahl der jeweiligen Organismengruppe zu erklären. Dies dürfte nur zum Teil auf fehlerbehaftete Meßdaten (wie vermutlich im Falle des für den 304. Betriebstag ermittelten Anteils Nsr1156-

positiver Zellen) zurückzuführen sein. Es ist zu berücksichtigen, daß die mit den Sonden ermittelten Daten nur einen begrenzten Einblick in die mikrobielle Zusammensetzung und die damit verbundene physiologische Vielfalt der Kultur liefern und Aussagen über stamm-spezifische Eigenschaften nicht gemacht werden können. Die Untersuchungen von WARD et al. (2000) legen nahe, daß die physiologischen Unterschiede zwischen Ammoniak-Oxidierern, die sich hinsichtlich ihrer 16S rDNA-Sequenzen stark ähneln, deutlich größer ist, als zuvor angenommen. Die Sonde S*-Nse erfaßt mit den Spezies *Nitrosomonas europaea*, *N. eutropha* und *N. halophila* (JURETSCHKO et al., 1998) Organismen, die sich bezüglich ihrer bevorzugten Umweltbedingungen deutlich unterscheiden (KOOPS et al., 1991; SPIECK und BOCK, 1998). Es ist somit wahrscheinlich, daß Betriebszustände, für die ähnliche Sondendaten ermittelt wurden, sich hinsichtlich der relevanten stoffwechselphysiologischen Eigenschaften der dominierenden Organismen (Affinitätskonstanten, Sensitivität gegenüber Inhibitoren, etc.) deutlich unterscheiden. Auch die REM-Daten (Tab. 3.6) lassen sich insofern als Hinweis in diese Richtung interpretieren, als die Kultur zu beiden untersuchten Zeitpunkten von Nso190- und S*-Nse-positiven Zellen dominiert wurde, während sich die Anteile der vorherrschenden Morphotypen deutlich unterschieden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß mit der durchgeführten FISH-Methode keinerlei Informationen hinsichtlich der Volumina- und Aktivitätsverteilung der mit den Sonden erfaßten Subpopulationen ermittelt werden konnten. Verfahren, die zur Ermittlung dieser Parameter herangezogen werden können, sind Kombinationen von FISH mit leistungsfähigen digitalen Bildanalyse-Systemen (BRÜHL et al., 2000) bzw. mit Mikroautoradiographie (NIELSEN et al., 1999; LEE et al., 1999; OUVENEY und FUHRMANN, 1999). Angesichts der genannten Aspekte, war nicht unbedingt zu erwarten, daß sich die beobachteten Veränderungen der volumetrischen Raten auf die Zellzahlen der entsprechenden Organismengruppen zurückführen lassen. Eine weitergehende quantitative Interpretation der Daten, die die mit den Sonden Nsv443, und Nsr447 ermittelten Anteile einschließt, erscheint somit nicht möglich. Dies gilt auch für die berechneten Werte der Zellzahlen Z und zellulären Nitrifikationsraten zNR (Tabelle 3.5), obwohl letztere gut mit den unter ähnlichen Bedingungen ermittelten Daten anderer Autoren (KEEN und PROSSER, 1987; LAANBROEK und GERARDS, 1993) übereinstimmen.

Ammoniumentfernung mit nitritierenden Kulturen

In der Regel wurde die Denitrifikationsaktivität autotropher Ammoniak-Oxidierer bei Sauerstoff-Limitierung nachgewiesen (GOREAU et al., 1980; POTH und FOCHT, 1985; POTH,

1986; REMDE und CONRAD, 1990; BOCK et al., 1995). Unter diesen Bedingungen sind die Nitrifikationsraten gering (ZART et al., 1996) und es wird bevorzugt N_2O gebildet (ANDERSON und LEVINE, 1986; COLLIVER und STEPHENSON, 2000). ZART und BOCK (1998) führten ihre Untersuchungen mit einer Reinkultur von *Nitrosomonas eutropha* N904 bei einer deutlich höheren Sauerstoffsättigung von etwa 40 % durch. Bei Begasung mit Luft, der 50 ppm NO_2 beigemischt war, erzielten sie hohe Nitrifikationsraten und stellten fest, daß mehr als 50 % des aus Ammonium gebildeten Nitrits aerob zu N_2 denitrifiziert wurde. Für die Untersuchungen der nitritierenden Anreicherungskultur 6 auf ihre Eignung zur Ammonium-Eliminierung wurden daher ähnliche experimentelle Bedingungen eingestellt.

Die in der vorliegenden Arbeit mit der Anreicherungskultur 6 erzielten Ergebnisse bezüglich der stimulierenden Wirkung von NO_2 weichen deutlich von den von ZART und BOCK (1998) mit *Nitrosomonas eutropha* N904 erzielten ab. NO_2 hatte weder bei Ammonium-Limitierung noch nach Erhöhung der Ammoniumkonzentration durch Pulse in den Reaktor einen Effekt auf die Umsetzungen. Im Ammonium-limitierten Zustand konnte mit wie ohne 50 ppm NO_2 in der Begasungsluft kein N-Verlust festgestellt werden. Nach den Ammoniumpulsen wurden mit wie ohne 50 ppm NO_2 in der Begasungsluft N-Verluste ermittelt, die jedoch auf wenige Stunden begrenzt und deutlich niedriger als die von ZART und BOCK (1998) für *N. eutropha* N904 beschriebenen waren.

Nach Vorliegen dieser Ergebnisse wurde uns auf Anfrage mitgeteilt, daß in der Originalarbeit von ZART und BOCK (1998) Verdünnungsrate und Begasungsrate falsch angegeben sind. Beim Auftreten der Stickstoffverluste von über 50 % wurde der Reaktor in Wirklichkeit mit einer Verdünnungsrate von $0,050\text{ h}^{-1}$ (statt $0,008\text{ h}^{-1}$) betrieben (D. ZART, persönliche Mitteilung) und mit 500-1000 mL/min (statt 50 mL/min) belüftet (SCHMIDT et al., 1999). In Tabelle 4.2 sind die Betriebsbedingungen, mit denen BOCK und ZART (1998) Stickstoffverluste von über 50 % erzielten, den für die Untersuchungen von Anreicherungskultur 6 mit 50 ppm NO_2 in der Begasungsluft eingestellten gegenübergestellt.

Hinsichtlich der Betriebsbedingungen ergeben sich die deutlichsten Unterschiede aus der um etwa Faktor 10 höheren Verdünnungsrate und der mindestens um Faktor 25 höheren Begasungsrate, mit denen der Reaktor von ZART und BOCK betrieben wurde. Neben den deutlichen Stickstoffverlusten, die mit *Nitrosomonas eutropha* N904 erzielt wurden, fallen insbesondere die stationären Zellzahlen auf, die um Faktor 70 höher als die mit der Anreicherungskultur 6 erzielten liegen.

Tabelle 4.2: Vergleich der eingestellten Betriebsbedingungen und der mit 50 ppm NO₂ in der Begasungsluft im steady state ermittelten Belastungen B und Nitrifikationsraten vNR und sNR.

Parameter	ZART und BOCK, 1998	diese Untersuchung
Kultur	<i>Nitrosomonas eutropha</i> N904	Anreicherungskultur 6 ^a
Zellrückhaltung	+	+
Medium	Mineralmedium (ZART und BOCK, 1998)	Mineralmedium (ZART und BOCK, 1998)
Reaktionsvolumen [L]	5,0	2,0
Temperatur [° C]	28	28
Verdünnungsrate [h ⁻¹]	0,050 ^b	0,006
pH-Wert	7,2	7,4
pH-Korrekturmittel	Na ₂ CO ₃ (20 %)	NaHCO ₃ (10 %)
Begasungsrate [mL/min]	500-1000 ^c	20
Sauerstoffsättigung	3-4 mg/L ^d	40 %
c _{NH₄⁺,E} [mM]	100-243	86 ^e
B _{NH₄⁺,E} [mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	4,5-10,1	0,5
B _{NH₄⁺} [mmol·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	0,2-1,3 ^f	0
vNR [mmol NH ₄ ⁺ ·L ⁻¹ ·h ⁻¹]	3,8-9,2	0,5
sNR [mmol·(mg zProt) ⁻¹ ·h ⁻¹]	0,020 ^b	0,016
c _{zProt} [mg/L]	190-460 ^g	33
Zellzahl [mL ⁻¹]	1,98·10 ¹⁰	2,9·10 ⁸
N-Verlust [%]	51	0

^a ca. 80 % Vertreter der *Nitrosomonas europaea*-Linie (FISH-Analysen mit den Sonden Nso190 und S*-Nse)

^b D. ZART, persönliche Mitteilung

^c Angabe aus SCHMIDT, et al., 1999

^d entspricht einer Sauerstoffsättigung von etwa 40 %

^e berechnet aus der Konzentration in der Vorlage und den Flußraten für Medium und pH-Korrekturmittel.

^f aus Fig. 2 bei ZART und BOCK (1998) abgelesen

^g berechnet aus den Werten von vNR und sNR.

Die aerobe Denitrifikationsaktivität von *N. eutropha* N904 ist wesentlich höher als diejenige anderer autotropher Ammoniak-Oxidierer. So besitzen bereits andere Stämme der Spezies *N. eutropha* z. T. keinerlei Denitrifikationsaktivität (D. ZART, persönliche Mitteilung). Bei der hohen Denitrifikationsaktivität von *N. eutropha* N904 handelt es sich somit offensichtlich um eine stammspezifische Eigenschaft, die vermutlich die Anpassung an besondere Umweltbedingungen darstellt. Insofern ist es nicht verwunderlich, daß mit der Anreicherungskultur 6 keine bzw. (z. T. nur auf wenige Stunden begrenzt) vergleichsweise geringe Stickstoffverluste erzielt werden konnten, obwohl mehr als 80 % der vorhandenen Organismen mit der Sonde S*-Nse als Vertreter der Gattung *Nitrosomonas* und somit „als Verwandte von *N. europaea*

N904“ nachgewiesen werden konnten. Die gute Übereinstimmung der mittels REM und FISH ermittelten Anteile (Tabelle 3.7) legt nahe, daß die Anreicherungskultur 6 zahlenmäßig von einem ellipsoiden Bakterium der *N. europaea*-Linie mit einer Breite von 0,7 bis 0,8 µm und einer Länge von 1,5 bis 1,7 µm dominiert wird.

Zusätzlich zu den Stickstoffverlusten, die über mehrere Wochen stabil über 40 % lagen (ZART, 1997), führen ZART und BOCK (1998) noch weitere Effekte des Zusatzes von 50 ppm NO₂ zur Begasungsluft auf *N. eutropha* N904 an und diskutieren diese im Zusammenhang mit den beobachteten Stickstoffverlusten. Es werden wesentlich höhere stationäre Zellzahlen erzielt und der Proteingehalt der Zellen nimmt deutlich ab. Außerdem führt NO₂ zu einer starken Erhöhung der spezifischen Nitrifikationsrate sNR (ZART, persönliche Mitteilung). Die beschriebenen Effekte waren bei den mit Anreicherungskultur 6 durchgeführten Untersuchungen nicht zu erkennen. Wenn der Begasungsluft NO₂ beigemischt war, lagen die unter Ammonium-Limitierung im steady-state gemessenen Zellzahlen sogar niedriger als bei Begasung mit NO₂-freier Luft. Die Anwesenheit von NO₂ hatte keinerlei Effekt auf die spezifische Nitrifikationsrate sNR (weder unter Ammonium-Limitierung noch nach den Ammonimpulsen). Da nur die Konzentrationen des zellulären Proteins, nicht jedoch der Biofeuchtmasse bestimmt wurden, ist eine Aussage zum Einfluß von NO₂ auf den Proteingehalt der Zellen von Anreicherungskultur 6 nicht möglich.

Es wäre denkbar, daß NO₂ bei Anreicherungskultur 6 nicht zu einer Erhöhung der Zellzahl führte, weil die stationäre Ammoniumkonzentration zu niedrig war (steady-state Bedingungen vor den Pulsen). Diese Erklärung wäre mit den Vorstellungen von BELSER (1979) und PROSSER (1989) zu vereinbaren, die annehmen, daß die maximale Zellzahl in Kulturen Ammoniak-oxidierender Bakterien durch die Ammoniumkonzentration bestimmt wird. ZART (1997) erzielte in Gegenwart von 50 ppm NO₂ eine etwa 100mal höhere Zellzahl von *N. eutropha* N904 als in NO₂-frei angezogenen Kulturen, obwohl die Ammoniumkonzentration in den Kulturen gleich waren. Er schließt daraus, daß bei *N. eutropha* N904 die maximal erreichbare Zellzahl durch die Verfügbarkeit von NO₂ und nicht von Ammonium bestimmt wird. Legt man diese Annahme auch für Anreicherungskultur 6 zugrunde, so hätte NO₂ selbst unter den Bedingungen der Ammonium-Limitierung zu einer Erhöhung der Zellzahl führen müssen. Es ist insofern anzunehmen, daß die maximale Zellzahl der Anreicherungskultur 6 nicht durch Begasung mit NO₂-haltiger Luft erhöht werden kann. Die Tatsache, daß die Erhöhung der stationären Ammoniumkonzentration (durch Erhöhung der Verdünnungsrate)

nicht zu einem Anstieg der Zellzahl führte, läßt vermuten, daß auch bei Anreicherungskultur 6 die maximale Zellzahl nicht von der Ammoniumkonzentration abhängig ist.

Die aerobe Denitrifikation autotropher Ammoniak-Oxidierer wird als Anpassung an Sauerstoffmangelbedingungen gedeutet (ZART et al., 1996). Bei Sauerstoff-Limitierung wird demnach ein Teil der Elektronen aus der Oxidation des Ammoniums auf Nitrit und nicht mehr auf Sauerstoff übertragen (MILLER und WOOD, 1983), um diesen für die AMO-Reaktion „einzusparen“ (ZART et al., 1996). Bei Sauerstoff-Limitierung auftretende N-Verluste können auf diese Weise interpretiert werden. Als mögliche Erklärung der bei einer Sauerstoffsättigung von 40 % mit Anreicherungskultur 6 beobachteten N-Verluste (Tabelle 4.3) ist diese Betrachtung jedoch wenig überzeugend.

Tab. 4.3: Während der kontinuierlichen Kultivierung mit Anreicherungskultur 6 ermittelte N-Verluste und spezifische Nitrifikationsraten sNR.

N-Verlust [%]	sNR [mmol NH ₄ ⁺ ·(mg zProt) ⁻¹ ·h ⁻¹]	experimentelle Bedingungen
0	0,015	c _{NH₄⁺} <0,5 mM, steady-state, (D=0,006 h ⁻¹)
6	0,028	c _{NH₄⁺} ≈ 19 mM, steady-state, (D=0,015 h ⁻¹)
0	0,03	c _{NH₄⁺} ≈ 5 mM, nach NH ₄ ⁺ -Puls
22-25	0,05	c _{NH₄⁺} ≈ 20 mM, nach NH ₄ ⁺ -Puls

Sowohl im steady-state als auch in den Puls-Experimenten traten N-Verluste nur bei den jeweils höheren Werten der Ammoniumkonzentration im Fermenter c_{NH₄⁺} und der spezifischen Nitrifikationsrate sNR auf. Die in den Pulsexperimenten ermittelten und zeitlich begrenzten N-Verluste sind möglicherweise Folge eines vorübergehenden Überangebots an Reduktionsäquivalenten, das mit der sprunghaft angestiegenen Nitrifikationsaktivität der Zellen einhergeht. Nach dieser Vorstellung wird Nitrit reduziert, um überschüssige Reduktionsäquivalente zu entfernen.

HOOPER et al. (1997) haben ein Modell formuliert, daß – basierend auf bekannten und postulierten Enzymaktivitäten – eine Erklärung für das Auftreten von N-Verlusten in Kulturen autotropher Ammoniak-Oxidierer liefert. Demnach erfolgt die Reduktion des NO₂⁻ zu N₂ in drei Schritten. Der erste ist die Reduktion von NO₂⁻ zu NO, eine entsprechende Nitrit-Reduktase-Aktivität wurde mehrfach nachgewiesen. Als zweiten Schritt postulieren HOOPER et al. (1997) die Umsetzung von NO mit NH₃ entsprechend Gleichung 4.1:



Das gebildete Hydrazin (N_2H_4) kann im dritten Schritt durch die HAO zu N_2 umgesetzt werden.

Die Versuchsbedingungen, unter denen BOCK und ZART (1998) N-Verluste von über 50 % erzielten, sind im Vergleich zu den Verhältnissen in Kläranlagen in hohem Maße artifiziell. So wurde die Reinkultur eines Sammlungsstammes, der ursprünglich aus Jauche isoliert wurde, unter idealisierten Laborbedingungen auf mineralischem Medium kultiviert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit der Verwendung nitrifizierender Mischkulturen, die aus der Kläranlage Mechernich angereichert wurden, bewußt ein anderer Weg beschritten. Diese Vorgehensweise bietet für die Untersuchung der mikrobiologischen Vorgänge in Abwasserreinigungsanlagen Vorteile. Zum einen entstammen die in den Anreicherungskulturen vorhandenen Organismen definitiv dem zu untersuchenden Habitat. Weiterhin bleiben Einflußfaktoren, die nur in Mischpopulationen auftreten (z. B. Nahrungskonkurrenz durch andere Stämme) grundsätzlich erhalten, die Versuchsbedingungen sind somit realistischer. Auch sollte die Gefahr einer adaptiven Veränderung – wie sie bei Stämmen besteht, die über Generationen in Stammsammlungen ohne Selektionsdruck gehalten wurden (ARTS et al., 1995) – geringer sein. Daß die Physiologie eines Organismus untersucht werden kann, wenn dieser nicht als Reinkultur (sondern in einer Mischkultur angereichert) vorliegt, zeigen die Arbeiten von VAN DE GRAAF et al. (1996) und STROUS et al. (1997). Die unter diesen Bedingungen ermittelte Stöchiometrie der Anammox-Reaktion wurde in späteren Experimenten bestätigt, in denen der Anteil von *Candidatus Brocadia anammoxidans* an der Gesamtpopulation 99,5 % betrug (STROUS et al., 1999a).

Anammox in der STK-Anlage

Nach Etablierung der FISH-Methode wurde die Bakterienflora des Scheibentauchkörpers der Mechernicher Anlage untersucht. Aus den Arbeiten von STROUS et al. (1999a und 2000) und SCHMID et al. (2000) waren inzwischen zwei verschiedene zur Anammox-Reaktion befähigte Bakterien bekannt, die beide der Ordnung Planctomycetales (SCHLESNER und STACKBRANDT, 1986) angehören. Aus diesem Grund wurden zusätzlich zu den für die Erfassung Ammoniak- und Nitrit-oxidierender Bakterien geeigneten Oligonucleotidsonden Nso190 und Nsr1156 die Sonden Pla46 (NEEF et al., 1998) und Amx820 (STROUS et al., 2000) eingesetzt. Der Zielbereich der Sonde Pla46 umfaßt die gesamte Ordnung Planctomycetales, derjenige der Sonde Amx820 die bisher bekannten Anammox-Bakterien (SCHMID et al., 2000). Die Sonde

AT1458 wurde zur Erfassung von *Azoarcus* spp. und *Thauera* spp. verwendet, da diese in periodisch belüfteten Abwasserreinigungsanlagen nachgewiesen wurden (LUKOW und DIEKMANN, 1997; WAGNER et al, 1998).

Die Ergebnisse der für den Biofilm und das Abwasser an der Stelle 3 der STK-Anlage (diese liegt etwas vor der Stelle 5, an der die von HELMER et al. [1999] untersuchte Probe entnommen wurde) durchgeführten FISH-Analysen sind in Abbildung 4.2 dargestellt. Sowohl im Biofilm als auch im Abwasser konnte etwa ein Fünftel der DAPI-positiven Zellen mit der Sonde Pla46 erfaßt werden. Vertreter der Ordnung Planctomycetales sind in der STK-Anlage damit ähnlich häufig vertreten wie Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer. Im Vergleich zu den für andere Abwasserreinigungsanlagen bestimmten Anteilen Pla46-positiver Bakterien - NEEF et al. (1998) geben 0-5 % an - liegen die für den STK ermittelten Werte ungewöhnlich hoch. Der einzig deutliche Unterschied zwischen der Bakterienflora des Biofilms und der des Abwassers besteht in den Anteilen Amx820-positiver Zellen. Sie sind mit 7 % im Biofilm, nicht jedoch im Abwasser vorhanden. Aufgrund der FISH-Untersuchungen von SCHMID et al. (2000) und STROUS et al. (2000) ist es sehr wahrscheinlich, daß es sich um zur Anammox-Reaktion befähigte Bakterien handelt. Die gänzliche Abwesenheit Amx820-positiver Zellen im Abwasser stützt diese Vermutung, da hier die Sauerstoffsättigung um 10 % oder höher liegt (HIPPEN et al., 1998b). In den Untersuchungen von STROUS et al. (1997) kam die Anammox-Reaktion bereits bei einer deutlich niedrigeren Sauerstoffsättigung von 0,5 % vollständig zum Erliegen. Mit der Sonde Nso190 konnte sowohl im Biofilm als auch im Abwasser etwa ein Viertel der mit DAPI erfaßten Zellen als Ammoniak-Oxidierer identifiziert werden. HELMER et al. (1999) ermittelten für eine Biofilmprobe, die an der etwas weiter hinten gelegenen Stelle 5 entnommen wurde, einen Anteil Nso190-positiver Zellen von 50 %. Auch die Ammoniakumsetzungen an dieser Stelle lagen deutlich über den für Stelle 3 ermittelten. Es ist insofern zu vermuten, daß die höheren Umsetzungen an Stelle 5 hauptsächlich auf den höheren Anteil Ammoniak-oxidierender Bakterien und weniger auf größere zelluläre Aktivitäten zurückzuführen ist. Der Anteil Nitrit-oxidierender Bakterien wurde sowohl im Biofilm als auch im Abwasser zu etwa 30 % ermittelt. Diese Werte sind auf den ersten Blick erstaunlich hoch, da in dem STK der Mechernicher Anlage nur vergleichsweise geringe Nitrat-Konzentrationen vorhanden sind (HIPPEN et al., 1998a; HELMER et al., 1999). Es besteht jedoch die Möglichkeit, daß ein großer Teil des aus Nitrit gebildeten Nitrats durch denitrifizierende Bakterien reduziert wird. Mit dieser Überlegung wären die hohen Anteile Nsr1156-positiver Zellen bei niedriger stationärer

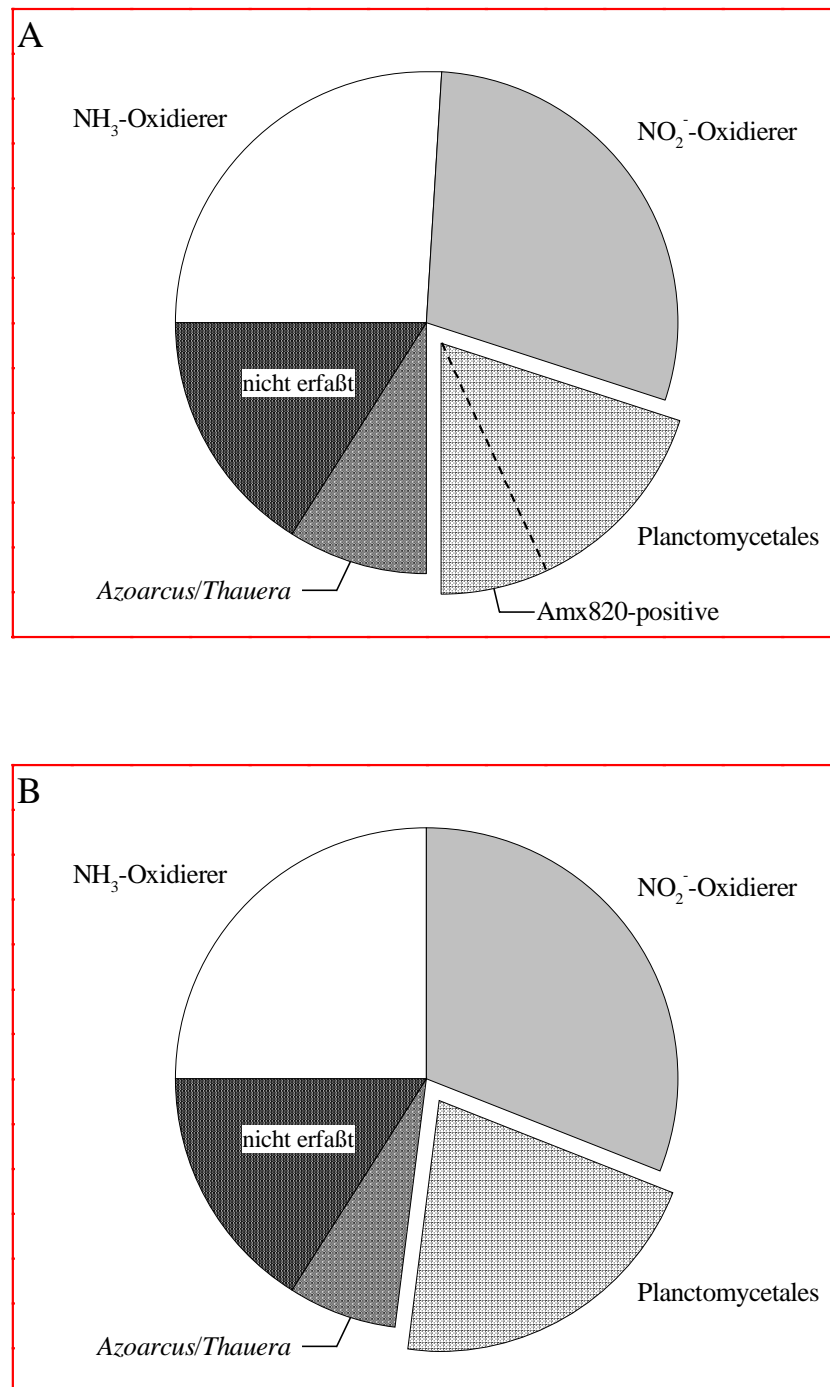


Abb. 4.2: Durch FISH-Analyse ermittelte Populationszusammensetzung der STK-Anlage.

A: Anteile verschiedener Bakteriengruppen im Biofilm.

B: Anteile verschiedener Bakteriengruppen im Abwasser.

Nitritkonzentration ebenso zu vereinbaren wie die Anwesenheit zur heterotrophen Denitrifikation befähigter Bakterien, was die mit der AT1458-Sonde ermittelten Daten nahelegen. In FISH-Experimenten mit der Sonde AT1458 kann *Alcaligenes defragans* nicht

von *Azoarcus* spp. und *Thauera* spp. unterschieden werden (RABUS et al., 1999); die in Abbildung 4.2 für das *Azoarcus/Thauera*-Cluster angegebenen Anteile sind daher ggf. zu hoch. Kontrollexperimente sind nötig, in denen die Sonde AT1458 und zusätzlich eine für den Nachweis von *A. defragans* geeignete eingesetzt wird.

Die Denitrifikationsaktivität autotropher Ammoniak-Oxidierer ist in der Regel an niedrige Sauerstoffkonzentrationen gebunden und erfolgt mit weitaus geringeren Raten als die Ammoniak-Oxidation (MARTINS DOS SANTOS et al., 1998). Auch die in dieser Arbeit mit einer Anreicherungskultur autotropher Ammoniak-Oxidierer durchgeführten Untersuchungen ergaben, daß - wenn überhaupt - nur ein Bruchteil des aus Ammonium gebildeten Nitrits stabil bzw. unter besonderen Bedingungen denitrifiziert wurde (siehe 3.4.2). Es ist davon auszugehen, daß die hohen Stickstoffverluste in der STK-Anlage überwiegend nicht auf die Stoffwechsellistung autotropher Ammoniak-Oxidierer zurückzuführen sind.

Die spezifische Rate, mit der Nitrit während der Anammox-Reaktion reduziert wird, liegt bei $3300 \mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{g zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (JETTEN et al., 1999) und damit deutlich (bis zu einem Faktor von 60) über den Denitrifikationsraten, die unter anaeroben Bedingungen für autotrophe Ammoniak-Oxidierer ermittelt wurden (Tabelle 4.4).

Tab. 4.4: Spezifische Denitrifikationsraten sDR autotropher Ammoniak-Oxidierer.

Organismus	Elektronendonator	sDR ^a	Literatur
<i>N. europaea</i>	Pyruvat	112	ABELIOVISH und VONSHAK, 1992
<i>N. eutropha</i>	endogene Verbindungen	56	SCHMIDT, 1997
<i>N. eutropha</i>	Wasserstoff	120	SCHMIDT, 1997

^a Angabe in $\mu\text{mol NO}_2^- \cdot (\text{g zProt})^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

Vor diesem Hintergrund haben die aus der Populationsanalyse der STK-Anlage gewonnenen Daten eine enorme Bedeutung. 20 % der Bakterien gehören zur Ordnung Planctomycetales und sind somit als potentielle Anaerobe Ammonium-Oxidierer in Betracht zu ziehen, 7 % der Bakterien des Biofilms wurden mit der Sonde Amx820 erfaßt und sind daher mit großer Wahrscheinlichkeit Anaerobe Ammonium-Oxidierer (SCHMID et al., 2000). Die Daten der Populationsanalyse legen somit nahe, daß die in der STK-Anlage stattfindenden Stickstoffumsetzungen und insbesondere die -verluste zu einem erheblichen Teil durch Anammox-Bakterien verursacht werden.

In Untersuchungen mit Mikroelektroden wurde festgestellt, daß der aerobe Bereich eines nitrifizierenden Biofilms auf die oberen 50-100 µm begrenzt sein kann (SCHRAMM et al., 1996 und 1997). Aufgrund der für *Candidatus Brocadia anammoxidans* nachgewiesenen Sauerstoffsensitivität (STROUS et al., 1997) ist anzunehmen, daß die Anammox-Aktivität auf untere Bereiche des Biofilms beschränkt ist. Eine Schichtung des Biofilms in eine obere aerobe Zone, in der Ammonium zu Nitrit oxidiert wird, und eine untere anaerobe Zone, in der die Anammoxreaktion stattfindet, wurde bereits von verschiedenen Autoren diskutiert (MARTINS DOS SANTOS et al., 1998) und mit N-Verlusten in Anlagen mit Scheibentauchkörpern in Verbindung gebracht (SIEGRIST et al., 1998). Auch bei der mathematischen Modellierung dieser Vorgänge durch KOCH et al. (2000) wurde eine entsprechende Schichtung angenommen. Derzeit wird in diesem Labor untersucht, ob eine der beschriebenen Modellvorstellung entsprechende räumliche Anordnung der Nso190-positiven Bakterien einerseits und der Amx820-positiven andererseits in dem Biofilm der Mechnischer Anlage vorliegt.

Die für die β -Proteobacteria ermittelten Anteile lagen sowohl im Biofilm als auch im Überstand deutlich unter der Summe der mit den Sonden Nso190 und AT1458 ermittelten Anteile und damit zu niedrig. Auch bei der FISH-Analyse der Anreicherungskultur 3 und 6 mit der für *Nitrobacter* spp. spezifischen Sonde Nit3 wurden falsche (falsch positive) Werte ermittelt (siehe 3.4.1 und 3.4.2). Diese Befunde zeigen, daß die FISH-Methode insbesondere dann störanfällig ist, wenn eine Sonde zusammen mit einem nicht markierten Kompetitor eingesetzt wird. Grundsätzlich ist es erforderlich, in einem Hybridisierungsexperiment für jede verwendete Sonde positive und negative Kontrollen durchzuführen. Auch durch kristalline Ablagerungen in den Proben (z. B. CaCO₃) verursachte Autofluoreszenzerscheinungen können die Auswertung der Experimente entscheidend behindern. Eine Lösung dieses Problems kann durch das Waschen (Suspendieren und Aufkonzentrieren) der Proben in PBS-Puffer erzielt werden, bei dem in der Probe vorhandene Kristalle gelöst werden.

Schlußbetrachtung der Ergebnisse der Populationsanalyse

Mit der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH) steht seit mehreren Jahren eine Methode zur Verfügung, mit der die mikrobielle Zusammensetzung von Umweltproben quantitativ erfaßt werden kann (WAGNER et al., 1993; AMANN et al., 1995). Durch den zusätzlichen Einsatz von moderner Bildverarbeitung (POULSEN et al., 1993; BRÜHL et al., 2000), Mikroelektroden (SCHRAMM et al., 1996, 1997 und 1999; OKABE et al., 1999) und dem Verfahren der Mikro-

autoradiographie (NIELSEN et al., 1999; LEE et al., 1999; OUVENEY und FUHRMANN, 1999) sind die Möglichkeiten zur Analyse komplexer Habitate enorm erweitert worden. Diese Entwicklung hat entscheidend zu einem tieferen Verständnis mikrobiologischer Stickstoffumsetzungen beitragen. Die neuen Kenntnisse bieten die Perspektive, mathematische Modelle zur quantitativen Beschreibung der für die biologische Abwasserreinigung relevanten Vorgänge deutlich zu verbessern (OERTHER et al., 1999).

Auf der anderen Seite erscheinen immer wieder Arbeiten, in denen Untersuchungen mit gänzlich unbekanntem Mischpopulationen durchgeführt wurden. Da keinerlei Anhaltspunkte über die Populationszusammensetzung vorliegen, lassen sich die erzielten Ergebnisse in der Regel weder eindeutig interpretieren noch mit den Resultaten anderer Autoren wirklich vergleichen. Möglicherweise ist durch die rasante Entwicklung der letzten Jahre der Eindruck entstanden, daß es sich bei der FISH-Methode zwangsläufig um eine aufwendige und teure Technik handelt. Dies ist nicht der Fall. Die in dieser Arbeit enthaltenen FISH-Analysen wurden mit einem konventionellen Mikroskop mit Aufsicht-Fluoreszenzeinrichtung und ohne Verwendung einer Bildverarbeitungssoftware durchgeführt. Insbesondere die für den STK der Mechernicher Anlage ermittelten Populationsdaten zeigen, daß auch mit einem begrenzten technischen und finanziellen Aufwand entscheidende Informationen über die vorhandene Bakterienflora gewonnen werden können, die ein Verständnis der beobachteten mikrobiologischen Umsetzungen erst ermöglichen.

Bis vor wenigen Jahren nahm man an, daß Bakterien der Ordnung Planctomycetales (SCHLESNER und STACKEBRANDT, 1986) auf aquatische Habitate beschränkt sind (STALEY et al., 1992). Inzwischen steht jedoch fest, daß dies nicht der Fall ist. So wurden Planctomyceten u. a. aus Belebtschlamm, Gülle und Küchenabfällen isoliert (SCHLESNER, 1994) und mit molekularbiologischen Methoden mehrfach in Bodenproben (LIESACK und STACKEBRANDT, 1992; BORNEMANN et al., 1996; LEE et al., 1996; ZARDA et al., 1997) und im Belebtschlamm (BOND et al., 1995; BURRELL et al., 1998; BLACKALL et al., 1989; NEEF et al., 1998) nachgewiesen. Insbesondere vor dem Hintergrund der jüngsten Arbeiten von STROUS et al. (1999a und 2000) und SCHMID et al. (2000) ist die Anwesenheit von Planctomyceten in der Mechernicher STK-Anlage sowie ihr Beitrag zu den N-Umsetzungen und -Verlusten nicht überraschend. Die Anammox-Aktivität einiger Planctomyceten ist wahrscheinlich nicht auf Abwasserreinigungsanlagen beschränkt. Bedingungen, die für die Anammox-Reaktion geeignet erscheinen, liegen auch an ganz anderen Standorten vor (MURRAY et al., 1989; JORGENSEN et

al., 1991). Dies läßt vermuten, daß die Anaerobe Ammonium Oxidation auch für die globalen N-Umsetzungen von Bedeutung ist.

Nach dem derzeitigen Stand der Kenntnisse ist zu erwarten, daß die Anammox-Reaktion für die Stickstoffeliminierung aus Abwässern mit niedrigem C/N-Verhältnis anderen Verfahren überlegen und für die technische Anwendung zu bevorzugen ist. Die bevorzugte Lösung besteht darin, daß sich – wie in der Mechernicher STK-Anlage – spontan ein Biofilm bildet, der in der oberen Schicht nitrifiziert und in der tieferen Schicht Ammonium anaerob oxidiert. Derzeit läßt sich das Aufwachsen eines solchen zweischichtigen Biofilms nur begrenzt steuern. Aus diesem Grund erscheint eine 2-stufige Verfahrensweise eher realisierbar (VAN LOOSDRECHT und JETTEN, 1997), bei der in der ersten Stufe knapp die Hälfte des Ammoniums bis zum Nitrit oxidiert wird und dieses in einem zweiten Reaktor, dessen Betriebsbedingungen den Bedürfnissen der Planctomyceten angepaßt sind, mit dem noch vorhandenen Ammonium entsprechend der Anammox-Reaktion zu N_2 umgesetzt wird. Ob zweistufig oder einstufig als Biofilm – für das Anfahren und den Betrieb der Reaktoren ist eine ständige Populationsanalyse unverzichtbar.

Charakterisierung und Klassifizierung von *T. mechernichensis* TL1

Bei den ersten Versuchen zur Charakterisierung der Mikroorganismenflora der Mechernicher STK-Anlage wurde ein neuer heterotropher Nitrifizierer/aerober Denitrifizierer isoliert (LUKOW, 1996). Die Analyse von Teilsequenzen der 16S rDNA ergab, daß er der Gattung *Thauera* nahesteht (LUKOW und DIEKMANN, 1997). In dieser Arbeit wurde der Stamm TL1 phänotypisch und physiologisch weiter charakterisiert und mittels Molekulartaxonomie klassifiziert. Nachdem diese Untersuchungen abgeschlossen und zur Publikation eingereicht waren, erschien eine Arbeit von FOSS und HARDER (1998), in der zwei neue Spezies der Gattung *Thauera*, *T. linaloolentis* und *T. terpenica*, beschrieben wurden. Sie sind nicht im Ergebnisteil erwähnt.

Der Vergleich phänotypischer, physiologischer und chemotaxonomischer Merkmale zeigt, daß zwischen dem Stamm TL1 und den zuvor beschriebenen Spezies der Gattung *Thauera* nur geringe Unterschiede bestehen (Tabelle 4.5). Ob die Bildung von N₂O oder N₂ taxonomische Bedeutung hat, müßte in weiteren Versuchen festgestellt werden. Die optimale Wachstumstemperatur von 40 °C ist höher als bei den anderen *Thauera*-Vertretern. Möglicherweise ist sie Folge der Anpassung von TL1 an die Bedingungen des natürlichen Habitats. Nur wenige Substrate wurden mit allen Typstämmen der Gattung *Thauera* getestet; eine vergleichende Analyse ist notwendig.

Laut Empfehlung von WAYNE et al. (1987) werden Stämme mit einer DNA-Homologie von mindestens 70 % derselben Spezies zugeordnet. DNA-Homologiewerte dieser Größenordnung sind in der Regel nur dann zu erwarten, wenn basierend auf 16S rDNA-Analysen Ähnlichkeiten von 97 % oder mehr bestehen (STACKEBRANDT und GOEBEL, 1994). Unter Berücksichtigung dieser Empfehlungen wurden nach Vorliegen der Daten zur 16S rDNA-Homologie DNA-DNA-Hybridisierungen durchgeführt.

Aufgrund der bestehenden DNA-DNA-Homologie von 90 % zwischen *T. aromatica* K172^T und dem Stamm mXyN1 gehört dieser der Spezies *T. aromatica* an. Die DNA-DNA-Homologie zwischen TL1 und den Stämmen *T. selenatis* ATCC 55363^T und *T. aromatica* K172^T ist mit 25 bzw. 27 % so gering, daß Identität ausgeschlossen werden kann (STACKEBRANDT und LIESACK, 1993). Die 16S rDNA-Ähnlichkeiten zwischen TL1 und *T. linaloolentis* 47Lo1^T bzw. *T. terpenica* 58Eu^T betragen 96,9 bzw. 96,6 %; eine zusätzliche Analyse mittels DNA-DNA-Hybridisierung war daher nicht erforderlich.

Tab. 4.5: Vergleich von Spezies der Gattung *Thauera*. + positiv, (+) schwach positiv, - negativ, ND nicht bestimmt.

Eigenschaft	<i>T. selenatis</i> ATCC 55363 ^{T*}	<i>T. aromatica</i> K172 ^{T*}	<i>T. linaloolentis</i> 47Lo1 ^{T♦}	<i>T. terpenica</i> 58Eu ^{T♦}	TL1 ^{T♥}
Zellmorphologie	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen	Stäbchen
Zellabmessungen [μm]	0,56 × 1,4	0,5-1,5 × 1,0-2,5	0,5-0,8 × 1,4-2,7	0,8-1,0 × 1,6-2,2	0,75 × 1,5-2,0
Beweglichkeit	+	+	+	+	+
Oxidativer Stoffwechsel	+	+	+	+	+
PHB-Akkumulation	+	+	ND	ND	+
Anaerobe Denitrifikation ^a	+ (N ₂ O)	+ (N ₂ O)	+ (N ₂)	+ (N ₂)	+ (N ₂ O)
Aerobe Denitrifikation	ND	ND	ND	ND	+
Selenatatmung	+	-	ND	ND	ND
G+C-Gehalt [mol%]	66	67	66	64	65
optim. Wachstumstemp. [°C]	25-30	28	32	32	40
Vitaminbedarf	+, ND	-	-	+, B ₁₂	-
Fettsäureanteile [%]					
10:0 3-OH	ND	4,9	2,9	2,3	4,0
12:0	ND	4,9	5,7	5,5	5,3
16:1 ω 7cis	ND	40,8	47,1	49,4	46,9
16:0	ND	32,2	28,5	30,6	18,5
18:1 ω 7cis	ND	13,6	12,9	9,0	16,6

*Angaben aus RECH und MACY (1992) und MACY et al. (1993).

*Angaben aus TSCECH und FUCHS (1987) und ANDERS et al. (1995).

♦Angaben aus FOSS und HARDER (1998).

♥Angaben aus LUKOW und DIEKMANN (1997) und aus dieser Arbeit.

^aDas mengenmäßig überwiegende Produkt ist in Klammern angegeben.

Der Stamm TL1 gehört somit einer neuen Spezies der Gattung *Thauera* an, für die der Name *Thauera mechernichensis* vorgeschlagen wird (SCHOLTEN et al., 1999). Der Typstamm ist TL1^T (=DSM 12266^T). Abbildung 4.3 enthält einen phylogenetischen Stammbaum, der auf den Daten der 16S rDNA-Homologie-Analyse beruht. Die 16S rDNA-Sequenz ist unter Y17590 abgelegt.

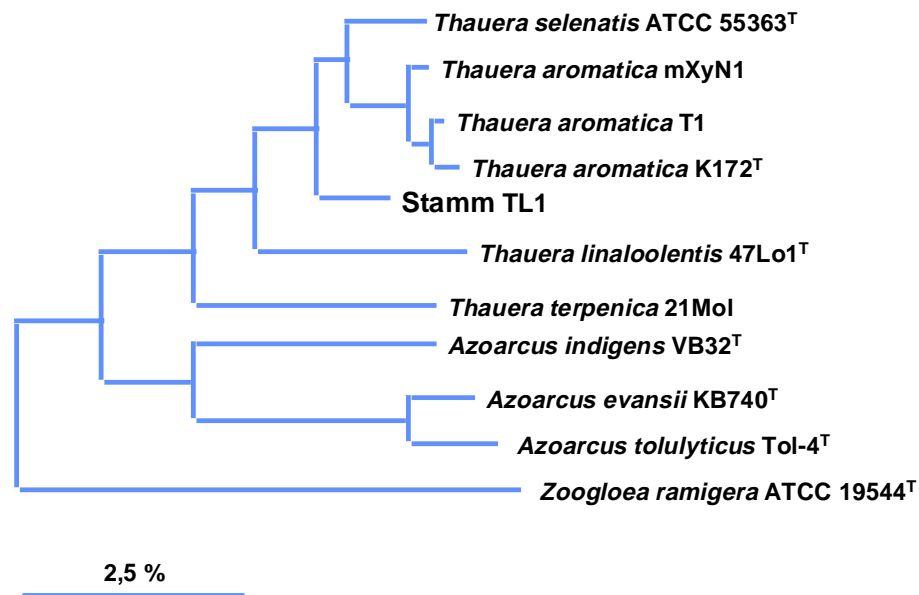


Abb. 4.3: Aus den 16S rDNA-Homologiedaten erstellter phylogenetischer Stammbaum. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 2,5 %.

Ergebnisse von FISH-Analysen, in denen TL1 mit der Sonde Nso190 erfaßt wurde (HAMZAVI, 2000) haben sich in Wiederholungsexperimenten als falsch positiv herausgestellt. Dieser Befund steht insofern mit Sequenzdaten im Einklang, als zwischen der Sonde Nso190 und der Zielregion auf der 16S rRNA von TL1 zwei Fehlpaarungen bestehen. Aufgrund der zur Spezifität der Sonde Nso190 vorliegenden Daten (MOBARRY et al., 1996) sollten diese Sequenzunterschiede bewirken, daß TL1 nicht erfaßt wird.

Die in Schüttelkolben durchgeführten Experimente (3.5.1.6) zeigen, daß TL1 unter aeroben Bedingungen Nitrit reduziert. Da die Abnahme der Nitritkonzentration erst einsetzt, nachdem die Konzentration des zellulären Proteins (und damit der Sauerstoffbedarf der Kultur) sichtbar angestiegen ist, darf angenommen werden, daß die Nitritreduktion erst bei relativ niedrigen Werten der Sauerstoffsättigung stattfindet. Eine assimilatorische Nitritreduktion kommt nicht als Ursache der Konzentrationsabnahme in Betracht, da diese Reaktion aufgrund der Anwesenheit von NH₄Cl gehemmt ist (MADIGAN et al., 2000). Während der kontinuierlichen

Kultivierung von Stamm TL1 bei 8 % Sauerstoffsättigung wurde in allen Fällen weniger Stickstoff in der Biomasse festgelegt als aufgrund der aus dem Medium entfernten Ammoniummenge zu erwarten war. Basierend auf dem von WEHRFRITZ et al. (1993) für die Kombination von heterotropher Nitrifikation und aerober Denitrifikation formulierten Modell ist anzunehmen, daß der „fehlende Teil“ des Ammoniums heterotroph zu Nitrit nitrifiziert und dieses anschließend denitrifiziert wurde. Dies würde bedeuten, daß TL1 bei einer Sauerstoffsättigung von 8 % Nitrit denitrifiziert, nicht jedoch Nitrat (Tabelle 3.20). Im Gegensatz dazu ist bei anderen aeroben Denitrifizierern die Reduktion des Nitrats bei höheren pO_2 -Werten möglich als die des Nitrits (KÖRNER und ZUMFT, 1989; KÖRNER, 1993; HÄRTIG und ZUMFT, 1999). Während der in dieser Arbeit durchgeführten Experimente setzte die Denitrifikation des Nitrats durch TL1 erst ein, nachdem die Sauerstoffsättigung auf 0 % herabgesetzt war (Abbildung 3.11). Dieser Befund steht nicht mit den von LUKOW (1996) erzielten Ergebnissen im Einklang, der bereits bei einer Sauerstoffsättigung von 10 % eine sichtbare Abnahme der Nitratkonzentration ermittelte. Es ist zu prüfen, ob diese Abweichungen darauf zurückzuführen sind, daß der Stamm TL1 - ähnlich wie *T. pantotropha* (ARTS et al., 1995) - während der Stammhaltung seine Eigenschaften verändert hat.

Auffällig ist das verzögerte Einsetzen der Nitratreduktion nach Herabsetzung des pO_2 bei Luftbegasung gegenüber dem bei Begasung mit Stickstoff (Abbildungen 3.12 und 3.13). Das beobachtete Verhalten könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Gene des zur Nitratreduktion notwendigen Enzyms erst induziert bzw. dereprimiert werden, wenn die Sauerstoffsättigung einen charakteristischen Schwellenwert unterschritten hat. Diese Vorstellung würde das verzögerte Einsetzen des Nitratverbrauchs nach Herabsetzung des pO_2 auf 0 % (bei Luftbegasung) erklären. Es stellt sich jedoch die Frage, warum der Nitratverbrauch bei dem späteren pO_2 -Shift auf 0 % bei Stickstoffbegasung (Abbildung 3.13) ohne erkennbare Verzögerung auftrat. Angesichts des vorhergehenden mehr als 120stündigen Kontibetriebs ($D=0,043 \text{ h}^{-1}$) bei einem pO_2 von 1 % kann nicht damit argumentiert werden, daß die nach dem ersten pO_2 -Shift auf 0 % in den Zellen aufgebaute Nitrat-Reduktase-Aktivität weitgehend erhalten geblieben ist, da die Zellen mit Nitrat-Reduktase-Aktivität vollständig ausgewaschen sein dürften.

Die mit reduzierten Viologenfarbstoffen in ganzen Zellen von TL1 ermittelten Nitrat-Reduktase-Aktivitäten (3.5.1.7) sind ein deutlicher Hinweis auf eine im periplasmatischen Raum lokalisierte Nitrat-Reduktase. Dieser Befund ist von besonderem Interesse.

Eine periplasmatische Nitrat-Reduktase (Nap) wurde in phototrophen und denitrifizierenden Bakterien sowie in Enterobacteriaceae nachgewiesen. Die Funktion dieses Enzyms ist im Gegensatz zu der der cytoplasmatischen Nitrat-Reduktase (assimilatorische Nitratreduktion) und der der membrangebundenen Nitrat-Reduktase (anaerobe Atmung mit Nitrat als terminalem Elektronenakzeptor) weitgehend unbekannt. Die Nap-Systeme verschiedener Bakterien unterscheiden sich z. T. deutlich hinsichtlich Ort, Anzahl und Organisation der kodierenden Gene. So sind die *nap*-Gene in *R. capsulatus*, *R. sphaeroides* und *R. eutropha* (ehemals benannt *A. eutrophus*) Plasmid-codiert (WILLISON, 1990; CASTILLO et al., 1996), während sie in *E. coli* auf dem Bakterienchromosom liegen (GROVE et al., 1996). In allen bisher bekannten Operons sind die Gene *napD*, *A*, *B* und *C* gefunden worden. Zusätzlich kommen fünf weitere Gene (*napK*, *E*, *F*, *G* und *H*) in unterschiedlichen Kombinationen vor (POTTER et al., 1998).

Hinsichtlich möglicher Funktionen der Nap werden verschiedene Aspekte diskutiert. Mehrere Autoren vermuten, daß die Nap dem Abbau überschüssiger Reduktionskraft dient und so entscheidend zur Aufrechterhaltung eines für die Bakterienzelle günstigen Redox-Gleichgewichts beiträgt (RICHARDSON et al., 1988; ROLDÁN et al., 1994; BERKS et al., 1995; SEARS et al., 1997; MORENO-VIVIÁN und FERGUSON, 1998). Weiterhin wird angenommen, daß konkurrierende Organismen mit dem durch die Nap gebildeten Nitrit am Wachstum gehindert werden sollen (KERBER und CÁRDENAS, 1982). Wie schon in 3.5.1.7 zitiert, wird auch die Befähigung einiger Bakterien zur aeroben heterotrophen Denitrifikation auf ihre Nap-Aktivität zurückgeführt (BELL et al., 1990; CARTER et al., 1995b). Da Nitrat durch die Nap bereits im Periplasma zu Nitrit umgesetzt wird, ist die Hemmung der Nitrataufnahme durch Sauerstoff wirkungslos und die Denitrifikation kann auch in Gegenwart von Sauerstoff erfolgen (BELL et al., 1990; BERKS et al., 1995).

Bisher wurde für keinen Vertreter der Gattung *Thauera* der Besitz einer periplasmatischen Nitrat-Reduktase beschrieben. Insofern ist es von besonderem Interesse, in weiterführenden Arbeiten zunächst die Lokalisation der in TL1 vorhandenen Nitrat-Reduktase-Aktivität(en) zu untersuchen. Dazu ist es notwendig, die periplasmatische, die cytoplasmatische und die Membranfraktion zu präparieren und die jeweils vorhandene Nitrat-Reduktase-Aktivität zu ermitteln. Inzwischen wurde in diesem Institut eine periplasmatische Nitrat-Reduktase aus TL1 weitgehend gereinigt (PLATTNER, unveröffentlicht). Zusätzlich sollten biochemische und molekularbiologische Arbeiten zur Charakterisierung des Nap-Systems und der kodierenden Gene in TL1 durchgeführt werden. Nach dem Auffinden, Klonieren und Sequenzieren der *nap*-

Gene werden wichtige Informationen zur Struktur des *nap*-Operons in TL1 vorliegen. Auf diese Weise wird die phänotypische Untersuchung von definierten Insertionsmutanten und darauf basierend die Formulierung von Struktur-Funktions-Beziehungen möglich. Die Ergebnisse dieser Experimente werden entscheidend zum Verständnis der Funktion der Nap im Stoffwechsel von TL1 und damit auch zum Verständnis der aeroben Denitrifikation beitragen. Der Vergleich der für das *nap*-System in TL1 ermittelten Struktur- und Sequenzdaten mit den für andere Organismen beschriebenen wird generelle Informationen über die Variabilität bakterieller *nap*-Systeme liefern. Sollte sich herausstellen, daß gewisse Motive für die in aeroben Denitrifizierern vorhandenen *nap*-Systeme charakteristisch sind, so wäre es möglich, basierend auf den ermittelten Sequenzdaten funktionsspezifische DNA-Sonden für das Screening nach aeroben heterotrophen Denitrifizierern einzusetzen. Bisher liegen zu diesem Thema nur sehr wenige Informationen vor. FLANAGAN et al. (1999) haben eine PCR-Methode und zwei DNA-Sonden entwickelt, mit denen bakterielle *napA*-Gene aufgespürt werden können (DNA-Sonden, mit denen Gene anderer Denitrifikationsenzyme bzw. Gene der Nitrifikationsenzyme autotropher Ammoniak-Oxidierer nachgewiesen werden können, liegen bereits vor [LINNE VON BERG und BOTHE, 1992; KLOOS et al., 1995; HOLBEN et al., 1998; BRUNS et al., 1998]). Bei einigen der untersuchten Stämme stand jedoch die Befähigung/Nichtbefähigung zur aeroben Denitrifikation nicht im Einklang mit den Ergebnissen der PCR- bzw. Sondenexperimente. Wahrscheinlich reichen die bisher vorhandenen Informationen über die an der aeroben Denitrifikation verschiedener Bakterien beteiligten Enzyme nicht für die Entwicklung von DNA-Sonden aus, mit denen entsprechende Organismen zuverlässig aufgespürt werden können.

Die Nitrifikationsaktivität von TL1 wurde unter Annahme heterotropher Nitrifikation und aerober Denitrifikation aus N-Bilanzen erschlossen. Nach der Reinigung und Charakterisierung der AMO und HAO von *Paracoccus pantotrophus*- bzw. *P. denitrificans*-Stämmen (WEHRFRITZ et al., 1993; MOIR et al., 1996a und 1996b) und der heterologen Expression der Gene (CROSSMAN et al., 1997) liegen für das Verständnis der heterotrophen Nitrifikation notwendige biochemische und molekularbiologische Informationen vor. Die Funktion der heterotrophen Nitrifikation im Stoffwechsel von *P. denitrificans* wurde durch CROSSMAN et al. (1998) mit *knock-out*-Mutanten untersucht. Die Arbeiten legen nahe, daß die heterotrophe Nitrifikation bei *P. denitrificans* zur Aufrechterhaltung des zellulären Redoxgleichgewichts dient. Der direkte Nachweis für die Nitrifikation bei TL1 ist noch zu erbringen.

5 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurde die Zusammensetzung der Bakterienflora in der biologischen Stufe der Kläranlage Mechernich analysiert und der Einfluß der Betriebsparameter auf die Nitrifikation und Denitrifikation in kontinuierlich betriebenen Labor-Reaktoren untersucht.

Das C/N-Eliminationsverhältnis in der Scheibentauchkörper(STK)-Anlage legte nahe, daß die N-Verluste überwiegend durch autotrophe Prozesse hervorgerufen werden. Daher wurden zunächst autotrophe Nitrifizierer aus verschiedenen Bereichen der biologischen Stufe in Reagenzgläsern angereichert. Die Anreicherungskulturen setzten Ammonium zu Nitrit um, Nitrat wurde nicht gebildet. Zwei dieser Kulturen wurden in kontinuierlich betriebenen Reaktoren untersucht.

Die Experimente mit Anreicherungskultur 6 wurden bei $pO_2 = 40\%$ mit vollständiger Biomasserückhaltung durchgeführt. Im stationären Zustand ($D = 0,006\text{ h}^{-1}$, $c_{NH_4^+} < 0,5\text{ mM}$) wurden keine N-Verluste ermittelt. Nach Erhöhung der Verdünnungsrate auf $0,015\text{ h}^{-1}$ traten im stationären Zustand bei $c_{NH_4^+} \approx 19\text{ mM}$ N-Verluste von etwa 5% auf. NH_4^+ -Pulse von $< 0,5$ auf 25 mM führten dagegen zu N-Verlusten von etwa 25% . Die Denitrifikationsaktivität autotropher Ammoniak-Oxidierer wurde somit bestätigt. Es ist zu vermuten, daß mit sprunghaft zunehmender Nitrifikationsaktivität der Zellen vermehrt Nitrit reduziert wird, um überschüssige Reduktionsäquivalente zu entfernen. Der Zusatz von NO_2 zur Begasungsluft führte zu keiner Steigerung der N-Verluste.

Mit der Kultur 3 wurde nach dreimonatigem kontinuierlichen Betrieb überwiegend Nitrat gebildet. Bei einem pO_2 von 0% konnte durch Veränderung der Temperatur von 28 auf 35 °C und der Verdünnungsrate von $0,005$ auf $0,008\text{ h}^{-1}$ die Nitrifikation weitgehend auf der Stufe des Nitrits angehalten werden. Vor Erreichen eines neuen stationären Zustands lag das molare NH_4^+/NO_2^- -Verhältnis im Auslauf bei 1 zu $1,3$, wie es für einen Anammox-Reaktor anzustreben ist. Mit der Technik der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH), bei der Bakterien mit fluoreszenzgekoppelten DNA-Oligonukleotiden spezifisch markiert und am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert werden, wurde gezeigt, daß die jeweilige Stoffbilanz und die Populationszusammensetzung nicht korrelieren.

Bei der Populationsanalyse des Biofilms auf dem STK konnten ca. 85% der vorhandenen Bakterien zugeordnet werden. Autotrophe Ammoniak-Oxidierer machen 26% und Nitrit-Oxidierer 29% der DAPI-positiven Zellen aus. Planctomyceten sind mit 20% vertreten.

Anaerobe Ammonium-Oxidierer (erfaßt mit der Sonde Amx820) waren mit einem Anteil von 7 % im Biofilm, nicht jedoch im Abwasser vorhanden. Die mit Anreicherungskultur 6 ermittelten N-Verluste und die Ergebnisse der Populationsanalyse des Biofilms lassen den Schluß zu, daß die Stickstoffverluste der STK-Anlage maßgeblich durch die Anaerobe Ammonium Oxidation verursacht werden.

Ein aus der Scheibentauchkörper-Anlage isolierter heterotropher Denitrifizierer, Stamm TL1, wurde phänotypisch und physiologisch weiter charakterisiert. Eine aktive Nitrat-Reduktase ist im Periplasma lokalisiert und wurde in kontinuierlicher Kultur erst bei einem pO_2 nahe 0 % nachgewiesen. Mit den Ergebnissen der 16S rDNA-Sequenzierung und DNA/DNA-Hybridisierung konnte TL1 als neue Art *Thauera mechernichensis* beschrieben werden.

6 Literatur

- Abeling, U. 1994. Stickstoffelimination aus Industrieabwässern - Denitrifikation über Nitrit. Veröffentlichungen des Institutes für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover, Heft 86.
- Abeling, U. und Seyfried, C.-F. 1992. Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater - nitrogen removal via nitrite. *Wat. Sci. Tech.* 26: 1007-1015.
- Abeliovich, A. und Vonshak, A. 1992. Anaerobic metabolism of *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 158: 267-270.
- Albers, H. 1991. Zur biologischen Reinigung von Sickerwasser aus Sonderabfalldeponien. Veröffentlichungen des Institutes für Siedlungswasserwirtschaft der TU Braunschweig, Heft 49.
- Amann, R. 2000. Who is out there? Microbial aspects of biodiversity. *System. Appl. Microbiol.* 23: 1-8.
- Amann, R. I., Binder, B. J., Olson, R. J., Chisholm, S. W., Devreux, R. und Stahl, D. A. 1990. Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1919-1925.
- Amann, R., Ludwig, W. und Schleifer, K.-H. 1995. Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59: 143-169.
- Anders, H.-J., Kaetzke, A., Kämpfer, P., Ludwig, W. und Fuchs, G. 1995. Taxonomic position of aromatic-degrading denitrifying Pseudomonad strains K 172 and KB 740 and their description as new members of the genera *Thauera*, as *Thauera aromatica* sp. nov. and *Azoarcus*, as *Azoarcus evansii* sp. nov. respectively, members of the beta subclass of the *Proteobacteria*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 327-333.
- Anderson, I. C. und Levine, J. S. 1986. Relative rates of nitric oxide production by nitrifiers, denitrifiers and nitrate respirers. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 938-945.
- Anthonisen, A. C., Loehr, R. C., Prakasam, T. B. S. und Srinath, E. G. 1976. Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *J. Wat. Poll. Control Fed.* 48: 835-852.

- Arts, P. A. M., Robertson, L. A. und Kuenen, J. G. 1995. Nitrification and denitrification by *Thiosphaera panthotropa* in aerobic chemostat cultures. FEMS Microbiol. Ecol. 18: 305-316.
- ATCC. 1992. Catalogue of Bacteria and Phages, 18th edition, American Type Culture Collection, Rockville.
- ATV – Abwassertechnische Vereinigung. 1987. Umwandlung und Elimination von Stickstoff im Abwasser. Arbeitsbericht der ATV-Fachausschüsse 2.6 und 2.8. Korrespondenz Abwasser 34: 77-85 und 167-171.
- ATV – Abwassertechnische Vereinigung. 1994. Umgestaltung zweistufig biologischer Kläranlagen zur Stickstoffelimination. Arbeitsbericht des ATV-Fachausschusses 2.6. Korrespondenz Abwasser 41: 95-100.
- Auling, G., Dittbrenner, M., Maarzahl, M., Nokhal, T. und Reh, M. 1980. Deoxyribonucleic acid relationships among hydrogen-oxidizing strains of the genera *Pseudomonas*, *Alcaligenes* and *Paracoccus*. Int. J. Syst. Bacteriol. 30: 123-128.
- Ausubel, F. M. 1994. Current protocols in molecular biology. John Wiley & Sons, New York.
- Balmelle, B., Nguyen, K. M., Capdeville, B. Cornier, J. C. und Deguin, A. 1992. Study of factors controlling nitrite build-up in biological process for water nitrification. Wat. Sci. Tech. 26: 1017-1025.
- Baumgarten, G. und Seyfried C.-F. 1996. Experience and new development in biological pretreatment and physical post-treatment of landfill leachate. Wat. Sci. Tech. 34: 445-453.
- Bell, L. C., Richardson, D. J. und Ferguson, S. J. 1990. Periplasmic and membrane-bound respiratory nitrate reductases in *Thiosphaera pantotropa*: the periplasmic enzyme catalyzes the first step in aerobic denitrification. FEBS Lett. 265: 85-87.
- Belser, L. W. 1979. Population ecology of nitrifying bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 33: 309-333.
- Bennemann, H., Feldmann, M. und Hempel, D. C. 1991. Nitrifikation mit immobilisierten Bakterien. gwf wasser/abwasser 132: 686-689.
- Berks, B., Ferguson, S. J., Moir, J. W. B. und Richardson, D. J. 1995. Enzymes and associated electron transport systems that catalyse the respiratory reduction of nitrogen oxides and oxyanions. Biochim. Biophys. Acta 1232: 97-173.

- Berks, B. C., Richardson, D. J., Robinson, C., Reilly, A., Alpin, R. T. und Ferguson, S. J. 1994. Purification and characterization of the periplasmic nitrate reductase from *Thiosphaera pantotropha*. Eur. J. Biochem. 220: 117-124.
- Beuse, M. 1998. Populationsverteilung und Wachstumsmodus bei *Saccharomyces cerevisiae* in synchronen Chemostatkulturen. Dissertation, Universität Hannover.
- Blackall, L. L., Burrell, P. C., Gwilliam, H., Bradford, D., Bond, P. L. und Hugenholtz, P. 1998. The use of 16S rDNA clone libraries to describe the microbial diversity of activated sludge communities. Wat. Sci. Tech. 37: 451-454.
- Blackmer, A. M., Bremer, J. M. und Schmidt, E. L. 1980. Production of nitrous oxide by ammonia-oxidizing chemoautotrophic microorganisms in soil. Appl. Environ. Microbiol. 40: 1060-1066.
- Bock, E., Koops, H. P., Ahlers, B. und Harms, H. 1992. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as energy source. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer, K.-H. (eds.) The Prokaryotes, Vol. 1, Springer, New York, S. 414-430.
- Bock, E., Schmidt, I., Stüven, R. und Zart, D. 1995. Nitrogen loss caused by denitrifying *Nitrosomonas* cells using ammonium or hydrogen as electron donors and nitrite as electron acceptor. Arch. Microbiol. 163: 16-20.
- Bond, P. L., Hugenholtz, P., Keller, J. und Blackall, L. L. 1995. Bacterial community structures of phosphate-removing activated sludges from sequencing batch reactors. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1910-1916.
- Bornemann, J., Skroch, P. W., O'Sullivan, K. M., Palus, J. A., Rumjanek, N. G., Jansen, J. L., Nienhuis, J. und Triplett, E. W. 1996. Molecular microbial diversity of an agricultural soil in Wisconsin. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1935-1943.
- Braun Biotech International GmbH, Melsungen, Betriebshandbuch Biostat B, 1996.
- Brosius, J., Dull, T. J., Sleeter, D. D. und Noller, H. F. 1981. Gene organization and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. J. Mol. Biol. 148: 107-127.
- Brühl, A., Daims, H., Bauch, H., Schleifer, K.-H. und Wagner, M. 2000. Quantification of signal intensities and abundances of fluorescently labeled bacterial cells by digital image analysis. Biospektrum 6 (Sonderausgabe): 41.

- Bruns, M. A., Fries, M. R., Tiedje, J. M. und Paul, E. A. 1998. Functional gene hybridization patterns of terrestrial ammonia-oxidizing bacteria. *Microb. Ecol.* 36: 293-302.
- Busse, J. 1989. Chemotaxonomische und phylogenetische Charakterisierung von Schadstoffe abbauenden gram-negativen Bakterien. Dissertation, Universität Hannover.
- Burrell, P. C. , Keller, J. und Blackall, L. L. 1998. Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor. *Appl. Environ. Microbiol.* 64: 1878-1883.
- Carter, J. P., Hsiao, Y. H., Spiro, S. und Richardson, D. J. 1995a. Soil and sediment bacteria capable of aerobic nitrate respiration. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2852-2858.
- Carter, J. P., Richardson, D. J. und Spiro, S. 1995b. Isolation and characterization of a strain of *Pseudomonas putida* that can express a periplasmic nitrate reductase. *Arch. Microbiol.* 163: 159-166.
- Castignetti, D. 1990. Bioenergetic examination of the heterotrophic nitrifier-denitrifier *Thiosphaera pantotropha*. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 58: 283-289.
- Castignetti, D., Palutsis, D. und Turley, J. 1990. An examination of proton translocation and energy conservation during heterotrophic nitrification. *FEMS Microbiol. Lett.* 66: 175-182.
- Chang, H. T. und Rittmann, B. E. 1986. Biofilm loss during sample preparation for scanning electron microscopy. *Wat. Res.* 20: 1451-1456.
- Colliver, B. B. und Stephenson, T. 2000. Production of nitrogen oxide and dinitrogen oxide by autotrophic nitrifiers. *Biotechnol. Adv.* 18: 219-232.
- Cooper, T. G. 1980. Biochemische Arbeitsmethoden. De Gruyter, Berlin, New York.
- Crossmann, L. C., Moir, J. W. B., Enticknap, J. J., Richardson, D. J. und Spiro, S. 1997. Heterologous expression of heterotrophic nitrification genes. *Microbiol.* 143: 3775-3783.
- Crossman, L. C., Moir, J. W. B., Spiro, S. und Richardson, D. J. 1998. Heterotrophic nitrification in *Paracoccus denitrificans*. *Biochem. Soc. Trans.* 26: S208.
- D'Ans-Lax. 1967. Taschenbuch für Chemiker und Physiker, 3. Auflage, Band I, Springer, Berlin Heidelberg.
- De Bruijn, P., van de Graaf, A. A., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A und Kuenen, J. G. 1995. Growth of *Nitrosomonas europaea* on hydroxylamine. *FEMS Microbiol. Lett.* 125: 179-184.

- De Ley, J., Cattoir, H. und Reynaerts, A. 1970. The quantitative measurement of DNA hybridization from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12: 133-142.
- De Soete, G. 1983. A least squares algorithm for fitting additive trees to proximity data. *Psychometrika* 48: 621-626.
- Drozd, J. W. 1976. Energy coupling and respiration in *Nitrosomonas europaea*. *Arch. Microbiol.* 110: 257-262.
- DSM. 1993. Catalogue of strains. 5th edition, Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.
- DSMZ. 1996. Catalogue of strains. Supplement 1996. Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH, Braunschweig.
- Einsele, A., Finn, R. K. und Samhaber, W. 1985. Mikrobiologische und biochemische Verfahrenstechnik. VCH, Weinheim.
- Faby, S. 1986. Populationsdynamik von Belebtschlamm-Bakterien in Rein- und Mischkulturen im Chemostaten. Dissertation, Universität Hannover.
- Ferguson, S. J. 1994. Denitrification and its control. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 66: 89-110.
- Flanagan, D. A., Gregory, L. G., Carter, J. P., Karakas-Sen, A., Richardson, D. J. und Spiro, S. 1999. Detection of genes for periplasmic nitrate reductase in nitrate respiring bacteria and in community DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 177: 263-270.
- Foss, S. und Harder, J. 1998. *Thauera linaloolenatis* sp. nov. and *Thauera terpenica* sp. nov., isolated on oxygen-containing monoterpenes (linalool, menthol and eucalyptol) and nitrate. *System. Appl. Microbiol.* 21: 365-373.
- Gernaey, K., Bogaert, H., Massone, A., Vanrolleghem, P. und Verstraete, W. 1997. On-line nitrification monitoring in activated sludge samples with a titrimetric sensor. *Environ. Sci. Technol.* 31: 2350-2355.
- Gillis, M., De Ley, J. und De Cleene, M. 1970. The determination of molecular weight of bacterial genome DNA from renaturation rates. *Eur. J. Biochem.* 12: 143-153.

- Goreau, T. J., Kaplan, W. A., Wofsy, S. C., McElroy, M. B. Valois, F. W. und Watson, S. W. 1980. Production of NO_2^- and N_2O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 526-532.
- Graedel, T. E. und Crutzen, P. J. 1994. *Chemie der Atmosphäre*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Hamzavi, J. 2000. In situ Identifizierung von Ammoniak-oxidierenden Bakterien durch 16S rDNA Hybridisierungstechnik. Diplomarbeit, Universität Hannover.
- Härtig, E. und Zumft, W. G. 1999. Kinetics of *nirS* expression (cytochrome *cd₁* nitrite reductase) in *Pseudomonas stutzeri* during the transition from aerobic respiration to denitrification: Evidence for a denitrification-specific nitrate- and nitrite-responsive regulatory system. *J. Bacteriol.* 181: 161-166.
- Head, I. M., Hiorns, W. D., Embley, T. M., McCarthy, A. J. und Saunders, J. R. 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. Gen. Microbiol.* 139: 1147-1153.
- Hellinga, C., Schellen, A. A. J. C., Mulder, J. W., van Loosdrecht, M. C. M. und Heijnen, J. J. 1998. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich wastewater. *Wat. Sci. Tech.* 37: 135-142.
- Helder, W. und De Vries, R. T. P. 1983. Estuarine nitrite maxima and nitrifying bacteria (Ems-Dollard estuary). *Neth. J. Sea Res.* 17: 1-18.
- Helmer, C. und Kunst, S. 1998. Simultaneous nitrification and denitrification in an aerobic biofilm system. *Wat. Sci. Tech.* 37: 183-187.
- Helmer, C., Kunst, S., Juretschko, S., Schmid, M. C., Schleifer, K.H., Wagner, M. 1999. Nitrogen loss in a nitrifying biofilm system. *Wat. Sci. Tech.* 39: 13-21.
- Henze, M., Harremoës, P., Jansen, J. la Cour und Arvin, E. 1997. *Wastewater treatment*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Heppner, B. 1992. Biologischer Abbau von Propionsäure in einem Labor-Fließbettreaktor. Dissertation, Universität Hannover.
- Hesselsøe, M. und Sørensen, J. 1999. Microcolony formation as a viability index for ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas europaea* and *Nitrospira* sp. *FEMS Microbiol. Ecol.* 28: 383-391.

- Hippen, A., Helmer, C., Scholten, E., Kunst, S., Diekmann, H., Rosenwinkel, K. H., Seyfried, C. F. 1998a. Neue Möglichkeiten der Stickstoffelimination bei Abwässern mit niedrigem C/N-Verhältnis: Aerobe Deammonifikation. Korrespondenz Abwasser 12: 2287-2293.
- Hippen, A., Rosenwinkel, K.-H., Baumgarten, G. und Seyfried, C. F. 1997. Aerobic deammonification: a new experience in the treatment of wastewaters. Wat. Sci. Tech. 35: 111-120.
- Hippen, A., Scholten, E., Helmer, C., Kunst, S., Seyfried, C. F., Rosenwinkel, K. H., Diekmann, H., 1998b. Aerobic deammonification in high nitrogen loaded wastewaters. European conference on new advances in biological nitrogen and phosphorus removal for municipal or industrial wastewaters. Narbonne, France, INRA, S. 43-50.
- Holben, W. E., Noto, K., Sumoni, T. und Suwa, Y. 1998. Molecular analysis of bacterial communities in a three-compartment granular activated sludge system indicates community-level control by incompatible nitrification processes. Appl. Environ. Microbiol. 64: 2528-2532.
- Hooijmans, C. M., Geraats, S. G. M., van Niel, E. W. J., Robertson, L. A., Heijnen, J. J. und Luyben, K. C. A. M. 1990. Determination of growth and coupled nitrification/denitrification by immobilized *Thiosphaera pantotropha* using measurement and modelling of oxygen profiles. Biotechnol. Bioeng. 36: 931-939.
- Hooper, A. B. 1989. Biochemistry of the nitrifying lithoautotrophic bacteria. In: Schlegel, H. G. und Bowien, B. (eds.) Autotrophic bacteria, Brock/Springer series in contemporary bioscience, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 239-265.
- Hooper, A. B., DiSpirito, A. A., Olson, T. C., Anderson, K. A., Cunningham, W. und Taafle, L. R. 1984. Generation of the proton gradient by a periplasmic dehydrogenase. In: Crawford, R. L. und Hanson, R. S. (eds.) Microbial growth on C₁ compounds. American Society for Microbiology, Washington D C, S. 53-58.
- Hooper, A. B., Vannelli, T., Bergmann, D. J. und Arciero, D. M. 1997. Enzymology of the oxidation of ammonia to nitrite by bacteria. Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 71: 59-67.

- Hunik, J. H., Tramper, J. und Wijffels, R. H. 1994. A strategy to scale up nitrification processes with immobilized cells of *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter agilis*. *Bioprocess Eng.* 11: 73-82.
- Huss, V. A. R., Festl, H. und Schleifer, K. H. 1983. Studies on the spectrophotometric determination of DNA hybridization from renaturation rates. *System. Appl. Microbiol.* 4: 184-192.
- Jahnke, M. 1990. Plasmidvermittelte Mineralisierung von aromatischen Sulfonsäuren in *Alcaligenes* sp. 0-1 und Erweiterung der Abbauleistung durch Konjugation im terrestrischen Mikrokosmos. Dissertation, Universität Hannover.
- Jenneman, G. E., Montgomery, A. D. und McInerney, M. J. 1986. Method for detection microorganisms that produce gaseous nitrogen oxides. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 776-780.
- Jetten, M. S. M., Horn, S. J., und van Loosdrecht, M. C. M. 1997a. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *Wat. Sci. Tech.* 35: 171-180.
- Jetten, M. S. M., Logemann, S., Muyzer, G., Robertson, L. A., de Vries, S., van Loosdrecht, M. C. M. und Kuenen, J. G. 1997b. Novel principles in the microbial conversion of nitrogen compounds. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 71: 75-93.
- Jetten, M. S. M., Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Schalk, J., van Dongen, U. G. J. M., van de Graf, A. A., Logemann, S., Muyzer, G., van Loosdrecht, M. C. M. und Kuenen, J. G. 1999. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS Microbiol. Rev.* 22: 421-437.
- Jiang, Q. Q. und Bakken, L. R. 1999. Nitrous oxide production and methane oxidation by different ammonia-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2679-2684.
- Jones, R. W. und Garland, P. B. 1977. Sites and specificity of the reaction of bipyridylum compounds with anaerobic respiratory enzymes of *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 164: 199-211.
- Joo, S.-H., Kim, D.-J., Yoo, I.-K., Park, K. und Cha, G. C. 2000. Partial nitrification in an upflow biological aerated filter by O₂ limitation. *Biotechnol. Lett.* 22: 937-940.
- Jorgensen, B. B., Fossing, H., Wirsen, C. O. und Jannasch, H. W. 1991. Sulfide oxidation in the anoxic Black Sea chemocline. *Deep Sea Res.* 38: 1083-1103.

- Jukes, T. H. und Cantor, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. In: Munro, H. N. (ed.) Mammalian Protein Metabolism, Vol. 3, Academic Press, New York, S. 21-132.
- Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K. H., Pommerening-Röser, A., Koops, H. P. und Wagner, M. 1998. Combined molecular and conventional analysis of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3042-3051.
- Keen, G. A. und Prosser, J. I., 1987. Steady state and transient growth of autotrophic nitrifying bacteria. Arch. Microbiol. 147: 73-79.
- Kerber, N. L. und Cárdenas, J. 1982. Nitrate reductase from *Rhodospseudomonas sphaeroides*. J. Bacteriol. 150: 1091-1097.
- Kloep, F., Röske, I. und Neu, T. R. 2000. Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor. Wat. Res. 34: 311-319.
- Kloos, K., Fesefeldt, A., Gliesche, C. G. und Bothe, H. 1995. DNA-probing indicates the occurrence of denitrification and nitrogen fixation genes in *Hyphomicrobium*. Distribution of denitrifying and nitrogen fixing isolates of *Hyphomicrobium* in a sewage treatment plant. FEMS Microbiol. Ecol. 18: 205-213.
- Knowles, G., Downing, A. L. und Barrett, J. M. 1965. Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture, with the aid of an electronic computer. J. Gen. Microbiol. 38: 263-278.
- Koch, A. L. 1994. Growth Measurement. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. und Krieg, N.R. (eds.) Methods for general and molecular bacteriology, American Society for Microbiology, Washington.
- Koch, G., Egli, K., Van der Meer, J. R. und Siegrist, H. 2000. Mathematical modeling of autotrophic denitrification in a nitrifying biofilm of a rotating biological contactor. Wat. Sci. Tech. 41: 191-198.
- Koops, H. P., Böttcher, B., Möller, U. C., Pommerening-Röser, A. und Stehr, G. 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov.,

Nitrosomonas eutropha sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov. and *Nitrosomonas halophila* sp. nov. J. Gen. Microbiol. 137: 1689-1699.

Koops, H. P. und Möller, U. C. 1992. The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. und Schleifer, K. H. (eds.) The Prokaryotes, 2nd edition, Springer New York, S. 2625-2637.

Körner, H. 1993. Anaerobic expression of nitric oxide reductase from denitrifying *Pseudomonas stutzeri*. Arch. Microbiol. 159: 410-416.

Krul, J. M. 1976. Dissimilatory nitrate and nitrite reduction under aerobic conditions by an aerobically and anaerobically grown *Alcaligenes* sp. and by activated sludge. J. Appl. Bacteriol. 40: 245-260.

Kuai, L. und Verstraete, W. 1998. Ammonium removal by the oxygen-limited autotrophic nitrification-denitrification system. Appl. Environ. Microbiol. 64:4500-4506.

Kuenen, J. G. 1999. Diversity of metabolic pathways. In: Lengeler, J. W., Drews, G. und Schlegel, H. G. (eds.), Biology of Prokaryotes, Thieme, Stuttgart, New York, S. 232-267.

Kuenen, J. G. und Robertson, L. A. 1987. Ecology of nitrification and denitrification. In: Cole, J. A. and Ferguson, S. J. (eds.) The nitrogen and sulphur cycles. Cambridge University Press, S. 161-218.

Kumar, S., Nicholas, D. J. D. und Williams, E. H. 1983. Definitive ¹⁵N NMR evidence that water serves as a source of 'O' during nitrite oxidation by *Nitrobacter agilis*. FEBS Lett. 152: 71-74.

Laanbroek, H. J. und Gerards, S. 1993. Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed continuous cultures. Arch. Microbiol. 159: 453-459.

Lee, N., Nielsen, P. H., Andreasen, K. H., Juretschko, S., Nielsen, J. L., Schleifer, K.-H. und Wagner, M. 1999. Combination of fluorescent in situ hybridization and microautoradiography - a new tool for structure-function analyses in microbial ecology. Appl. Environ. Microbiol. 65: 1289-1297.

Lee, S.-Y., Bollinger, J., Bezdicek, D. und Ogram, A. 1996. Estimation of the abundance of an uncultured soil bacterial strain by a competitive quantitative PCR method. Appl. Environ. Microbiol. 62: 3787-3793.

- Lehmann, H. und Schulz, D. 1982. Die Verwendung der Semisimultan-Fixierung zur Darstellung der Feinstruktur spezieller Mooszellen. *Mikroskopie* 39: 285-291.
- Lester, R. L. und DeMoss, J. A. 1971. Effects of molybdate and selenite on formate and nitrate metabolism in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 105: 1006-1014.
- Linne von Berg, K.-H. und Bothe, H. 1992. The distribution of denitrifying bacteria in soils monitored by DNA-probing. *FEMS Microbiol. Ecol.* 86: 331-340.
- Logemann, S., Schantl, J., Bijvank, S., van Loosdrecht, M., Kuenen, J. G. und Jetten, M. 1998. Molecular microbial diversity in a nitrifying reactor system without sludge retention. *FEMS Microbiol. Ecol.* 27: 239-249.
- Lottstspeich, F. und Zorbas, H. 1998. *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. und Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Ludwig, W., Mittenhuber, G. und Friedrich, C. G. 1993. Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 363-367.
- Lukow, T. 1996. Isolierung und Charakterisierung von heterotrophen Nitrifizierern/aeroben Denitrifizierern. Diplomarbeit, Universität Hannover.
- Lukow, T. und Diekmann, H. 1997. Aerobic denitrification by a newly isolated heterotrophic bacterium strain TL 1. *Biotechnol. Lett.* 19: 1157-1159.
- Macy, J. M., Michel, T. A. und Kirsch, D. G. 1989. Selenate reduction by a *Pseudomonas* species: a new mode of anaerobic respiration. *FEMS Microbiol. Lett.* 61: 195-198.
- Macy, J. M., Rech, S., Auling, G., Dorsch, M., Stackebrandt, E. und Sly, L. I. 1993. *Thauera selenatis* gen. nov., spec. nov., a member of the beta subclass of *Proteobacteria* with a novel type of anaerobic respiration. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 43: 135-142.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. und Parker, J. 2000. *Brock, Biology of Microorganisms*, 9th edition, Prentice-Hall Inc., New Jersey.
- Maidak, B. L., Larsen, N., McCaughey, M. J., Overbeek, R., Olsen, G. J., Fogel, K., Blandy, J. und Woese, C. R. 1994. The ribosomal database project. *Nucleic Acids Res.* 22: 3485-3487.

- Mahne, I. und Tiedje, J. M. 1995. Criteria and methodology for identifying respiratory denitrifiers. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1110-1115.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M. und Schleifer, K. H. 1992. Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15: 593-600.
- Marcinek, J. und Rosenkranz, E. 1996. *Das Wasser der Erde: eine geographische Meeres- und Gewässerkunde*, 2. Auflage, Justus Perthes Verlag Gotha.
- Marmur, J. 1961. A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organisms. *J. Mol. Biol.* 3: 208-218.
- Martins dos Santos, V.A. P., Tramper, J. und Wijffels, R. H. 1999. Integrated nitrogen removal in compact systems by immobilized microorganisms: new generation bioreactors. *Biotechnol. Ann. Rev.* 4: 321-395.
- Mayer, F. 1986. *Cytology and morphogenesis of bacteria*. Gebrüder Borntraeger Berlin Stuttgart.
- McCaig, A. E., Embley, T. M. und Prosser, J. I. 1994. Molecular analysis of enrichment cultures of marine ammonia oxidisers. *FEMS Microbiol. Lett.* 120: 363-368.
- Meiberg, J. B. M., Bruinenberg, P. M. und Harder, W. 1980. Effect of dissolved oxygen tension on the metabolism of methylated amines in *Hyphomicrobium X* in the absence and presence of nitrate: evidence for "aerobic" denitrification. *J. Gen. Microbiol.* 120: 453-463.
- Miller, T. L. und Wolin, M. J. 1974. A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Appl. Microbiol.* 27: 985-987.
- Mobarry, B. K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B. E. und Stahl, D. A. 1996. Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 2156-2162.
- Moir, J. W. B., Crossman, L. C., Spiro, S. und Richardson, D. J. 1996a. The purification of ammonia monooxygenase from *Paracoccus denitrificans*. *FEBS Lett.* 387: 71-74.
- Moir, J. W. B., Wehrfritz, J.-M., Spiro, S. und Richardson, D. J. 1996b. The biochemical characterization of a novel non-haem-iron hydroxylamine oxidase from *Paracoccus denitrificans* GB17. *Biochem. J.* 319: 823-827.

- Moreno-Vivián, C. und Ferguson, S. J. 1998. Definition and distinction between assimilatory, dissimilatory and respiratory pathways. *Mol. Microbiol.* 29: 664-666.
- Mudrack, K. und Kunst, S. 1997. *Biologie der Abwasserreinigung*, 4. Auflage, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.
- Mulder, A., van de Graaf, A. A., Robertson, L. A. und Kuenen, J. G. 1995. Anaerobic ammonium oxidation discovered in a denitrifying fluidized bed reactor. *FEMS Microbiol. Ecol.* 16: 177-184.
- Mulder, J. W. und Kempen van, R. März/April 1997. N-removal by SHARON. *Wat. Qual. Int.* 30-31.
- Murray, J. W., Jannash, H. W., Honjo, S., Anderson, R. F., Reeburgh, W. S., Top, Z., Friederich, G. E., Lodispoti, L. A. und Izdar, E. 1989. Unexpected changes in the oxic/anoxic interface in the Black Sea. *Nature (Lond)* 338: 411-413.
- Neef, A., Amann, R., Schlesner, H. und Schleifer, K. H. 1998. Monitoring a widespread bacterial group: in situ detection of planctomyces with 16S rRNA-targeted probes. *Microbiology (Reading)* 144: 3257-3266.
- Nielsen, P. H., Andreasen, K., Lee, N. und Wagner, M. 1999. Use of microautoradiography and fluorescent in situ hybridization for characterization of microbial activity in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 39: 1-9.
- Noggle, J. H. 1993. *Practical curve fitting and data analysis*. PTR Prentice-Hall, Englewood Cliffs, New Jersey.
- Nyhuis, G. 1985. Beitrag zu den Möglichkeiten der Abwasserbehandlung bei Abwässern mit erhöhten Stickstoffkonzentrationen. Veröffentlichungen des Institutes für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik der Universität Hannover, Heft 61.
- Oerther, D. B., de los Reyes, F. L. und Raskin, L. 1999. Interfacing phylogenetic oligonucleotide probe hybridizations with representations of microbial populations and specific growth rates in mathematical models of activated sludge processes. *Wat. Sci. Tech.* 39: 11-20.
- Okabe, S., Satoh, H. und Watanabe, Y. 1999. In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3182-3191.

- O'Kelly, J. C., Becker, G. E. und Nason, A. 1970. Characterisation of the particulate nitrite oxidase and its component activities from the chemoautotroph *Nitrobacter agilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 205: 409-425.
- Ostle, A. G. und Holt, J. G. 1982. Nile blue A as a fluorescent stain for poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 238-241.
- Otte, S., Schalk, J., Kuenen, J. G. und Jetten, M. S. M. 1999. Hydroxylamine oxidation and subsequent nitrous oxide production by the heterotrophic ammonia oxidizer *Alcaligenes faecalis*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 255-261.
- Ottow, J. C. G. und Fabig, W. 1984. Einfluß der Sauerstoffbegasung auf die Denitrifikationsintensität (aerobe Denitrifikation) und das Redoxniveau unterschiedlicher Bakterien. *Landwirtsch. Forsch. Sonderheft* 41: 453-470.
- Ouverney, C. C. und Fuhrmann, J. A. 1999. Combined microautoradiography-16S rRNA probe technique for determination of radioisotope uptake by specific microbial cell types in situ. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 1746-1752.
- Pfennig, N. und Trüper, H. G. 1981. Isolation of members of the families Chromatiaceae and Chlorobiaceae. In: Starr, M., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A. und Schlegel, H. G. (eds.) *The Prokaryotes*, 1st edition, Volume 1, Springer, Berlin, Heidelberg, New York, S. 279-289.
- Plattner, H. 1973. Die Entwässerung und Einbettung biologischer Objekte für die Elektronenmikroskopie. In: Schimmel, G. und Vogel, W. (Hrsg.) *Methodensammlung der Elektronenmikroskopie*. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart, 61-66.
- Poth, M. 1986. Dinitrogen production from nitrite by a *Nitrosomonas* isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 957-959.
- Poth, M. und Focht, D. D. 1985. ^{15}N kinetic analysis of N_2O production by *Nitrosomonas europaea*: an examination of nitrifier denitrification. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1134-1141.
- Potter, L., Thomas, G. und Cole, J. 1998. Nitrate reduction to ammonium: major new roles for periplasmic nitrate and nitrite reductases. European conference on new advances in biological nitrogen and phosphorus removal for municipal or industrial wastewaters. Narbonne, France, INRA, S. 103-110.

- Poulsen, L. K., Ballard, G. und Stahl, D. A. 1993. Use of rRNA Fluorescence in situ Hybridization for measuring the activity of single cells in young and established biofilms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1354-1360.
- Prakasam, T. S. B. und Loehr, R. C. 1972. Microbial nitrification and denitrification in concentrated wastes. *Wat. Res.* 6: 859-869.
- Prosser, J. I. 1989. Autotrophic nitrification in bacteria. *Adv. Microb. Physiol.* 30: 125-181.
- Provence, D. L. und Curtiss, R. 1994. Gene transfer in gramnegative bacteria. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. und Krieg, N. R. (eds.) *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington D C, S. 317-347.
- Prudêncio, M., Eady, R. R. und Sawers, G. 1999. The blue copper-containing nitrite reductase from *Alcaligenes xylosoxidans*: cloning of the *nirA* gene and characterization of the recombinant enzyme. *J. Bacteriol.* 181: 2323-2339.
- Rabus, R. und Widdel, F. 1995. Anaerobic degradation of ethylbenzene and other aromatic hydrocarbons by new denitrifying bacteria. *Arch. Microbiol.* 163: 96-103.
- Rabus, R., Wilkes, H., Schramm, A., Harms, G., Behrends, A., Amann, R. und Widdel, F. 1999. Anaerobic utilization of alkylbenzenes and n-alkanes from crude oil in an enrichment culture of denitrifying bacteria affiliating with the β -subclass of Proteobacteria. *Environ. Microbiol.* 1: 145-157.
- Rainey, F. A., Kelly, D. P., Stackebrandt, E., Burghardt, J., Hiraishi, A., Katayama, Y. und Wood, A. P. 1999. A re-evaluation of the taxonomy of *Paracoccus denitrificans* and a proposal for the combination *Paracoccus pantotrophus* comb. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 49: 645-651.
- Rainey, F. A., Ward-Rainey, N., Kroppenstedt, R. M. und Stackebrandt, E. 1996. The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage: proposal of *Nocardiopsaceae* fam. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 46: 1088-1092.
- Rahmani, H., Rols, J. L., Capdeville, B., Cornier, J. C. und Deguin, A. 1995. Nitrite removal by a fixed culture in a submerged granular biofilter. *Wat. Res.* 29: 1745-1753.
- Ramadori, R., Rozzi, A und Tandoi, V. 1980. An automated system for monitoring the kinetics of biological oxidation of ammonia. *Wat. Res.* 14: 1555-1557.

- Rasmussen, K. A. und Khalil, M. A. K. 1986. Atmospheric trace gases: trends and distributions over the last decade. *Science (Wash D C)* 232: 1623-1624.
- Remde, A. und Conrad, R. 1990. Production of nitrate oxide in *Nitrosomonas europaea* by reduction of nitrate. *Arch. Microbiol.* 154: 187-191.
- Remsen, C. C., Valois, F. W. und Watson, S. W. 1967. Fine structure of the cytomembranes of *Nitrocystis oceanus*. *J. Bacteriol.* 94: 422-433.
- Reynolds, E. S. 1963. The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. *J. Cell Biol.* 17: 208-212.
- Rhee, S.-K., Lee, J. J., Lee, S. T. 1997. Nitrite accumulation in a sequencing batch reactor during the aerobic phase of biological nitrogen removal. *Biotechnol. Lett.* 19: 195-198.
- Richards, G. M. 1974. Modifications of the diphenylamine reaction giving increased sensitivity and simplicity in the estimation of DNA. *Anal. Biochem.* 57: 369-376.
- Robertson, L. A. 1988. Aerobic denitrification and heterotrophic nitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. PhD thesis, University of Technology, Delft, Holland.
- Robertson, L. A. und Kuenen, J. G. 1983. *Thiosphaera pantotropha* gen. nov. sp. nov., a facultatively anaerobic, facultatively autotrophic sulphur bacterium. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2847-2855.
- Robertson, L. A. und Kuenen, J. G. 1984. Aerobic denitrification: a controversy revived. *Arch. Microbiol.* 139: 351-354.
- Robertson, L. A. und Kuenen, J. G. 1990. Combined heterotrophic nitrification and aerobic denitrification in *Thiosphaera pantotropha* and other bacteria. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 57: 139-152.
- Robertson, L. A., van Niel, E. W. J., Torremans, R. A. M. und Kuenen, J. G. 1988. Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2812-2818.
- Robinson, R. W., Akin, D. E., Nordstedt, R. A., Thomas, M. V. und Aldrich, H. C. 1984. Light and electron microscopic examinations of methane-producing biofilms from anaerobic fixed-bed reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 127-136.

- Roldán, M. D., Reyes, F., Moreno-Vivián, C. und Castillo, F. 1994. Chlorate and nitrate reduction in the phototrophic bacteria *Rhodobacter capsulatus* and *Rhodobacter sphaeroides*. *Curr. Microbiol.* 29: 241-245.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning*. Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Schalk, J., Oustad, H., Kuenen, J. G. und Jetten, M. S. M. 1998. The anaerobic oxidation of hydrazine: a novel reaction in microbial nitrogen metabolism. *FEMS Microbiol. Lett.* 158: 61-67.
- Schalk-Otte, S., Seviour, R. J., Kuenen, J. G. und Jetten, M. S. M. 2000. Nitrous oxide (N₂O) production by *Alcaligenes faecalis* during feast and famine regimes. *Wat. Res.* 34: 2080-2088.
- Schlegel, H. G. 1992. *Allgemeine Mikrobiologie*, 7. Auflage, Thieme, Stuttgart.
- Schlesner, H. 1994. The development of media suitable for the microorganisms morphologically resembling *Planctomyces* spp., *Pirellula* spp., and other Planctomycetales from various aquatic habitats using dilute media. *System. Appl. Microbiol.* 17: 135-145.
- Schlesner, H. und Stackebrandt, E. 1986. Assignment of the genera *Planctomyces* and *Pirella* to a new family Planctomycetaceae fam. nov. and description of the order Planctomycetales ord. nov. *System. Appl. Microbiol.* 8: 174-176.
- Schmid, M., Twachtmann, U., Klein, M., Strous, M., Juretschko, S., Jetten, M. S. M., Metzger, J. W., Schleifer, K.-H. und Wagner, M. 2000. Molecular evidence for genus level diversity of bacteria capable of catalyzing anaerobic ammonium oxidation. *System. Appl. Microbiol.* 23: 93-106.
- Schmidt, I. 1997. *Anaerobe Ammoniakoxidation von Nitrosomonas eutropha*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Schmidt, I. und Bock, E. 1997. Anaerobic ammonia oxidation with nitrogen dioxide by *Nitrosomonas eutropha*. *Arch. Microbiol.* 167: 106-111.
- Schmidt, I. und Bock, E. 1998. Anaerobic ammonia oxidation by cell-free extracts of *Nitrosomonas eutropha*. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 73: 271-278.
- Schmidt, I., Zart, D., Stüven, R., Bock, E., und Appelbaum, S. 1999. Einsatz eines neuartigen einstufigen Verfahrens zur Stickstoffeliminierung in Abwasser. *Korrespondenz Abwasser* 46: 928-934.

- Scholten, E., Lukow, T., Auling, G., Kroppenstedt, R. M., Rainey, F. A. und Diekmann, H. 1999. *Thauera mechernichensis* sp. nov., an aerobic denitrifier from a leachate treatment plant. Int. J. Syst. Bacteriol. 49: 1045-1051.
- Schramm, A., de Beer, D., van de Heuvel, J. C., Ottengraf, S. und Amann, R. 1999. Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors. App. Environ. Microbiol. 65: 3690-3696.
- Schramm, A., de Beer, D., Wagner, M. und Amann, R. 1998. Identification and activities in situ of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor. Appl. Environ. Microbiol. 64: 3480-3485.
- Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P. und Amann, R. 1997. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by microelectrodes and fluorescent oligonucleotide probes. Wat. Sci. Tech. 36: 263-270.
- Schramm, A., Larsen, L. H., Revsbech, N. P., Ramsing, N. B., Amann, R. und Schleifer, K. H. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4641-4647.
- Sears, H. J., Spiro, S. und Richardson, D. J. 1997. Effect of carbon substrate and aeration on nitrate reduction and expression of the periplasmic and membrane-bound nitrate reductases in carbon-limited continuous cultures of *Paracoccus denitrificans* Pd 1222. Microbiology (Reading) 143: 3767-3774.
- Seyfried, C.-F. 1987. Studie zur Sickerwasserreinigung der Deponie Mechernich durch ein kombiniertes biologisch-physikalisches Verfahren, Hannover, unveröffentlicht (zitiert nach Baumgarten und Seyfried, 1996).
- Siegrist, H. und Gujer, W. 1987. Demonstration of mass transfer and pH effects in a nitrifying biofilm. Wat. Res. 21: 1481-1487.
- Siegrist, H., Reithaar, S. und Lais, P. 1998. Nitrogen loss in a nitrifying rotating contactor treating pretreated leachate without organic carbon. Wat. Sci. Tech. 37: 589-591.
- Skinner, F. A. und Walker, N. 1961. Growth of *Nitrosomonas europaea* in batch and continuous culture. Arch. Microbiol. 38: 339-349.

- Smibert, R. M. und Krieg, N. R. 1994. Phenotypic characterization. In: Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. und Krieg, N. R. (eds.) *Methods for general and molecular bacteriology*, American Society for Microbiology, Washington D C, S. 607-654.
- Spieck, E. und Bock, E. 1998. Taxonomische, physiologische und ökologische Vielfalt nitrifizierender Bakterien. *Biospektrum* 4: 25-31.
- Stackebrandt, E. und Goebel, B. M. 1994. Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44: 846-849.
- Stackebrandt, E. und Liesack, W. 1993. Nucleic acids and classification. In: Goodfellow, C. und O'Donnell, A. G. (eds.) *Handbook of new bacterial systematics*, Academic Press, London, S. 151-194.
- Staley, J. T., Fuerst, J. A., Giovanni, S. und Schlesner, H. 1992. The order Planctomycetales and the genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata*, and *Isosphaera*. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, H., Harder, W. und Schleifer, K.-H. (eds.). *The Prokaryotes*, 2nd edition, Volume 4, Springer, New York, S. 3710-3731.
- Stanier, R. Y., Ingraham, J. L., Wheelis, M. L. und Painter, P. R. 1986. *The Microbial World*, 5th Edition, Prentice-Hall, New Jersey.
- Starr, M. P. und Schmidt, J. M. 1981. Prokaryotes diversity. In: Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A. und Schlegel, H. G. (eds.) *The Prokaryotes*, 1st edition, Volume 1, Springer, New York, S. 3-42.
- Stouthamer, A. 1992. Metabolic pathways in *Paracoccus denitrificans* and closely related bacteria in relation to the phylogeny of prokaryotes. *Antonie Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol.* 61: 1-33.
- Strous, M., Fuerst, J. A., Kramer, E. H. M., Logemann, S., Muyzer, G., van de Pas-Schoonen, K. T., Webb, R., Kuenen, J. G. und Jetten, M. S. M. 1999a. Missing lithotroph identified as new planctomycete. *Nature (Lond)* 400: 446-449.
- Strous, M., Heijnen, J. J., Kuenen, J. G. und Jetten, M. S. M. 1998. The sequencing batch reactor as a powerful tool for the study of slowly growing anaerobic ammonium-oxidizing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 589-596.

- Strous, M., Kuenen, J. G. und Jetten, M. S. M. 1999b. Key physiology of anaerobic ammonium oxidation. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 3248-3250.
- Strous, M., van Gerven, E., Kuenen, J. G. und Jetten, M. 1997. Effects of aerobic and microaerobic conditions on anaerobic ammonium oxidizing (anammox) sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 2446-2448.
- Strous, M., van de Pas-Schoonen, K. T., Kramer, E. H. M., Raghoebarsing, A., Muyzer, G., Wagner, M., Kuenen, J. G. und Jetten, M. S. M. 2000. New planctomycete responsible for the anaerobic ammonium oxidation (Anammox) process, eingereicht (zitiert nach Schmid et al., 2000).
- Tappe, W., Tomaschewski, C., Ritterhaus, S. und Groeneweg, J. 1996. Cultivation of nitrifying bacteria in the retentostat, a simple fermenter with internal biomass retention. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19: 47-52.
- Thorneley, R. N. F. 1974. A convenient electrochemical preparation of reduced methyl viologen and a kinetic study of reaction with oxygen using an anaerobic stopped-flow apparatus. *Biochim. Biophys. Acta* 333: 487-496.
- Tschech, A. und Fuchs, G. 1987. Anaerobic degradation of phenol by pure cultures of newly isolated denitrifying pseudomonads. *Arch. Microbiol.* 148: 213-217.
- Turk, O. und Mavnic, D. S. 1989. Maintaining nitrite build-up in a system acclimated to free ammonia. *Wat. Res.* 23: 1383-1388.
- Twachtmann, U. 2000. Autotrophe Stickstoffelimination in Tropfkörpern. Dissertation, Universität Stuttgart.
- Utåker, J. B., Bakken, L., Jiang, Q. Q. und Nes, I. F. 1995. Phylogenetic analysis of seven new isolates of ammonia-oxidizing bacteria based on 16S rRNA gene sequences. *System. Appl. Microbiol.* 18: 549-559.
- van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M. und Kuenen, J. G. 1996. Autotrophic growth of anaerobic ammonium-oxidizing micro-organisms in a fluidized bed reactor. *Microbiology (Reading)* 142: 2187-2196.
- van de Graaf, A. A., de Bruijn, P., Robertson, L. A., Jetten, M. S. M. und Kuenen, J. G. 1997. Metabolic pathway of anaerobic ammonium oxidation on the basis of ¹⁵N studies in a fluidized bed reactor. *Microbiology (Reading)* 143: 2415-2421.

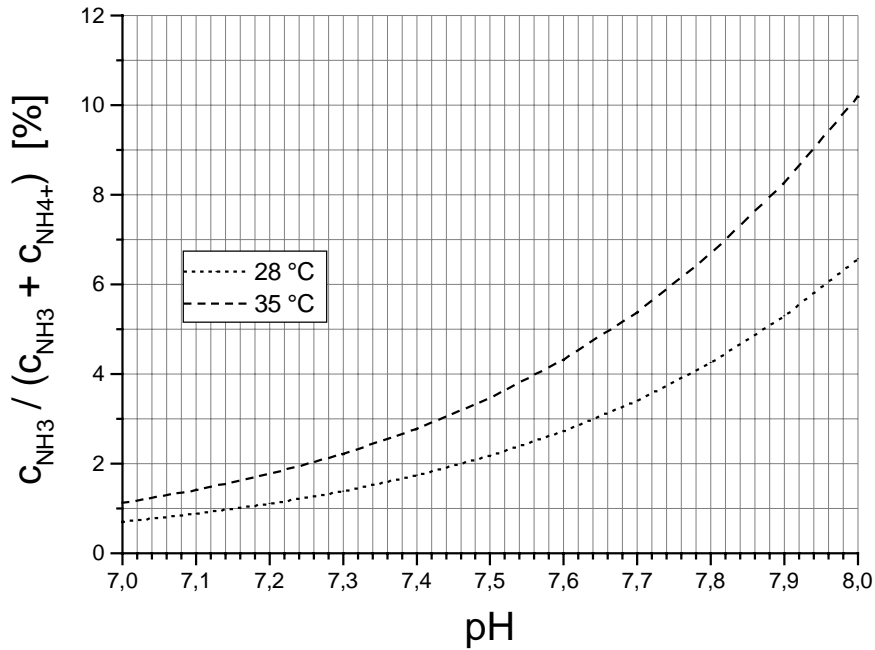
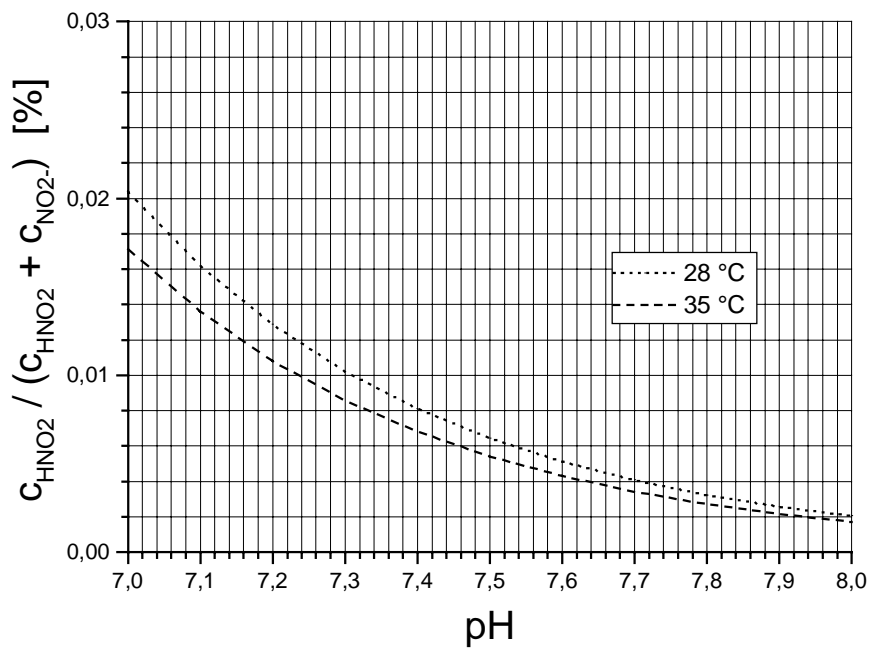
- van de Graaf, A. A., Mulder, A., de Bruijn, P., Jetten, M. S. M., Robertson, L. A. und Kuenen, J. G. 1995. Anaerobic oxidation of ammonium is a biologically mediated process. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1246-1251.
- van de Graaf, A. A., Mulder, A., Slijkhuys, H., Robertson, L. A. und Kuenen, J. G. 1990. Anoxic ammonium oxidation. In: Christiansen, C., Munck, L., Villadsen, J. (eds.) Proceedings of the 5th European Congress on Biotechnology, European Federation for Biotechnology, Munkgaard, Kopenhagen, S. 388-391.
- van Loosdrecht, M. C. M. und Jetten, M. S. M. 1997. Method for treating ammonia-comprising wastewater. PCT/NL97/00482.
- van Niel, E. W. J., Arts, P. A. M., Wesselink, B. J., Robertson, L. A. und Kuenen, J. G. 1993. Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonia in chemostat cultures. *FEMS Microbiol. Ecol.* 102: 109-118.
- Verstraete, W. und Alexander, M. 1972. Heterotrophic nitrification by *Arthrobacter* sp. *J. Bacteriol.* 110: 955-961.
- Verstraete, W. 1975. Heterotrophic nitrification in soils and aqueous media. *Izvestija Akademii Nauk SSSR Serija Biologiceskih* 4: 541-558 (zitiert nach Kuenen und Robertson, 1987).
- Vishniac, W. und Santer, M. 1957. The *Thiobacilli*. *Bacteriol. Rev.* 21: 195-213.
- Wagner, M. und Amann, R. 1996. Die Anwendung von *in situ*-Hybridisierungssonden zur Aufklärung von Struktur und Dynamik der mikrobiellen Biozönosen in der Abwasserreinigung. In: Lemmer, H., Griebe, T. und Flemming, H.-C. (eds.) *Ökologie der Abwasserorganismen*, Springer, Berlin Heidelberg, S. 93-110.
- Wagner, M., Amann, R., Lemmer, H. und Schleifer, K.-H. 1993. Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1520-1525.
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Ammann, R., Lemmer, H., Wedi, D. und Schleifer, K.-H. 1994. Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 792-800.

- Wagner, M., Nielsen, P. H., Schmid, M., Purkhold, U., Daims, H., Juretschko, S., Lee, N. und Schleifer, K.-H. 1998. New insights in the structure and function of microbial populations active in biological nitrogen removal plants: *Nitrosococcus mobilis*, *Nitrospira*-like bacteria and *Azoarcus* sp. as dominant populations. European conference on new advances in biological nitrogen and phosphorus removal for municipal or industrial wastewaters. Narbonne, France, INRA, S. 43-50.
- Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H. P. und Schleifer, K. H. 1995. *In situ* identification of ammonia-oxidizing bacteria. *System. Appl. Microbiol.* 18: 251-264.
- Wagner, M., Rath, G., Koops, H. P., Flood, J. und Amann, R. 1996. *In situ* analysis of nitrifying bacteria in sewage treatment plants. *Wat. Sci. Tech.* 34: 237-244.
- Ward, B. B., Martino, D. P., Diaz, M. C. und Joye, S. B. 2000. Analysis of ammonia-oxidizing bacteria from hypersaline Mono Lake, California, on the basis of 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2873-2881.
- Watanabe, Y., Okabe, S., Hirata, K. und Masuda, S. 1995. Simultaneous removal of organic materials and nitrogen by micro-aerobic biofilms. *Wat. Sci. Tech.* 31: 195-203.
- Watson, M. L. 1958. Staining of tissue sections for electron microscopy with heavy metals. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4: 475-478.
- Watson, S. W., Valois, F. W. und Waterbury, J. B. 1981. The family Nitrobacteriaceae. In: Starr, M. P., Stolp, H., Trüper, H. G., Balows, A. und Schlegel, H. G. (eds.) *The Prokaryotes*, 1st edition, Volume 1, Springer New York, S. 1005-1022.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P. A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P. und Trüper, H. G. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 37: 463-464.
- Wehrfritz, J.-M., Reilly, A., Spiro, S. und Richardson, D. J. 1993. Purification of hydroxylamine oxidase from *Thiosphaera pantotropha*. Identification of electron acceptors that couple heterotrophic nitrification to aerobic denitrification. *FEBS Lett.* 335: 246-250.
- Whittaker, M., Bergmann, D., Arciero, D. und Hooper, A. B. 2000. Electron transfer during the oxidation of ammonia by the chemolithotrophic bacterium *Nitrosomonas europaea*. *Biochim. Biophys. Acta* 1459: 346-355.

- Widdel, F. und Bak, F. 1992. Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, H., Harder, W. und Schleifer, K.-H. (eds.). The Prokaryotes, 2nd edition, Volume 4, Springer, New York, S. 3352-3378.
- Willison, J. C. 1990. Derivatives of *Rhodobacter capsulatus* strain AD2 cured of their endogenous plasmid are unable to utilize nitrate. FEMS Microbiol. Lett. 66: 23-28.
- Wilson, K. und Walker, J. M. 1994. Principles and techniques of practical biochemistry. 4th edition, Cambridge University Press.
- Yoo, H., Ahn, K. H., Lee, H. J., Lee, K. H., Kwak, Y. J. und Song, K. G. 1999. Nitrogen removal from synthetic wastewater by simultaneous nitrification and denitrification (snd) via nitrite in an intermittently-aerated reactor. Wat. Res. 33: 145-154.
- Zarda, B., Hahn, D., Chatzinotas, A., Schönhuber, W., Neef, A., Amann, R. I. und Zeyer, J. 1997. Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization. Arch. Microbiol. 168: 185-192.
- Zart, D. 1997. Entwicklung eines Verfahrens zur Entfernung von Ammonium-Stickstoff mit Hilfe einer Reinkultur von *Nitrosomonas eutropha*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Zart, D. und Bock, E. 1998. High rate of aerobic nitrification and denitrification by *Nitrosomonas eutropha* grown in a fermentor with complete biomass retention in the presence of gaseous NO₂ or NO. Arch. Microbiol. 169: 282-286.
- Zart, D., Schmidt, I. und Bock, E. 1996. Neue Wege vom Ammonium zum Stickstoff. In: Lemmer, H., Griebe, T. und Flemming, H.-C. (eds.) Ökologie der Abwasserorganismen, Springer, Berlin Heidelberg, S. 183-192.
- Zart, D., Schmidt, I. und Bock, E. 1998. Innovation in der Abwasserreinigung. Bioforum 3: 94-97.
- Zumft, W. G. 1992. The denitrifying prokaryotes. In: Balows, A., Trüper, H. G., Dworkin, M., Harder, W. and Schleifer, K.-H. (eds.) The Prokaryotes, 2nd edition, Volume 1, Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Zumft, W. G. 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 61: 533-616.

Anhang

Die Berechnung der Gleichgewichte erfolgte mit den bei ANTHONIESEN et al. (1976) angegebenen Gleichungen, die Darstellung in Anlehnung an ABELING (1994).

A1 Dissoziationsgleichgewicht $\text{NH}_3 - \text{NH}_4^+$ **A2 Dissoziationsgleichgewicht $\text{HNO}_2 - \text{NO}_2^-$** 

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und die benutzten Hilfsmittel sowie die zu Hilfeleistungen herangezogenen Institutionen vollständig angegeben habe.

Die vorliegende Arbeit ist nicht als Diplomarbeit oder sonstige Prüfungsarbeit verwendet worden.

Danksagungen

Prof. Dr. H. Diekmann danke ich für die Überlassung des Themas und die sehr gute Betreuung. Seine Gesprächsbereitschaft, Kritik und Offenheit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Prof. Dr. T. Scheper gilt mein Dank für die Übernahme der Gutachtertätigkeit.

Prof. Dr. G. Auling danke ich für die Unterstützung bei Fragen zur Taxonomie.

Prof. Dr.-Ing. C.-F. Seyfried, Prof. Dr.-Ing. K.-H. Rosenwinkel, Prof. Dr. Dr.-Ing. S. Kunst, Dr.-Ing. C. Helmer und insbesondere Anke Hippen danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des gemeinsamen Projekts.

Prof. Dr. F. A. Rainey (Louisiana State University, Baton Rouge, USA) danke ich für die Durchführung der 16S rDNA-Analysen.

Prof. Dr. H. Lehmann und Ulrike Kunz (Institut für Tierökologie und Zellbiologie der Tierärztlichen Hochschule Hannover) sei gedankt für die theoretische und praktische Unterstützung bei den transmissionselektronenmikroskopischen Untersuchungen.

PD Dr. B. Hitzmann (Institut für Technische Chemie der Universität Hannover) danke ich für seinen Rat bei der Auswertung der Pulsexperimente.

Dr. S. Stubner (Max-Planck-Institut für Terrestrische Mikrobiologie, Marburg) und Dr. S. Bartosch (Institut für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg) danke ich für ihre Unterstützung bei meinen ersten FISH-Experimenten.

Markus Schmid (Lehrstuhl für Mikrobiologie der TU München) danke ich für die Durchführung der FISH-Kontrollexperimente.

Jafar Hamzavi danke ich für die Durchführung der FISH-Experimente, Nicole Köstler für die vielen mit größter Sorgfalt durchgeführten Analysen und Sandra Schulze für Herstellung der Kulturmedien. Allen dreien danke ich für die gute Zusammenarbeit im Labor 009.

Auch Claudia Wichmann sei für ihre Analysen gedankt.

Armgard Janczikowski danke ich für die Anfertigung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen. Inge Reupke danke ich für die Anreicherung autotropher Nitrifizierer.

Dr. H. Plattner und Michael Schubert sei gedankt für ihre Hilfsbereitschaft in Rat und Tat.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei allen jetzigen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts für Mikrobiologie für die freundschaftliche Atmosphäre.

Für ihre Unterstützung danke ich auch meiner Familie und Claudia, die verständnisvoll Rücksicht auf meine bisweilen angespannte Stimmung nahm.

LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

Name	Edzard Scholten
Geburtsdatum/-ort	23.12.1968 in Mülheim/Ruhr
Familienstand	ledig

SCHULBILDUNG:

08/1975-07/1979	Grundschule in Solingen
08/1979-06/1985	Gymnasium in Solingen
08/1985-05/1988	Gymnasium in Leverkusen-Opladen
05/1988	Abitur

ZIVILDIENST:

07/1988-02/1990	Pflegehelfer im Städtischen Krankenhaus Solingen
-----------------	--

STUDIUM:

10/1990	Beginn des Studiums der Biotechnologie an der TU Braunschweig
10/1992	Vordiplom
05/1995	Mündliche Prüfung zum Hauptdiplom
07/1995-03/1996	Diplomarbeit am Rheinisch-Westfälischen Institut für Wasserchemie und Wassertechnologie in Mülheim/Ruhr mit dem Thema: „Anwendbarkeit der in vivo Esterasenaktivität als Testsystem für biologischen Abbau in Aktivkohlefiltern der Trinkwasseraufbereitung“
03/1996	Abschluß des Studiums mit dem Grad „Diplom -Biotechnologe“
09/1996-01/1997	Tätigkeit am UFZ-Umweltforschungszentrum Leipzig-Halle GmbH, Sektion Umweltmikrobiologie
02/1997-05/2000	Durchführung der experimentellen Arbeiten zur vorliegenden Dissertation