

Abschlussbericht
für das Forschungsprojekt

**Mikrosensorsysteme zur Bestimmung
nitrifikationshemmender Effekte
in Abwässern**

gefördert durch die Deutsche Bundesstiftung Umwelt

Förderkennzeichen: Az. 14699

Projektlaufzeit: 01.08.1999 – 29.02.2002

Projektleiter: Prof. Dr. rer. nat. habil. Jörg W. Metzger

Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft der
Universität Stuttgart (ISWA), Abteilung Hydrochemie, Bandtäle 2, 70569
Stuttgart-Büsnau

Projektpartner:

Institut für Technische Biochemie der Universität Stuttgart (ITB)

Prof. Dr. Rolf D. Schmid

Allmandring 31, 70569 Stuttgart-Vaihingen

Energy-of-nature Projektgesellschaft für umwelttechnische Anlagensys-
teme Leipzig mbH

Friedrich-Ebert-Straße 33, 04109 Leipzig

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Grundlagen der Nitrifikation.....	1
1.2	Bedeutung der Nitrifikation bei der Abwasserbehandlung.....	1
1.3	Nitrifikationshemmung bei der Abwasserbehandlung.....	2
1.4	Grundlagen des N-BSB.....	2
1.5	Biosensoren	3
1.5.1	Allgemeines Funktionsprinzip.....	3
1.5.2	Allgemeine Eigenschaften von Biosensoren	3
1.5.3	Mikrobielle Biosensoren	3
1.6	Siebdrucktechnik – ein Verfahren zur Miniaturisierung	
	von Sensorsystemen.....	4
1.7	Anlass und Zielsetzung des Forschungsvorhabens	5
2	Material und Methoden	7
2.1	Herstellung der Sauerstofftransducer.....	7
2.1.1	Transducerbasis.....	7
2.1.2	Aufbringung des Elektrolyten und der sauerstoff- permeablen Membran	9
2.1.3	Elektrodenreaktionen	10
2.2	Kultivierung von Nitrifikantenmischkulturen.....	11
2.3	Immobilisierung der Nitrifikantenmischkulturen in PVA-SbQ.....	12
2.4	Laborgerät.....	13
2.5	Messmethodik	14
2.5.1	Bestimmung nitrifizierbarer Verbindungen	14
2.5.2	Bestimmung nitrifikationshemmender Effekte	18
3	Ergebnisse und Diskussion	21
3.1	Charakterisierung der Sauerstoffdickschichtelektroden	21
3.1.1	Strom-Spannungs-Kennlinie	21
3.1.2	Equilibrierungsverhalten der Sauerstofftransducer.....	22
3.1.3	Dynamisches Verhalten der Sauerstofftransducer.....	22
3.1.4	Kalibrierung der Sauerstoffelektroden.....	24
3.1.5	Betriebsstabilität.....	25
3.2	Immobilisierung nitrifizierender Mikroorganismen	25
3.2.1	Test verschiedener Polymere.....	26

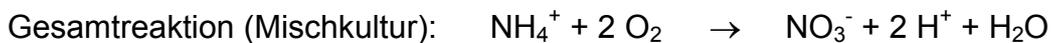
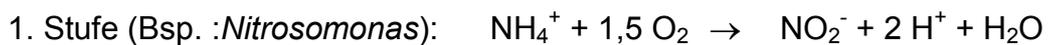
3.3	Bestimmung nitrifizierbarer Verbindungen – der N-BSB	27
3.3.1	Quantifizierung von Ammonium	27
3.3.2	Quantifizierung von Harnstoff und Nitrit	29
3.3.3	Nitrifizierbarkeit von Aminosäuren.....	31
3.3.4	Nitrifizierbarkeit von Abwasserinhaltsstoffen	35
3.4	Bestimmung nitrifikationshemmender Effekte	36
3.4.1	Untersuchungen mit ATH.....	36
3.4.1.1	Sensitivität und Reproduzierbarkeit	36
3.4.1.2	Lagerungsstabilität.....	38
3.4.1.3	Betriebsparameter des Biosensormesssystems	40
3.4.2	Bestimmung der nitrifikationshemmenden Wirkung von Umweltchemikalien und realen Abwasserproben – Vergleichsuntersuchungen mit dem Biosensorsystem	
	und der Methode nach EN ISO 9509	42
3.4.3	Reinsubstanzen und Substanzgemische	42
3.4.4	Reale Abwasserproben.....	47
3.4.5	Zusammenfassende Bewertung der Vergleichsuntersuchungen	49
4	Zusammenfassung.....	50
5	Verwertungsaussichten	52
6	Abbildungsverzeichnis	53
7	Tabellenverzeichnis	56
8	Literaturverzeichnis	57

1 Einleitung

1.1 Grundlagen der Nitrifikation

In gut durchlüfteten Systemen unterliegt Ammonium der Nitrifikation durch Bakterien wie z. B. *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira* und *Nitrobacter*. Diese Mikroorganismengattungen führen im Zuge einer zweistufigen Reaktion gemeinsam die Oxidation von Ammonium über das Zwischenprodukt Nitrit (Nitritation) zu Nitrat (Nitratation) durch. Da diese Reaktionen in erster Linie an die Tätigkeit der autotrophen nitrifizierenden Mikroorganismen gebunden ist, kommt dieser Bakteriengruppe eine Art Monopolstellung zu [1,2]. Wenngleich mittlerweile noch eine Reihe weiterer biologischer Prozesse (z.B. heterotrophe Nitrifikation) sowie auch photochemischer Vorgänge zur Durchführung dieser Reaktion bekannt sind, so spielen diese im natürlichen Kreislauf im Vergleich zur biologischen, autotrophen Nitrifikation lediglich eine untergeordnete Rolle [3].

Grundgleichungen der autotrophen Nitrifikation:



1.2 Bedeutung der Nitrifikation bei der Abwasserbehandlung

Stickstoffverbindungen sind mengenmäßig nach den Kohlenstoffverbindungen die wichtigsten Komponenten im kommunalen Abwasser. Die wesentliche Quelle organischen Stickstoffes im häuslichen Abwasser sind die vom Menschen mit der Nahrung aufgenommenen Proteine, die im Körper größtenteils zu Harnstoff und Aminosäuren abgebaut werden und in dieser Form ins Abwasser gelangen. Daneben fallen noch verschiedene andere organische Stickstoffverbindungen im häuslichen Abwasser an, die ebenso wie Harnstoff zum größten Teil mikrobiell hydrolysiert und zu Ammonium umgewandelt werden können.

Reduzierte Stickstoffverbindungen sind sauerstoffzehrende Stoffe. In Gewässern mit niedrigem Sauerstoffgehalt kann durch mikrobielle Oxidation von Ammonium zu Nitrit und Nitrat (Nitrifikation) die kritische Konzentration an gelöstem Sauerstoff unter einen kritischen Wert sinken und so die Biocönose im Gewässer gestört werden. Zudem sind Nitrit und Ammoniak starke Fischgifte, so dass eine Elimination dieser Stickstoffverbindungen aus dem Abwasser erforderlich wird [4].

1.3 Nitrifikationshemmung bei der Abwasserbehandlung

Das Wachstum von nitrifizierenden Bakterien kann durch eine Reihe von Hemmstoffen negativ beeinflusst werden [4]. Die nitrifikationshemmende Wirkung vieler, chemisch sehr unterschiedlicher organischer Verbindungen ist seit langem bekannt [5,6,7]. In zahlreichen Arbeiten wurde zudem nachgewiesen, dass sich unter diesen Stoffen auch viele abwasserrelevante Substanzen befinden [8,9,10,11,12]. Neben organischen Verbindungen zeigen auch Schwermetalle eine nitrifikationshemmende Wirkung [13].

Rein häusliches Abwasser enthält in der Regel keine nitrifikationshemmenden Substanzen und hat eine relativ gleichbleibende Beschaffenheit. Hingegen können gewerblich-industrielle Abwässer durchaus temporär unterschiedliche und in klärtechnischer Hinsicht deutlich problematischere Zusammensetzungen aufweisen [14]. Deshalb ist es auch nicht überraschend, dass eine Hemmung der Nitrifikationsstufe häufiger auftritt bei Kläranlagen, die häusliche und industrielle Abwässer gemeinsam behandeln [15].

1.4 Grundlagen des N-BSB

Industrielle Abwässer, wie z. B. aus Schlachtereibetrieben, Raffinerien, Düngemittelfabriken oder der Tierzucht, können große Mengen an reduzierten organischen Stickstoffverbindungen enthalten, die als Substrate von nitrifizierenden Mikroorganismen verwertet werden. Dies kann bei Stossbelastungen zu einer Überschreitung der Nitrifikationskapazität der Kläranlagen führen, was sich in erhöhten Werten an Stickstoffparameter im Ablauf der Kläranlage zeigt. Analytisch bestimmt werden können diese Stickstoffverbindungen z. B. über den Summenparameter Gesamtstickstoff (TN). Damit werden alle reduzierten Stickstoffverbindungen sowohl in organischer als auch anorganischer Form erfasst [16]. Dieser Parameter liefert eine Aussage zu den Gehalten an Stickstoffverbindungen im Abwasser, er lässt jedoch keine Aussage zu, inwieweit diese Verbindungen tatsächlich von den Nitrifikanten umgesetzt werden können. Als Maß für die Nitrifizierbarkeit kann dafür der N-BSB herangezogen werden, der die Konzentration von Stickstoffverbindungen im Abwasser beschreibt, die von Nitrifizierern zum Energiegewinn oxidiert werden [17,18].

1.5 Biosensoren

1.5.1 Allgemeines Funktionsprinzip

Biosensoren sind Messsysteme, die auf der direkten Kopplung einer immobilisierten, biologisch aktiven Komponente (Rezeptor) mit einem Signalumwandler (Transduktor) und einem elektronischen Verstärker basieren. Eine spezifische Komplexbildung zwischen der Biokomponente und dem Analyten stellt den ersten Schritt der Wechselwirkung dar. Der Transduktor registriert die durch einen Analyten hervorgerufenen physiologischen Änderungen an der Rezeptorkomponente. Dadurch wird ein physikochemisches Signal erzeugt, das durch den Transduktor in ein elektrisches quantifizierbares Messsignal umgewandelt und einer elektronischen Messsignalverarbeitung zugeführt wird [19].

1.5.2 Allgemeine Eigenschaften von Biosensoren

Allgemein erlauben Biosensoren kurze Ansprechzeiten im Minutenbereich und ermöglichen zusammen mit dem geringen erforderlichen Aufwand für die Probenvorbehandlung einen relativ hohen Probendurchsatz. Weiterhin zeichnen sie sich durch den geringen Kostenaufwand im Vergleich zur klassischen, instrumentellen Analytik sowie einem möglichen Einsatz im Bereich der On-line Analytik aus. Die Nachteile von Biosensoren sind darin zu sehen, dass die biologisch aktive Komponente immer nur eine begrenzte Langzeitstabilität aufweisen kann. Somit kann dieser Aspekt insbesondere bei länger dauerndem Monitoring in der Umwelt die Funktionalität und Praktikabilität dieser Biosensorsysteme beeinträchtigen [17].

1.5.3 Mikrobielle Biosensoren

Bei mikrobiellen Biosensoren werden Bakterienzellen als biologische Rezeptorkomponente auf elektrochemische Transduktoren immobilisiert. Als lebende Organismen sind Bakterien stoffwechselaktiv, d.h. Substanzen können als Wachstumssubstrate von ihnen verwertet werden oder eine toxische oder hemmende Wirkungen auf ihren Metabolismus ausüben. Durch ihr Multienzymsystem weisen Bakterien zudem ein breites Substratspektrum auf, so dass mikrobielle Biosensoren für die Erfassung von Summenparametern prinzipiell geeignet sind.

Hingegen werden Biosensoren auf der Basis von z.B. Antikörpern, DNS-Fragmenten oder Rezeptoren aufgrund ihrer spezifischen Komplexbildung zwischen der biologischen Komponente und dem Analyten vorwiegend zur Detektion von Einzelsubstanzen verwendet.

Mikrobielle Biosensoren werden hauptsächlich im Bereich der Umweltanalytik eingesetzt. Dabei beruht das Detektionsprinzip der meisten bislang entwickelten Sensoren auf der Bestimmung der Atmungsaktivität der Mikroorganismen [20]. So wurden bereits mikrobielle Biosensoren zur Bestimmung des C-BSB, der Erfassung polycyclischer aromatischer Kohlenwasserstoffe, Chlorphenole u.a. beschrieben [33, 21, 22].

1.6 Siebdrucktechnik – ein Verfahren zur Miniaturisierung von Sensorsystemen

Das Siebdruckverfahren ist eine Dickschichttechnik, die schon seit langem in der Mikroelektronik zur Herstellung integrierter Schaltungen eingesetzt wird. In der elektrochemischen Analytik wird dieses Verfahren unter anderem bei der Herstellung von Festelektrolyt-Gassensoren zur Messung von Sauerstoff, Wasserstoff oder Kohlendioxid benutzt. In der Biosensorik eröffnete diese Technik die Möglichkeit der Miniaturisierung und somit den Einbau von Biosensoren in Mikrosystemen. Der Vorteil dieser Miniaturisierung liegt vor allem in einer Kostensenkung durch die Einsparung von Reagenzien und Probevolumina, in einer Arbeitserleichterung durch einfach zu bedienende, portable Messgeräte sowie in einer Verkürzung der Analysezeiten durch Simultanmessung mehrerer Komponenten mit Hilfe von Sensorarrays.

Beim Siebdruckverfahren, dessen Prinzip in Abbildung 1 dargestellt ist, werden Druckpasten, die neben organischen Bindemitteln und anorganischen Additiven, Metalle oder Metalloxide in Form eines feinen Pulvers enthalten, mit einem Gummirakel durch Siebe oder geätzte Metallplatten auf ein Substrat (z.B. Al_2O_3) aufgedruckt. Im anschließenden Heizprozess werden die zunächst in der Paste vorhandene Lösungsmittel verdampft, dann Harze aus der Paste verbrannt und schließlich Glasanteile aufgeschmolzen. Die dabei erhaltenen Strukturen weisen Schichtdicken in einer Größenordnung zwischen 5 μm und 50 μm auf [23].

Das Druckergebnis wird dabei im wesentlichen von der Siebspannung, dem Abstand zwischen dem Sieb und Substrat (Absprung), dem Rakeldruck, der Rakelhärte und der Rakelgeschwindigkeit bestimmt.

Während konventionelle Siebdruckpasten bei Temperaturen von weit über 100 °C ausgehärtet werden müssen, können spezielle Druckpasten auf Polymerbasis bei Temperaturen unterhalb von 100 °C polymerisiert werden. Dadurch wird der Einsatz kostengünstiger Kunststoffsubstrate und somit die Produktion von Einmalsensoren ermöglicht [24].

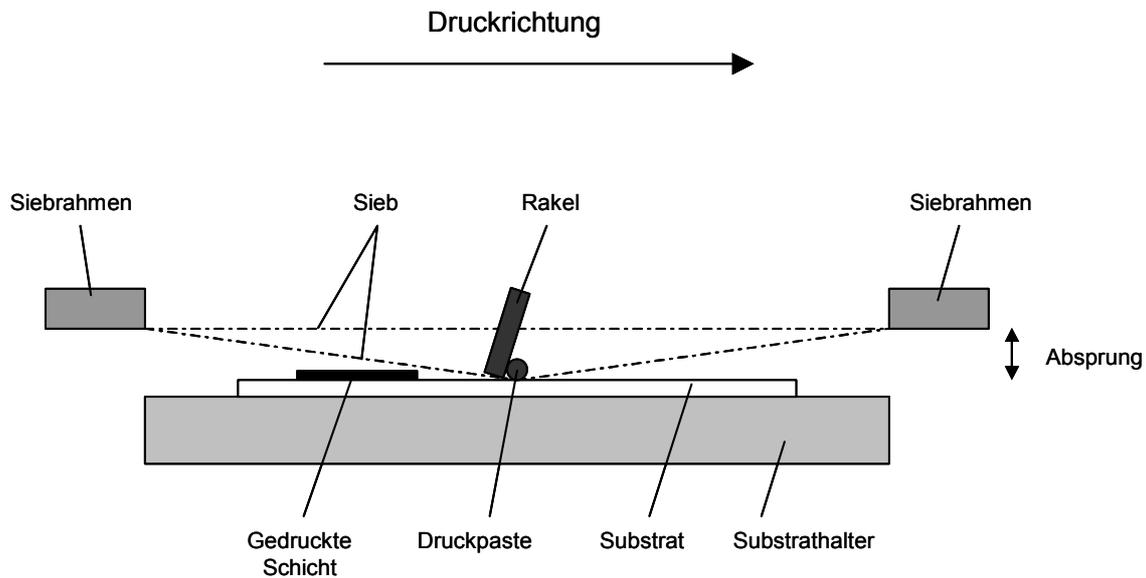


Abbildung 1: Prinzip des Siebdruckverfahrens.

1.7 Anlass und Zielsetzung des Forschungsvorhabens

Für die Bestimmung nitrifikationshemmender Abwasserproben und Chemikalien sind bereits verschiedene Testsysteme beschrieben und entwickelt worden. Der Nachteil der meisten Verfahren besteht allerdings darin, dass sie durch einen relativ hohen Arbeits- und Zeitaufwand gekennzeichnet sind. Treten z. B. regelmäßige Störungen der Nitrifikationsstufe in Kläranlagen auf, so ist das Auffinden des Verursachers unter Umständen mit der Untersuchung einer Vielzahl von Abwasserteilströmen und letztendlich mit hohen Kosten verbunden. Deswegen wurde im Zuge eines von der DBU geförderten Forschungsprojektes (Az. 06153) am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA) der Universität Stuttgart in den Jahren von 1995 bis 1997 ein Nitrifikanten-Biosensor entwickelt und unter realen Bedingungen erprobt. Mit diesem Geräteprototyp war die Quantifizierung der Hemmwirkung von etwa einer Probe pro Messtag möglich. Dies stellte einen deutlichen Zeitgewinn gegenüber anderen Untersuchungsmethoden wie z.B. der Methode nach DIN EN ISO 9509 dar, war aber letztendlich bei einem hohen Probenaufkommen noch zu langsam und dadurch zu teuer.

Das Ziel dieser Forschungsarbeit war es daher, ein Multimessgerät auf der Basis von miniaturisierten Einweg-Nitrifikantensensoren zum Screening **und** zur Quantifizierung nitrifikationshemmender Abwasserproben und Umweltchemikalien zu entwickeln. In einer Kooperation mit dem Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart sollten dafür Sauerstoffdickschichtelektroden entwickelt bzw. optimiert werden, auf denen direkt eine Nitrifikantenmischkultur immobilisiert wird. Durch die verringerten Abmessungen der Elektroden sollte der Einbau in ein mehrkanaliges Messgerät realisiert werden, welches in Zusammenarbeit mit der Fa. „Energy of Nature“ – Projektgesellschaft für umwelttechnischen Anlagensysteme Leipzig mbH entwickelt werden sollte. Mit diesem Gerät sollen die Signale von 10 Dickschichtsensoren gleichzeitig erfasst werden. Auf diese Weise sollte die Aufnahme der Messsignale einer kompletten Verdünnungsreihe und somit die Quantifizierung der nitrifikationshemmenden Wirkung einer Probe im Bereich von Minuten ermöglicht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Herstellung der Sauerstofftransducer

2.1.1 Transducerbasis

Die Transducerbasis der Sauerstoffdickschichtelektroden wird über das Siebdruckverfahren mit Hilfe des Siebdruckers DEK 248 (DEK Ltd., Weymouth, England) hergestellt, wobei die in Tabelle 1 aufgeführten Druckpasten schichtweise aufgetragen werden. Die Transducerbasis besteht aus den Silberleiterbahnen, einer Referenzelektrode, einer Graphitunterlage, der Arbeitselektrode und der Isolationsschicht. Das Layout und die Abmessungen der Transducer ist in Abbildung 2 dargestellt. Als Basissubstrat für den Druck werden Kunststoffsubstrate aus Polycarbonat in einer Schichtdicke von 500 µm verwendet, auf die die Elektroden in einer Konfiguration von 2 x 10 gedruckt werden (Abbildung 3). Der Druckprozess erfolgt im Flut/Druck-Modus. Das Layout der einzelnen Siebe für den Druck der Elektrodenkomponenten wurde mit dem Graphikprogramm CorelDraw 7.0 erstellt und die Siebe (Siebdruckgewebe: Polyester, Beschichtung: Monolen Plus) von der Firma Steinmann GmbH (Stuttgart, Deutschland) photolithographisch hergestellt. Die für die Herstellung der Transducerbasis eingesetzten Leiterpasten (Electrodag PF-410, Electrodag 423 SS, Electrodag 418 SS, Electrodag 6037 SS) stammen von der Firma Acheson, während die Siebdruckfarbe Marastar SR 057 und der Verdünner UKV 2 von Marabu (Tamm, Deutschland) bezogen werden. Für die Herstellung der Druckpaste der Arbeitselektrode wird Rhodium auf Aktivkohle als Mediator (puriss.; 5 % Rh, Fluka) verwendet. Im Anschluss an den Druckprozess der Transducerbasis folgt die Polymerisierung der Leiterpasten in einem Heizprozess bei 90 °C im Trockenschrank für 30 min. Nach diesem Herstellungsschritt kann die Transducerbasis bei 4°C gelagert werden.

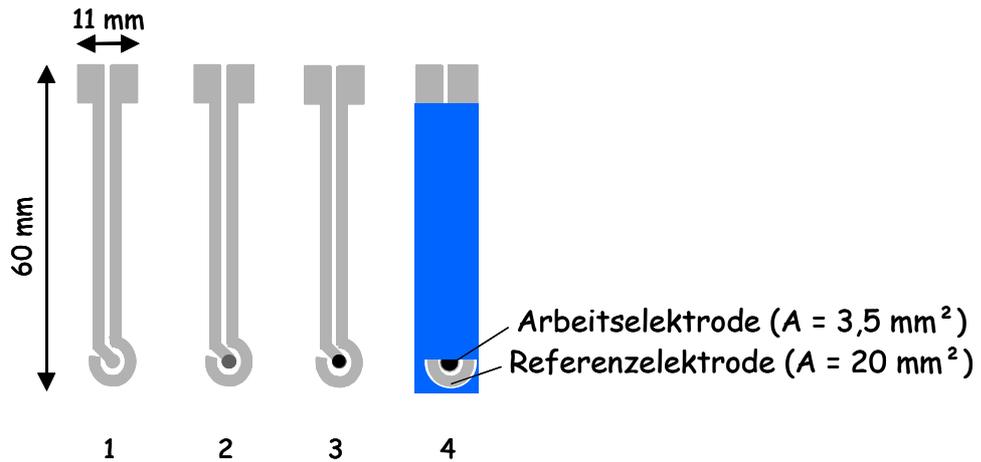


Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Transducerbasis einer Sauerstoffdickschichtelektrode. Dargestellt ist der schrittweise Druckprozess: 1. Silberleiterbahnen, 2. Graphitunterlage, 3. Arbeitselektrode (Rhodium/Graphit), 4. Isolationschicht.

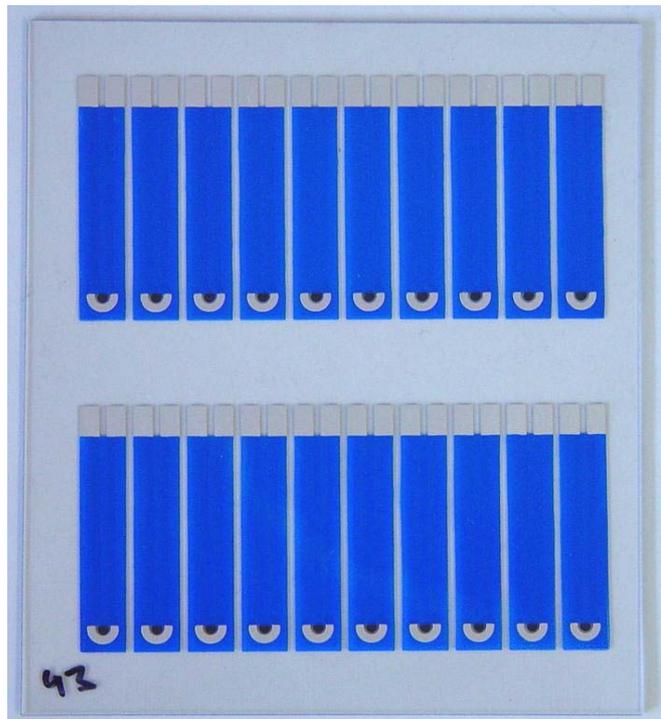


Abbildung 3: Transducerbasis der Sauerstoffdickschichtelektroden in einer Konfiguration von 2 x 10 Elektroden.

Tabelle 1: Parameter für den Druck der Basis der Sauerstoffelektroden auf PC-Substrat.

Druckschritt	Druckpaste	Rakel- druck	Ab- sprung [mm]	Rakelgeschwindigkeit (vor/zurück) [mm/s]
1. Silberleiter- bahn	Electrodag 418 SS, 1,3 % (w/w) UKV 2	4	1,3	70/70
2. Referenz- elektrode	Electrodag 6037 SS	4	1,2	50/50
3. Graphitunter- lage	Electrodag 423 SS	6	1,2	55/55
4. Arbeitselekt- rode	80 % (w/w) Electrodag 423 SS 7 % (w/w) Rhodium auf A-Kohle 13 % (w/w) UKV 2	5	1,5	50/50
5. Isolation	Marastar 057 SR, 15 % (w/w) UKV 2	4	1,5	70/70

2.1.2 Aufbringung des Elektrolyten und der sauerstoffpermeablen Membran

Im Anschluss an die Herstellung der Transducerbasis wird die Fläche zwischen der Arbeits- und Referenzelektrode zur Erhöhung der Oberflächenspannung des Kunststoffsubstrates punktuell chemisch mit einer 0,5 % (w/v) Celluloseacetat/Aceton-Lösung nachbehandelt. Nach diesem Herstellungsschritt wird auf den Bereich der Arbeits- und Referenzelektrode jeweils 15 µl einer Elektrolytlösung (6,6 % (w/v) Polyvinylpyrrolidon (PVP K30, pract.; Pulver, Fluka) gelöst in einer Elektrolytbasislösung (0,02 M KH_2PO_4 , 0,08 M Na_2HPO_4 , 0,3 M KCl, pH 7,5) über das Drop-Coating-Verfahren (Auffropfen) auf die Elektroden aufgebracht. Nach einer Trocknungsphase des Elektrolyten von ca. zwei bis drei Stunden erfolgt die Beschichtung der vom Elektrolyten umgebenen Fläche mit einer sauerstoffpermeablen Siliconmembran. Dazu wird der RTV1-Siliconkautschuk Elastosil E 41 (Wacker-Chemie GmbH, München) auf die Elektroden in einer Konfiguration von 1 x 5 Transducern mit einem IKA-

Rührwerk des Typs RW 20 (IKA, Staufen, Deutschland) bei 2000 U/min für 45 Sekunden über das Spin-coating-Verfahren aufgebracht. Nach einer Vulkanisationsphase der Siliconmembran für 24 Stunden bei Raumtemperatur können die Elektroden mehr als ein Jahr bei + 4°C gelagert werden. Vor der Verwendung der Sauerstoffelektroden werden die Elektroden für 72 h in entionisiertem Wasser hydratisiert. Dieser Vorgang führt infolge Diffusion von Wasserdampf in den von der Membran umgebenen Elektrolytraum zum Aufquellen des Elektrolyten. Dieser Produktionsschritt ist erforderlich, da die Elektroden nur bei aufgequollenem Elektrolyten funktionsfähig sind.

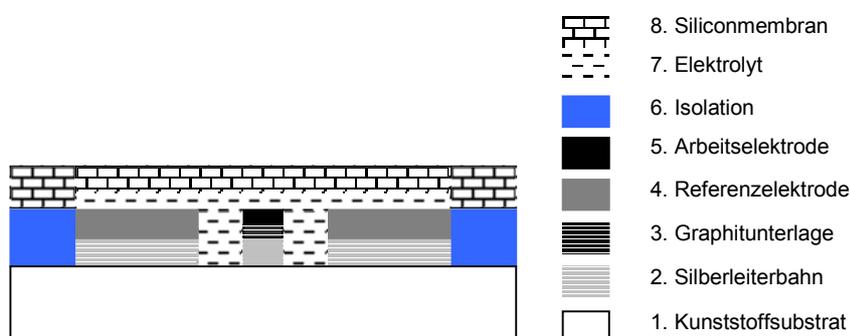
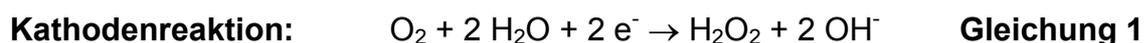


Abbildung 4: Schematischer Querschnitt durch die Arbeits- und Referenzelektrode einer vollständig gefertigten Sauerstoffdickschichtelektrode.

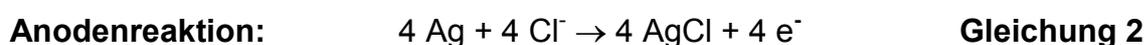
2.1.3 Elektrodenreaktionen

Im folgenden sind die wesentlichen Elektrodenreaktionen zusammenfassend dargestellt, die bei der elektrochemischen Messung von Sauerstoff an einem Clark-Sensor auf der Basis von Sauerstoffdickschichtelektroden ablaufen.

Während der Polarisierung der Elektroden wird der Sauerstoff an der Arbeitselektrode entsprechend der Kathodenreaktion (Gleichung 1) reduziert [25].



Der durch die Sauerstoffreduktion entstehende Elektronenbedarf wird durch die Oxidation von Silbermetall an der Anode nach Gleichung 2 gedeckt.



Um die Ag^+ -Konzentration im Elektrolyten auf einem konstanten, niedrigen Niveau zu halten, wird bei Siebdruckelektroden eine Ag/AgCl -Referenzelektrode verwendet und Ag^+ am Ort der Entstehung durch Cl^- an der Anode als AgCl niedergeschlagen [26].

2.2 Kultivierung von Nitrifikantenmischkulturen

Für die Herstellung der mikrobiellen Biosensoren werden nitrifizierende Bakterienkulturen im Durchflusssystem (Chemostat) in einem klimatisierten Raum bei 24°C angereichert. Dabei handelt es sich um aus belebtem Schlamm aus dem Lehr- und Forschungsklärwerk Stuttgart-Büsnau angereicherte Nitrifikantenmischkulturen sowie um eine kommerziell erhältliche Bakterienmischkultur (NitroBac100L, InterBio, Dublin). Die Kultivierung erfolgt diskontinuierlich in jeweils einem 10 l Chemostaten. (Zuflussrate: $f = 0,09 \text{ l/h}$, Verdünnungsrate $D = 0,009 \text{ h}^{-1}$). Die Zusammensetzung der Nährlösung ist in Tabelle 2 beschrieben und wird in Leitungswasser angesetzt.

Tabelle 2: Zusammensetzung der Nährlösung zur Kultivierung von Nitrifikanten-Anreicherungskulturen.

Chemikalie	Konzentration (mg/l)
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	142 (entspricht 30 mg/l N)
KH_2PO_4	1000
Na_2HPO_4	4160
MnSO_4	0,045
H_3BO_3	0,049
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{ H}_2\text{O}$	0,043
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4 \text{ H}_2\text{O}$	0,037
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,973
CuSO_4	0,016

2.3 Immobilisierung der Nitrifikantenmischkulturen in PVA-SbQ

Wenngleich zur Fertigung von Nitrifikanten-Biosensoren diverse Polymere und Polymermischungen hinsichtlich ihrer Eignung zur Immobilisierung der Nitrifikanten getestet wurden, basieren sämtliche in diesem Forschungsvorhaben erzielten Ergebnisse auf der Verwendung eines photovernetzbaren Polyvinylalkohols (PVA-SbQ, SPP-LS-400 (bio), Toyo Gosei Kogyo Co., Ltd., Japan). Der Herstellungsprozess von Nitrifikantenimmobilisaten ist in Tabelle 3 dargestellt.

Tabelle 3: Herstellung von Nitrifikantenimmobilisaten

Arbeitsschritt	Durchführung
1.	Homogenisieren der nitrifizierenden Biomasse mit einem Homogenisator
2.	Zentrifugation der Biomasse bei 4000 U/min und Raumtemperatur für 5 min
3.	2 x Waschen des Bakterienpellets in Phosphat-Puffer (0,02 M KH_2PO_4 , 0,08 M Na_2HPO_4 , pH 7,3)
4.	Mischen der Feuchtbiomasse mit einer 40 %-igen PVA-SbQ-Stammlösung gelöst in Phosphat-Puffer (w/w): Polymer/Biomasse: 40 % PVA-SbQ-Stammlösung/ 60 % Biomasse (v/w)
5.	Homogenisieren des Biomasse/Polymergemisches auf dem Schüttler (Vortexer)
6.	12 μl des Biomasse/Polymergemisches werden pro Elektrode auf die Siliconmembran aufgetragen und gleichmäßig über den Bereich der Arbeits- und Referenzelektrode verteilt.
7.	Belichten des Nitrifikanten-Immobilisates für 8 h unter einer Halogenleuchtstoffröhre (2 x 36 W) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre (Sensoren werden auf angefeuchtetem Zellstoff in Petrischalen gelagert, um ein Austrocknen des Immobilisates während der Belichtungsphase zu vermeiden).

2.4 Laborgerät

Im Rahmen des Projektes wurde ein Analysenmessgerät in Zusammenarbeit mit der Firma „Energy of Nature“- Projektgesellschaft für umwelttechnische Anlagensystem mbH, Leipzig entwickelt. In Abbildung 5 ist dieser Laborprototyp dargestellt, mit dem die Signale von zehn Nitrifikanten-Biosensoren parallel aufgenommen werden können. Dabei sind die Biosensoren über Steckverbinder in einer Hebebühne in das Messgerät integriert. Die Messzellen (5 ml Bechergläser) sind in einer temperierbaren und austauschbaren Vorrichtung fixiert, wobei die Einstellung der Temperatur ($T = 24^{\circ}\text{C}$) durch einen externen Thermostaten vorgenommen wird. Um eine gleichmäßige Temperierung zu erreichen, enthält die Wanne eine Umwälzpumpe. Angeströmt werden die einzelnen Sensoren durch ein in die Hebebühne eingebautes Rührwerk. Die Geschwindigkeit der Rührer ist über das Bedienfeld kontinuierlich regelbar. Die Signalaufnahme erfolgt über je einen Strom/Spannungs-Wandler mit einer Referenzspannung von -330 mV . Die Messkanäle sind elektrisch unabhängig ausgebildet. Das analoge Spannungssignal wird mittels 12 Bit A/D Wandlern in einen digitalen Messwert gewandelt und serialisiert für die Auswertung bereitgestellt. Bei der Serialisierung erfolgt gleichzeitig eine erste Glättung der Messsignale durch Mittelwertbildung über jeweils 10 Signale. Die Abfragerate eines jeden Wandlers beträgt 100 ms , so dass jeder Kanal einen Messwert pro Sekunde liefert. Dabei hat sich ein zeitliche Versatz von je 100 ms der Kanäle zueinander als ausreichend erwiesen. Für die Messwertaufnahme kommt ein eigener Mikroprozessor (SAB 166) zum Einsatz. Dieser leitet die Messsignale für die weitere Auswertung an ein serielles Interface. Die parallele Visualisierung der Sensorsignale erfolgt in der Form von Strom-Zeit-Kurven und wird über eine speziell für dieses Messsystem von der Firma Spectro 21 (Erligheim) entwickelten Software (EChem21) aufgenommen. Gleichzeitig werden vom Mikroprozessor einige Steuerungsaufgaben wahrgenommen, wie z.B. das Heben und Senken der Bühne. Über ein Bedienfeld können diese Funktionen manuell ausgeführt werden. Zur Kontrolle der Temperatur ist ein passives Temperaturmesssystem in der Wanne integriert.



Abbildung 5: Mehrkanalmessgerät für Biosensoruntersuchungen

2.5 Messmethodik

2.5.1 Bestimmung nitrifizierbarer Verbindungen

Zu Beginn der Messung wird der Sensor in nährstofffreien Phosphat-Puffer (0,02 M KH_2PO_4 , 0,08 M Na_2HPO_4 , pH 7,3) eingetaucht. Dadurch stellt sich zunächst ein stabiler Grundstrom auf einem hohen Niveau ein, da im bakteriellen Immobilisat, abgesehen von der endogenen Atmung, keine sauerstoffverbrauchende Stoffwechsellvorgänge stattfinden. Die Sauerstoffmoleküle diffundieren von bakteriellen Atmungsvorgängen unbeeinflusst durch das Immobilisat und werden von der Sauerstoffsonde

detektiert. Aufgrund des amperometrischen Messprinzips sind hohe Sauerstoffkonzentrationen am Sensor gleichbedeutend mit hohen Stromstärken, die vom Messgerät gemessen werden. Durch die Zugabe eines Nitrifikationssubstrates (z.B. Ammonium) in die Sensorzelle, steigt aufgrund der Oxidation des Nährstoffes der bakterielle Sauerstoffverbrauch an. Entsprechend diffundiert weniger Sauerstoff durch das Immobilisat zur Sonde, was durch ein gleichzeitiges Absinken der gemessenen Stromstärke registriert wird. Ein neues Plateau stellt sich dann ein, wenn der Gleichgewichtszustand zwischen dem bakteriellen Sauerstoffverbrauch und der Nachlieferung von O_2 über Diffusion erreicht ist. Die Auswertung erfolgt nach der Endpunktmethode, d.h. durch Differenzbildung zwischen der Stromstärke I zu Versuchsbeginn (Basislinie) und der Stromstärke bei Versuchende, nachdem sich die Strom-Zeit-Kurve aufgrund der Substratzugabe auf dem entsprechenden Plateauwert stabilisiert hat.

Für den parallelisierten Messvorgang wird das in Abbildung 6 dargestellte Messprinzip angewendet. Nach der Equilibrierung der Sensoren in der nährstofffreien Messlösung wird zur Quantifizierung von Nitrifikationssubstraten an den einzelnen Sensoren ($n = 1 - 10$) jeweils eine definierte Konzentration $c_{s(n)}$ des Substrats vorgelegt. Wenn der sensorspezifische erste Plateaubereich erreicht ist, wird eine im Bereich der Substratsättigung liegenden Konzentration eines Standardnitrifikationssubstrates (z.B. Ammonium) zudosiert. Aus der Differenz der Stromstärke des Basissignals $I_{0(n)}$ und des zweiten Plateaus $I_{\text{Sättigung}(n)}$ wird die maximale Signalthöhe $\Delta I_{\text{Sättigung}(n)}$ eines jeden Sensors ermittelt (Sensoreinzelkalibrierung). Das vom Nitrifikationssubstrat konzentrationsabhängige Signal $\Delta I_{s(n)}$ eines jeden Sensors wird in Bezug zum Signal bei Substratsättigung des jeweiligen Sensors gesetzt und als relative Sensoraktivität A_n angegeben (Gleichung 3 - Gleichung 5).

Gleichung 3: $A_n = (\Delta I_{S(n)} / \Delta I_{\text{Sättigung}(n)}) \times 100$

Gleichung 4: $\Delta I_{S(n)} = I_{0(n)} - I_{S(n)}$

Gleichung 5: $\Delta I_{\text{Sättigung}(n)} = I_{0(n)} - I_{\text{Sättigung}(n)}$

A_n : Relative Sensoraktivität des Sensors n, angegeben in %

$I_{0(n)}$: Basissignal des Sensors n, angegeben in nA

$I_{S(n)}$: Signal des Sensors n bei einer Konzentration an Nitrifikationssubstrat $c_{S(n)}$, angegeben in nA

$\Delta I_{S(n)}$: Differenz des Stromsignals des Sensors n vom Basissignal und der Konzentration an Nitrifikationssubstrat $c_{S(n)}$, angegeben in nA

$I_{\text{Sättigung}(n)}$: Signal des Sensors n bei Substratsättigung, angegeben in nA

$\Delta I_{\text{Sättigung}(n)}$: Differenz des Stromsignals des Sensors n vom Basissignal und bei Substratsättigung, angegeben in nA

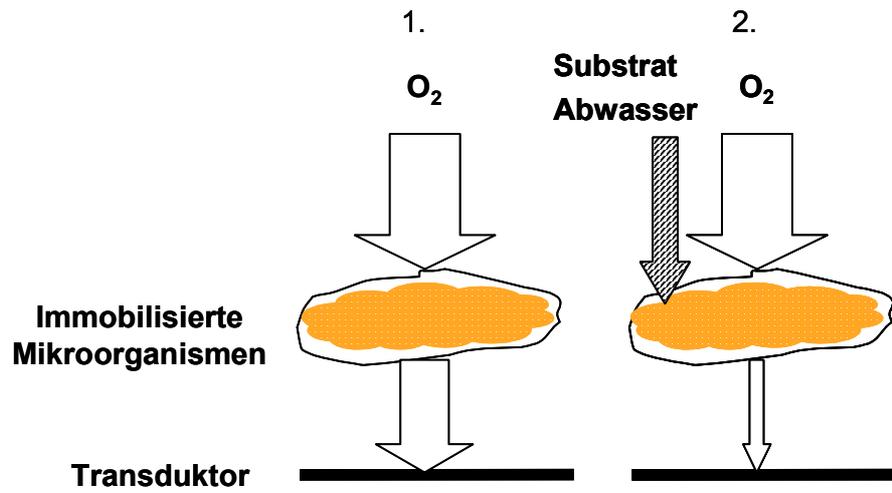
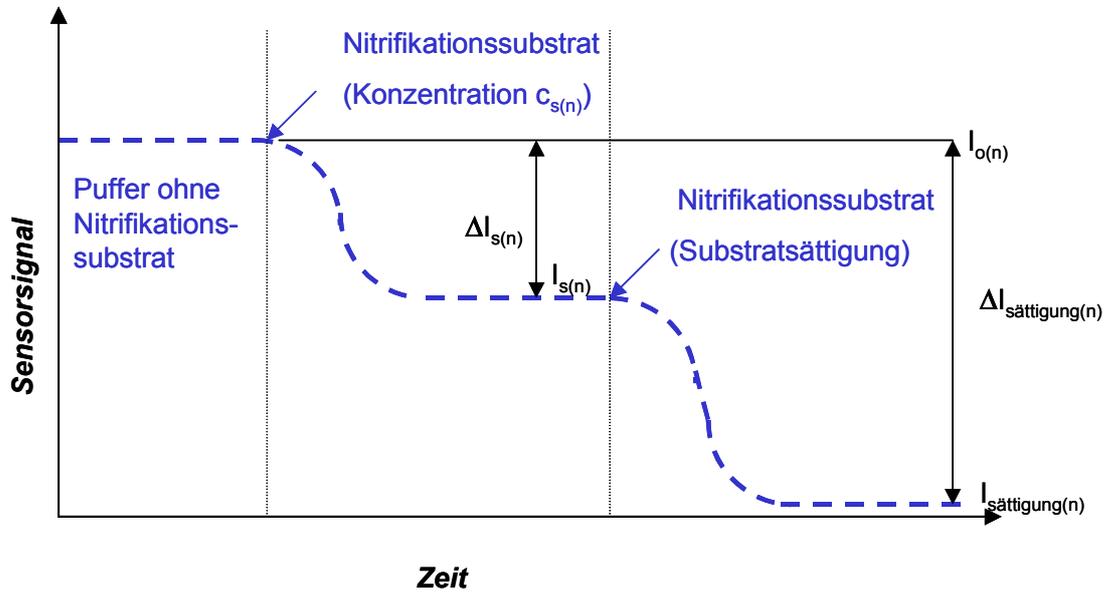


Abbildung 6: Detektionsprinzip der Nitrifikantensensoren bei der Bestimmung nitrifizierbarer Verbindungen.

2.5.2 Bestimmung nitrifikationshemmender Effekte

Im Gegensatz zur Vorgehensweise bei der Substratquantifizierung tauchen hier die Biosensoren zu Versuchsbeginn in eine Lösung mit Substratüberschuss (0,02 M KH_2PO_4 , 0,08 M Na_2HPO_4 , 1,43 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (40 mg/l $\text{NH}_4^+\text{-N}$) ein. Am Sensor findet maximale Sauerstoffzehrung durch das Immobilisat statt. Es verbleiben also nur noch wenige Sauerstoffmoleküle, die durch das bakterielle Immobilisat hindurch zur Kathode diffundieren können und dort detektiert werden. Dadurch stellt sich der Grundstrom bei geringen Stromstärken ein. Durch die Zugabe von Nitrifikationsinhibitoren wird der bakterielle Stoffwechsel gehemmt. Die Sauerstoffdiffusion zur Sonde kann dadurch je nach Ausmaß des Hemmeffektes wieder mehr oder weniger ungehindert erfolgen. Dies macht sich in einem Abfall des bakteriellen Sauerstoffverbrauchs bzw. in einem Anstieg der mit dem Sensor registrierten Stromstärke bemerkbar. Es stellt sich ein stabiler Messwert ein, sobald der nun verminderte Sauerstoffverbrauch des Immobilisates und die Sauerstoffnachlieferung per Diffusion aus der Probe den neuen Gleichgewichtszustand erreicht haben. Das Detektionsprinzip bei der Erfassung nitrifikationshemmender Substanzen durch den Sensor ist in Abbildung 7 dargestellt. Man sieht, dass bei der Bestimmung von Hemmstoffen eine Verminderung der Stoffwechselaktivität des Nitrifikantenimmobilisates erfasst wird. Die Auswertung der Sensorsignale erfolgt analog zu der unter 2.5.1 beschriebenen Endpunktmethode.

Angewendet auf den parallelisierten Messvorgang bedeutet dies, dass nach der Equilibrierung der Sensoren in der hemmstofffreien Messlösung zur Quantifizierung des Hemmeffektes an den einzelnen Sensoren ($n = 1-10$) jeweils eine definierte Konzentration $c_{h(n)}$ eines Hemmstoffes vorgelegt wird. Ist der erste sensorspezifischen Plateaubereich erreicht, wird eine im Bereich der maximalen Hemmung liegenden Konzentration eines Standardhemmstoffes (z.B. ATH) zudosiert. Aus der Differenz des Basissignals $I_{B(n)}$ und der Stromstärke des zweiten Plateaus $I_{\text{max}h(n)}$ wird das maximale Signal $\Delta I_{\text{max}h(n)}$ eines jeden Sensors ermittelt (Sensoreinzelkalibrierung). Das vom Hemmstoff h_n abhängige Signal $\Delta I_{h(n)}$ eines jeden Sensors wird in Bezug zum Signal bei maximaler Hemmung des jeweiligen Sensors gesetzt und als konzentrationsabhängige Hemmung H_n angegeben (Gleichung 6 - Gleichung 8).

Gleichung 6: $H_n = (\Delta I_{h(n)} / \Delta I_{maxh(n)}) \times 100$

Gleichung 7: $\Delta I_{h(n)} = I_{B(n)} - I_{h(n)}$

Gleichung 8: $\Delta I_{maxh(n)} = I_{B(n)} - I_{maxh(n)}$

H_n : Hemmung des Sensors n, angegeben in %

$I_{B(n)}$: Basissignal des Sensors n, angegeben in nA

$I_{h(n)}$: Signal des Sensors n bei der Hemmstoffkonzentration $c_{h(n)}$, angegeben in nA

$\Delta I_{h(n)}$: Differenz des Stromsignals des Sensors n vom Basissignal und der Hemmstoffkonzentration $c_{h(n)}$, angegeben in nA

$I_{maxh(n)}$: Signal des Sensors n bei maximaler Hemmung, angegeben in nA

$\Delta I_{maxh(n)}$: Differenz des Stromsignals des Sensors n vom Basissignal und des Signals bei maximaler Hemmung, angegeben in nA

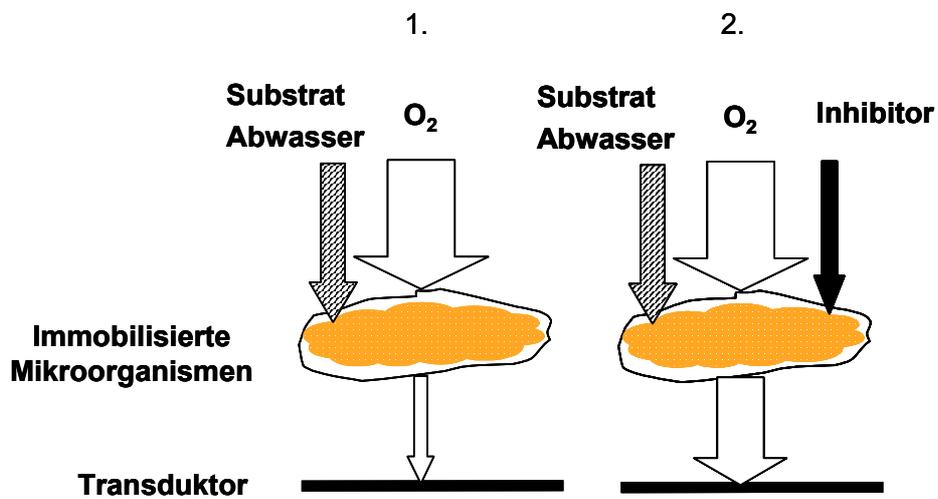
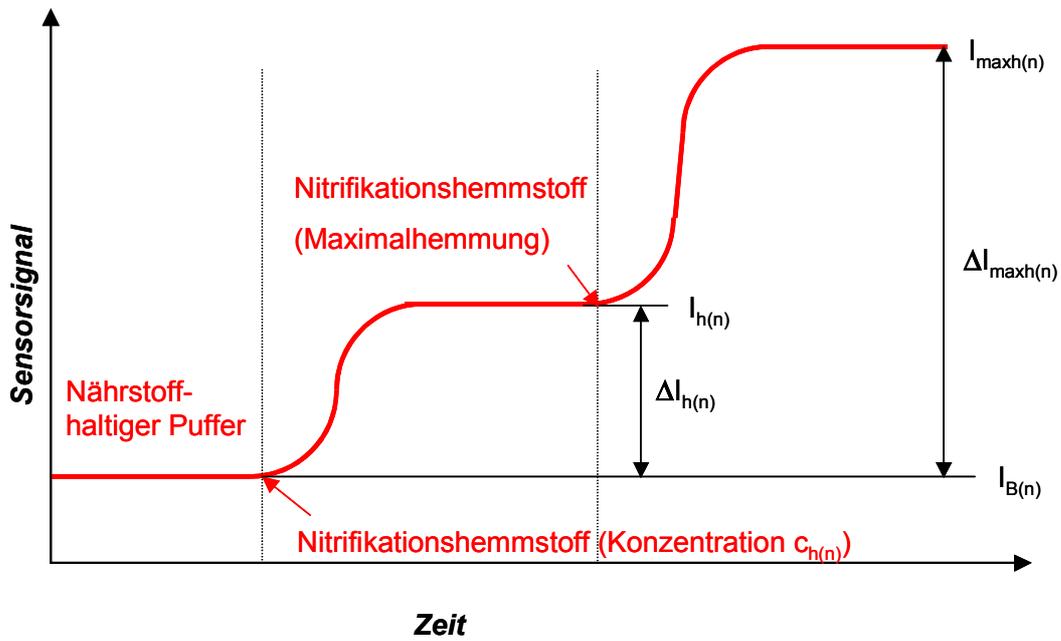


Abbildung 7: Detektionsprinzip der Nitrifikantensensoren bei der Bestimmung von Nitrifikationshemmstoffen.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Sauerstoffdickschichtelektroden

Zur Charakterisierung der Sauerstoffelektroden wurden chronoamperometrische Untersuchungen für die Ermittlung des Arbeitspunktes, der signaldynamischen Eigenschaften, zur Kalibrierbarkeit sowie zur Betriebsstabilität der Sauerstoffsensoren durchgeführt.

3.1.1 Strom-Spannungs-Kennlinie

Der Strom als Funktion der angelegten Polarisationsspannung zeigt bei Sauerstoffelektroden gewöhnlich einen Plateaubereich (Bereich des diffusionslimitierten Grenzstroms). In diesem Bereich wird für gewöhnlich der Arbeitspunkt von Sauerstoffelektroden festgelegt, wobei dieser für jeden Sensortyp zunächst ermittelt werden muss. Zur Bestimmung des Arbeitspunktes der Sauerstoffdickschichtelektroden wurde die Abhängigkeit des Sensorsignales von der angelegten Spannung über chronoamperometrische Verfahren bestimmt. In Abbildung 8 sind die Strom-Spannungs-Kennlinien der Transducer in sauerstofffreiem und -gesättigtem Messmedium dargestellt.

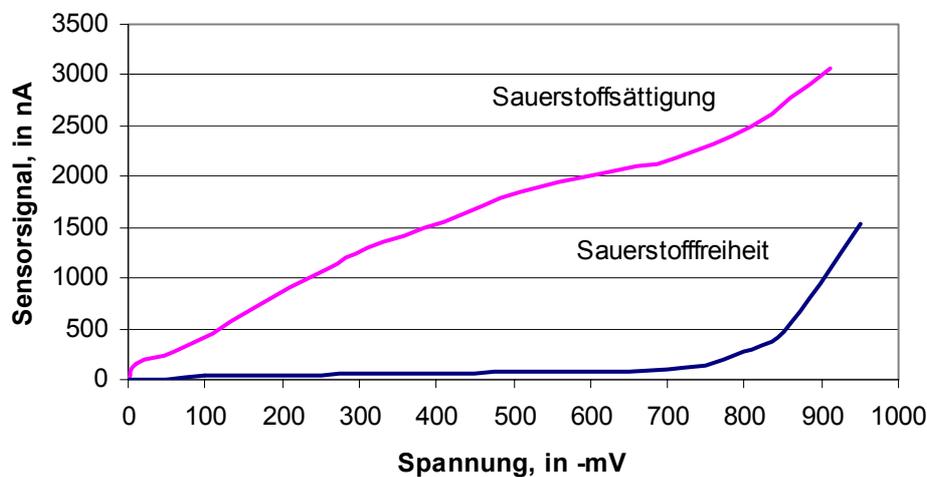


Abbildung 8: Hydrodynamisches Voltammogramm der Sauerstoffdickschichtelektroden in sauerstofffreiem und -gesättigtem Messmedium

Über die chronoamperometrische Messmethode war in sauerstoffgesättigtem TRIS-Puffer kein Plateaubereich ausgeprägt und mit zunehmender negativer Polarisationsspannung ein kontinuierlicher Anstieg der Stromstärke verbunden. Dieses

Verhalten ist durch die Konstruktion der Sauerstoffelektroden bedingt, da durch das Aufquellen des Elektrolyten der Abstand der Arbeitselektrode von der Membran ca 1 mm beträgt und nicht, wie im Falle kommerzieller Elektroden, nahezu an der Kathode aufliegt. Dies hat zur Folge, dass bei diesen Dickschichtelektroden keine diffusionslimitierenden Verhältnisse vorliegen. Ein Plateaubereich wurde bei den Untersuchungen mit den Dickschichtelektroden lediglich in sauerstofffreiem Messmedium ermittelt. Dabei wurde bis zu einer Polarisierungsspannung von $U_{\text{pol}} = -750 \text{ mV}$ kein signifikanter Stromfluss bestimmt. Wurden negativere Spannungen angelegt, stieg das Stromsignal bei gleichzeitiger Gasblasenbildung innerhalb des von der Siliconmembran eingeschlossenen Elektrolyten (vermutlich Wasserstofffreisetzung durch elektrolytische Wasserzersetzung) an. Der Arbeitspunkt wurde in dieser Plateauphase gewählt und die Polarisierungsspannung der Elektroden mit $U_{\text{pol}} = -330 \text{ mV}$ festgelegt.

3.1.2 Equilibrierungsverhalten der Sauerstofftransducer

Die Equilibrierungsdauer der Sauerstofftransducer zeigt eine Abhängigkeit von der Anzahl der Polarisierungsvorgänge. Werden die Elektroden zum ersten Mal polarisiert, beträgt die Einlaufzeit zwischen einer halben und einer Stunde bis sich ein stabiler Messwert einstellt, der i.d.R. durch ein hohes Signalrauschen gekennzeichnet ist. Dieses Verhalten ist für Siebdruckelektroden bereits häufiger beschrieben worden und wird u.a. auf reduktive und oxidative Vorgänge an der Arbeits- bzw. Referenzelektrode zurückgeführt, die aus Verunreinigungen auf den Elektrodenflächen durch den Siebdruckprozess resultieren [25]. Bestätigt wird diese Annahme auch dadurch, dass die Equilibrierungsdauer der Sensoren sich nach maximal fünfmaliger Polarisierung auf zwei bis fünf Minuten bei gleichzeitig hoher Signalstabilität verkürzt.

3.1.3 Dynamisches Verhalten der Sauerstofftransducer

In Abbildung 9 ist das dynamische Verhalten der Sauerstoffdickschichtelektroden bei Änderung der Sauerstoffkonzentration dargestellt. Nach Einstellung eines stabilen Messsignals in sauerstoffgesättigtem Phosphat-Puffer erfolgt die Zugabe einer gesättigten Na_2SO_3 -Lösung. In Folge der Reaktion des Sauerstoffs mit Na_2SO_3 nimmt die Sauerstoffkonzentration in der Messlösung ab, was in einer Abnahme des Sensorstromsignals der Elektroden resultiert.

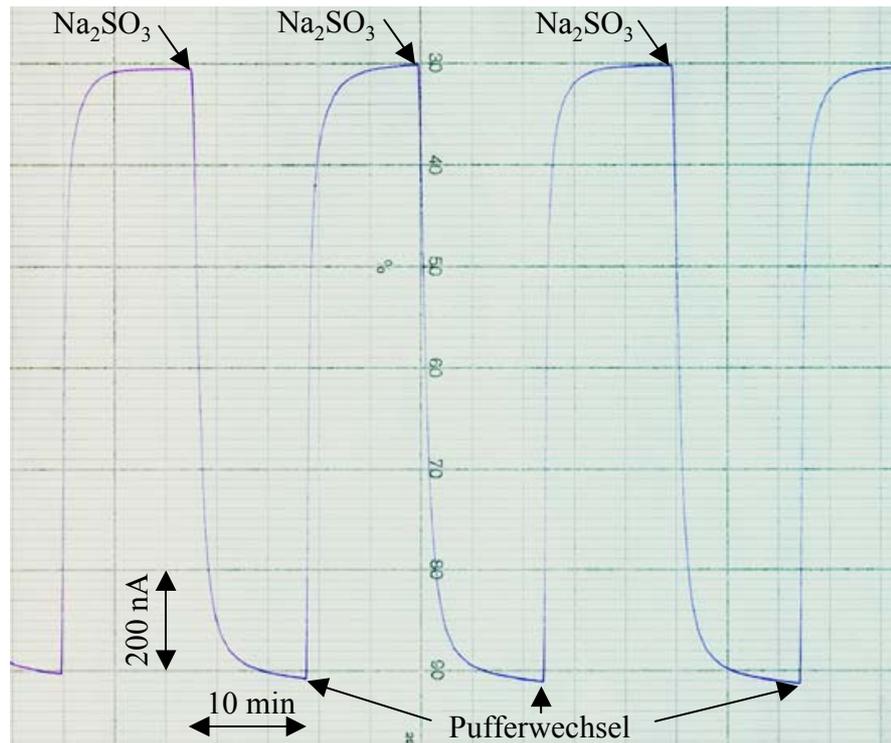


Abbildung 9: Dynamisches Verhalten der Sauerstoffdickschichtelektroden bei Wechsel von sauerstoffgesättigtem und –freiem (Na₂SO₃) Messmedium.

Zu erkennen ist, dass sofort nach Zugabe von Na₂SO₃ die Transducer auf die sich ändernden Sauerstoffverhältnisse ansprechen. Sie erreichen nach 120 Sekunden 90 % (t_{90}) des Gesamtsignals, während sich ein stabiles Sensorsignal sowohl unter sauerstoffgesättigten als auch sauerstofffreien Bedingungen nach 10 und 15 Minuten einstellt. Diese dynamischen Eigenschaften sind als ausreichend gut zu bezeichnen; sie sind auch vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen Dickschichtelektroden, wengleich sowohl Sauerstoffdickschichtelektroden als auch –dünnschichtelektroden mit höherer Leistungsfähigkeit bereits beschrieben wurden [27,28,29].

3.1.4 Kalibrierung der Sauerstoffelektroden

Abbildung 10 zeigt die Abhängigkeit des Sensorsignals von der Konzentration des Sauerstoffs in der Messlösung. Die dargestellten Sauerstoffkonzentration wurden durch unterschiedliche Konzentrationen an Na_2SO_3 in Phosphat-Puffer eingestellt.

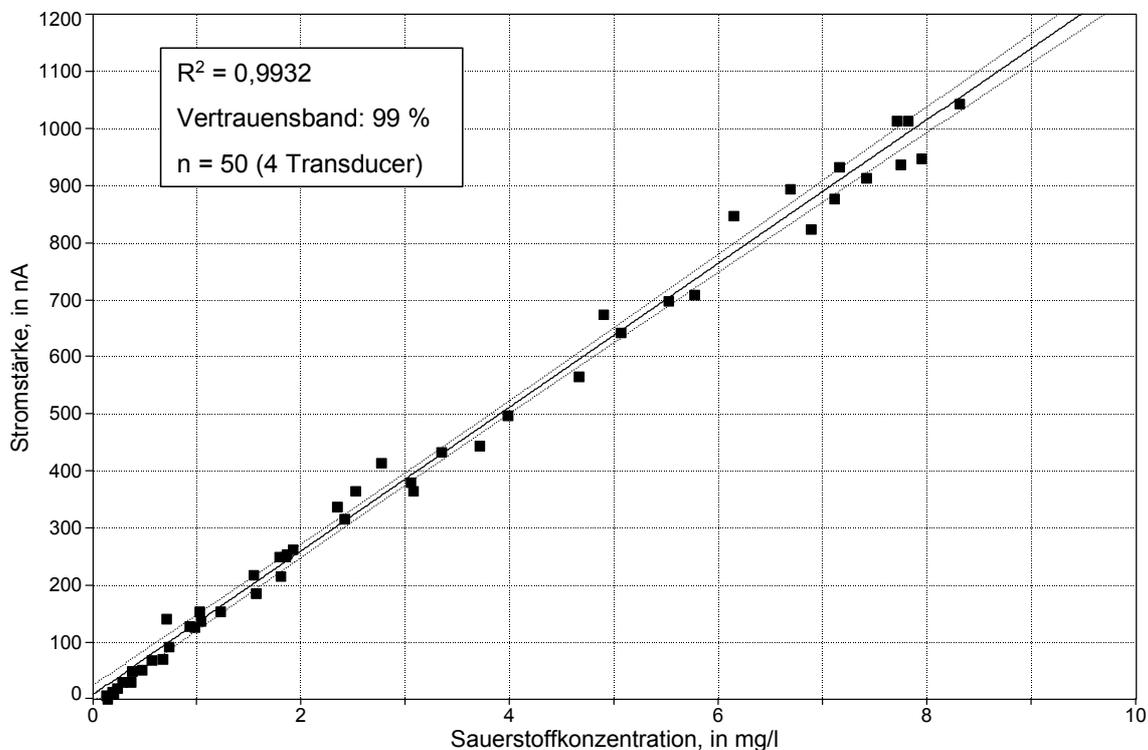


Abbildung 10: Abhängigkeit des Sensorsignals der Dickschichtelektroden von der Sauerstoffkonzentration. Die Fehlerbalken sind über den Variationskoeffizienten bei einer Anzahl von fünf Wiederholungsmessungen pro Konzentrationsstufe angegeben.

Unter Verwendung einer konventionellen Sauerstoffelektrode (Oximeter 323/Elektrode: CellOx 325, WTW GmbH, Weilheim) konnte durch Vergleichsmessungen eine lineare Abhängigkeit zwischen der Sauerstoffkonzentration in mg/l und des Stromsignals der Dickschichtelektroden in nA ermittelt werden. Bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,9937 wurde die Empfindlichkeit der Sensoren mit 125 nA pro $31 \mu\text{mol O}_2$ bestimmt. Diese lineare Abhängigkeit ist typisch für Sauerstoffelektroden, da der Stromfluss proportional zur Diffusionsrate des Sauerstoffs zur Kathode hin und somit proportional zum Sauerstoffpartialdruck des Messmediums ist [30].

3.1.5 Betriebsstabilität

Die Betriebsstabilität der Dickschichtelektroden wurde bei kontinuierlicher Polarisierung untersucht. In Abbildung 11 ist das Sensorsignal von zwei Transducern bei einer Dauerpolarisierung von 15 Stunden exemplarisch dargestellt. Über diesen Untersuchungszeitraum zeigten die Transducer einen vernachlässigbaren Signaldrift. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Sensoren eine Betriebsstabilität von bis zu 30 – 40 Stunden aufweisen.

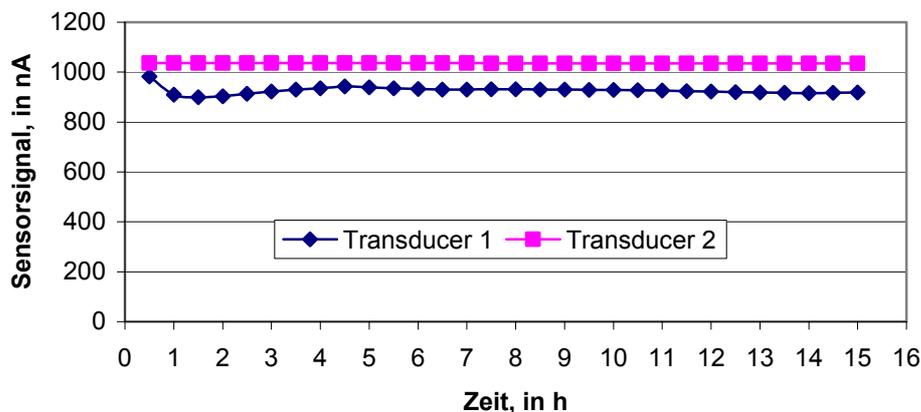


Abbildung 11: Signalstabilität der Sauerstoffdickschichtelektroden.

Diese Betriebsstabilität entspricht einer Steigerung der Stabilität um das bis zu Siebenfache mit in der Literatur beschriebenen Dickschicht- bzw. Dünnschichtelektroden und ist bemerkenswert im Hinblick auf das ursprüngliche Ziel der Entwicklung von Einweg-Sauerstoffsensoren [31]. Zurückzuführen ist dies sicherlich einerseits auf die Herstellung einer stabilen Arbeitselektrode und dem günstigen Elektrodenlayout, vor allem aber auf die Verwendung einer widerstandsfähigen Siliconmembran.

3.2 Immobilisierung nitrifizierender Mikroorganismen

Im Laufe der Entwicklung der miniaturisierten Nitrifikanten-Biosensoren wurde ermittelt, dass für die standardisierbare Produktion großer Stückzahlen an Sensoren vielfältige Anforderungen an die Einschussmatrix der Mikroorganismen sowie an die Immobilisierungstechnik zu erfüllen sind. Der Leitgedanke bei der Entwicklung dieser Biosensoren war es demnach, dass die Immobilisierungsprozedur möglichst anwenderfreundlich und mit einem geringen Zeitaufwand verbunden sein sollte, um so eine kostengünstige Biosensorproduktion realisieren zu können. Ein Schwerpunkt der

Forschungsarbeit war es deshalb, die Eignung verschiedener Polymere und –mischungen für den Einschluss der nitrifizierenden Mikroorganismen zu untersuchen.

3.2.1 Test verschiedener Polymere

Zunächst wurde ein Polymergemisch bestehend aus einem Polyvinylalkohol und einem Polyurethan zur Immobilisierung eingesetzt und gemäß Herstellerangaben (IPK Gatersleben) verarbeitet. Dazu musste lediglich die Biomasse mit den Polymeren gemischt werden. Der Nachteil dieses Polymergemisches bestand aber in der geringen mechanischen Festigkeit des Immobilisates, so dass es nur für die Herstellung von mikrobiellen Sensoren eingesetzt werden kann, deren Immobilisat über eine zusätzliche Membran auf dem Transduktor fixiert wird. Im Falle der miniaturisierten planaren Sensoren ist solch eine Fixierung technisch nicht realisierbar, so dass dieses Polymergemisch nicht als Matrix für die weiteren Untersuchungen in Betracht gezogen wurde.

Die Untersuchungen zeigten, dass das Polymer PCS prinzipiell für diese Anwendung geeignet ist. Es wird sowohl für die Herstellung mikrobieller als auch enzymatischer Sensoren eingesetzt. Für die Produktion hoher Stückzahlen von mikrobiellen Sensoren erwies es sich jedoch aufgrund der komplizierten Handhabung als nicht praktikabel [32,33,17]. Versuche, Immobilisate aus der kombinierten Anwendung von PCS und Alginat herzustellen, erhöhte lediglich den Herstellungsaufwand; es wurde deshalb nicht als Einschlussmatrix in Betracht gezogen.

Es zeigte sich, dass ein photovernetzbares Polymer auf der Basis eines Polyvinylalkohols (PVA-SbQ) für diese Anwendung geeignet ist. Dieses Polymer wird neuerdings häufiger zur Biosensorherstellung eingesetzt. So wurde dessen Einsatz sowohl bereits für den Einschluss von Mikroorganismen, Enzymen, Pflanzenzellen als auch zur Immobilisierung von nitrifizierendem belebtem Schlamm beschrieben [34,35,36]. Es zeichnet sich besonders durch seine einfache Anwendung aus. Die Polymerlösung wird lediglich mit der Biomasse gemischt und anschließend durch Belichten verfestigt. Dabei erfolgt die Polymerisierung des Polyvinylalkohols über photosensitive Styrylpyridiniumgruppen, die durch Absorption von Licht im Wellenlängenbereich zwischen 300 – 460 nm quervernetzen [37]. Eigene Untersuchungen über UV/VIS-Spektrometrie (UV/VIS-Spektrometer, Lambda 5, Perkin-Elmer, Überlingen) ergaben ein Absorptionsmaximum einer 40%-igen PVA-SbQ-Lösung in einem Wellenlängenbereich von 390 nm bis 420 nm (Scan-Rate: 30 nm/min).

3.3 Bestimmung nitrifizierbarer Verbindungen – der N-BSB

Zur Erfassung und Quantifizierung nitrifizierbarer Verbindungen wurden Untersuchungen mit Standardnitrifikationssubstraten durchgeführt und die Sensorreaktionen auf Aminosäuren sowie der N-BSB einer Abwasserprobe bestimmt.

3.3.1 Quantifizierung von Ammonium

Abbildung 12 zeigt die Abhängigkeit der Sensorsignale von sieben Biosensoren von der NH_4^+ -N-Konzentration. Aufgetragen ist hier die relative Sensoraktivität gegen die Konzentration an Ammoniumstickstoff. An die Messwerte konnte eine Sättigungsfunktion analog der Michaelis-Menten-Kinetik angepasst werden.

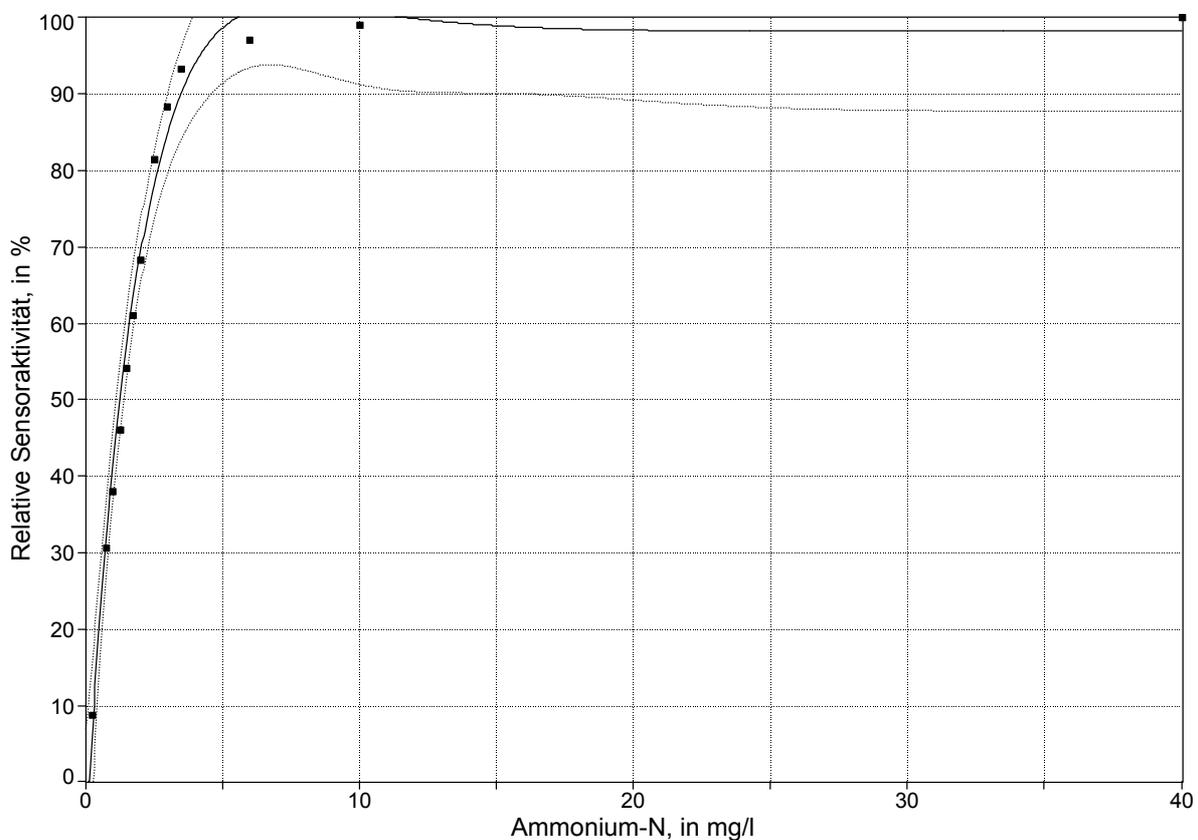


Abbildung 12: Abhängigkeit des Nitrifikanten-Biosensorsignals von Ammonium. Anpassung der Messwerte an eine Sättigungsfunktion. Die einzelnen Messpunkte stellen Mittelwerte aus einer siebenfachen Konzentrationsbestimmung dar (app. $K_m = 1,29 \text{ mg/l NH}_4^+$ -N, $R^2 = 0,9925$, Vertrauensband: 99 %).

Die berechnete scheinbare Michaelis-Menten-Konstante (app. K_m) wurde mit $1,29 \text{ mg/l NH}_4^+$ -N ermittelt, wobei man unter dem K_m -Wert allgemein die Substratkonzentration versteht, bei der die halbmaximale Geschwindigkeit einer enzymati-

schen Umsetzung erreicht wird. Nach einer zunächst linearen Konzentrationsabhängigkeit flacht die Kurve mit zunehmender Substratkonzentration ab und geht in den Bereich der Substratsättigung über. Um die ermittelte Funktion wurde in der Abbildung ein Vertrauensband mit einer statistischen Sicherheit von 99 % gelegt. Der lineare Bereich, der zur Quantifizierung von Ammonium herangezogen wird, ist in Abbildung 13 dargestellt. Dabei wurden die Messwerte aus dem Mittelwert jeweils einer siebenfachen Bestimmung der einzelnen Konzentrationsstufen erhalten. Zu erkennen ist, dass sich der lineare Messbereich bis ca. 2 mg/l $\text{NH}_4^+\text{-N}$ erstreckt, wobei der mittlere Variationskoeffizient 5,3 % betrug. Nach DIN 32645 wurde die Nachweisgrenze mit $63,5 \mu\text{g/l NH}_4^+\text{-N}$ und die Bestimmungsgrenze mit $216,9 \mu\text{g/l NH}_4^+\text{-N}$ ermittelt [38]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Nitrifikanten-Biosensoren eine reproduzierbare Ammoniumbestimmung erlauben und hinsichtlich der Zuverlässigkeit vergleichbar mit in der Literatur beschriebenen mikrobiellen Sensoren sind [39,40,41].

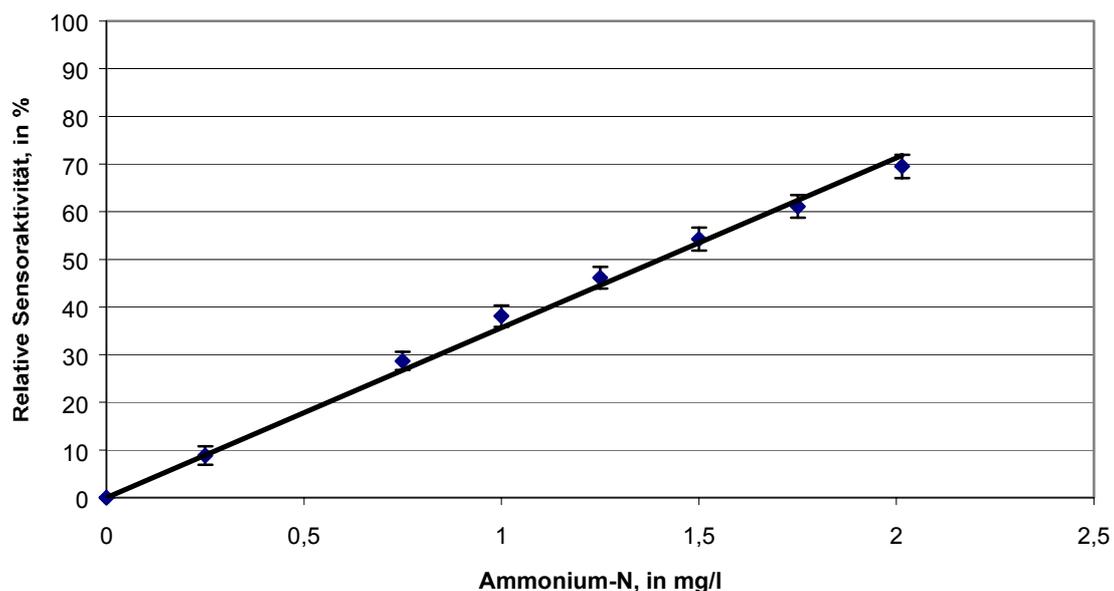


Abbildung 13: Linearer Bereich von Nitrifikanten-Biosensoren bei der Quantifizierung von Ammonium ($R^2 = 0,9953$, Nachweisgrenze: $63,5 \mu\text{g/l NH}_4^+\text{-N}$, Bestimmungsgrenze = $216,9 \mu\text{g/l NH}_4^+\text{-N}$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung ($n = 7$).

3.3.2 Quantifizierung von Harnstoff und Nitrit

Anhand von Versuchen mit Harnstoff und Kaliumnitrit wurde die Sensorreaktion auf zwei weitere Substrate des Nitrifikantenstoffwechsels untersucht. Harnstoff ist von Interesse, da er in häuslichem Abwasser als Abbauprodukt von Proteinen vorkommt. Nitrit befindet sich zumeist nicht im häuslichen Abwasser. Das Ansprechverhalten der Biosensoren gegenüber Nitrit ist jedoch von Interesse, da es sich dabei um das Substrat der zweiten Nitrifikationsstufe (Nitratation) handelt.

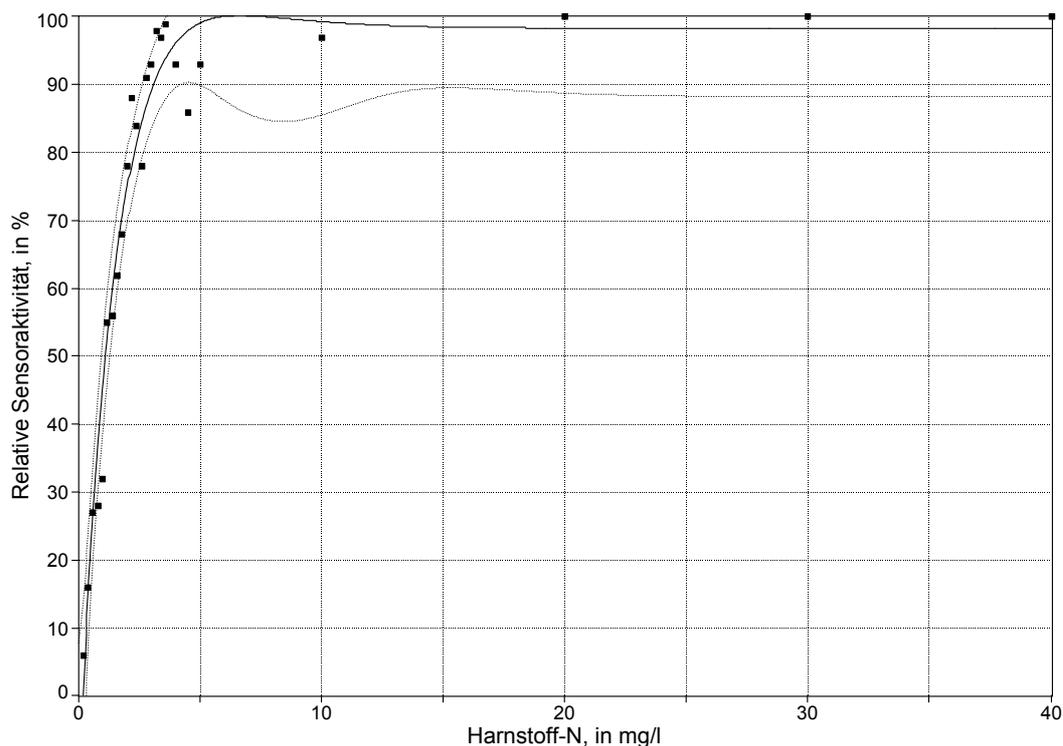


Abbildung 14: Abhängigkeit des Nitrifikanten-Biosensorsignals vom Nitrifikationssubstrat Harnstoff. Anpassung der Messwerte an eine Sättigungsfunktion ($n = 25$, app. $K_m = 1,15$ mg/l Harnstoff-N, $R^2 = 0,9643$, Vertrauensband 99 %).

In Abbildung 14 und Abbildung 15 ist die Konzentrationsabhängigkeit der Aktivität der Biosensoren auf Harnstoff und auf Nitrit dargestellt. Zu erkennen ist, dass die Sensoren in beiden Fällen wie auf die Verwertung von Ammonium mit einer Sättigungskinetik ansprechen. Der lineare Bereich der Sensoren erstreckt sich bei Harnstoff bis ca. 2,5 mg/l Harnstoff-N und bei Nitrit bis zu einer Konzentration von 4,5 mg/l NO_2^- -N. Die Ergebnisse zeigen somit, dass eine Quantifizierung von Substraten, sowohl der ersten als auch der zweiten Nitrifikationsstufe, mit den Biosensoren möglich ist.

Die apparenten Michaelis-Menten-Konstanten der Untersuchungen von Ammonium (app. $K_m = 1,29 \text{ mg/l NH}_4^+ \text{-N}$) und Harnstoff (app. $K_m = 1,15 \text{ mg/l Harnstoff-N}$) sind nahezu identisch, was darauf schließen lässt, dass die Nitrifikanten diese beiden Verbindungen in ähnlicher Weise verwerten. Die Ammoniumoxidierer können somit neben der Oxidation von Ammonium auch Harnstoff umsetzen [42]. Dabei werden vermutlich im Falle des Harnstoffs zunächst die beiden Aminogruppen des Harnstoffs hydrolysiert, bevor sie dem Enzymsystem der Ammoniumoxidierer als Ammonium bzw. Ammoniak in der Messlösung zur Verfügung stehen. Im Gegensatz dazu wird bei der Quantifizierung von Nitrit deutlich, dass an der Umsetzung von Nitrit ein anderes Enzymsystem (vermutlich Nitritoxidoreduktase der Nitritoxidierer) beteiligt ist, da die app. K_m für Nitrit ungefähr um das Sechsfache höher ist als die app. K_m bei der Quantifizierung von Ammonium- bzw. Harnstoff. Einen Hinweis auf die geringere Affinität von Nitrit zur Nitritoxidoreduktase im Vergleich zu Ammonium zum Enzymsystem der Ammoniumoxidierer geben auch kinetische Untersuchungen zum Wachstum von *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* in einem Temperaturbereich zwischen 25 °C und 30 °C von KNOWLES *et al.* (1965) und VAN HAANDEL *et al.* (1982). Dabei wurde ermittelt, dass der Sättigungsbeiwert K_{NO_2} für das Wachstum von *Nitrobacter* grundsätzlich höher ist als K_{NH_4} von *Nitrosomonas* [43,44].

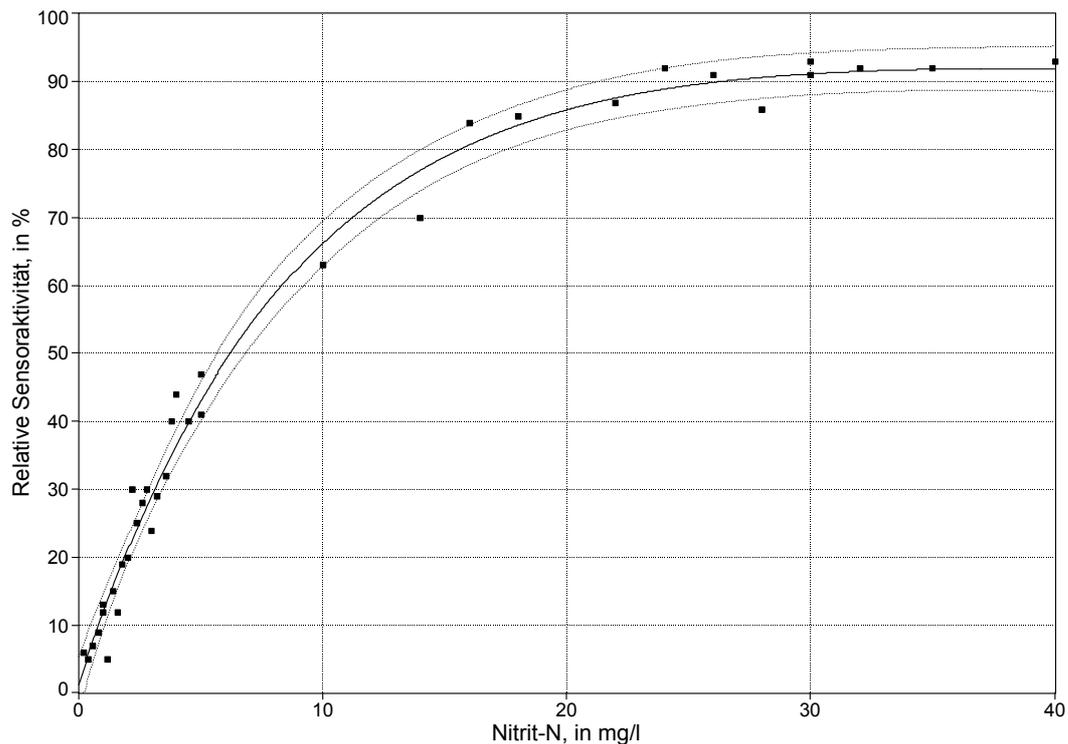


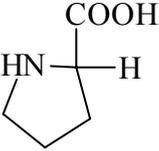
Abbildung 15: Abhängigkeit des Nitrifikanten-Biosensorsignals von der Nitritkonzentration. Anpassung der Messwerte an eine Sättigungsfunktion ($n = 39$, app. $K_m = 6,22$ mg/l Nitrit-N, $R^2 = 0,9895$, Vertrauensband 99 %).

3.3.3 Nitrifizierbarkeit von Aminosäuren

Neben der Quantifizierung von Standardnitrifikationssubstraten wurde untersucht, inwieweit die Nitrifikanten Verbindungen verwerten, in denen Stickstoff in organisch gebundener Form vorliegt. Für diese Versuche wurden als Testsubstanzen Aminosäuren ausgewählt, da diese als Grundbausteine der Proteine in kommunalen Rohabwässern in relativ hohen Konzentrationen bis zu 10 mg/l vorkommen können [45]. Tabelle 4 gibt einen Überblick über die untersuchten Aminosäuren. Dabei richtete sich die Auswahl der Aminosäuren maßgeblich nach der Zahl der Stickstoffatome und der Bindung des Stickstoffs im Molekül. Zur besseren Unterscheidung der Aminosäuren werden diese im Folgenden nach der Anzahl der Stickstoffatome im Molekül als „1N-“ bis „4N-Aminosäuren“ benannt. Für die Untersuchungen von „1N – Aminosäuren“ wurden Alanin, Serin, Glutaminsäure und Cystein ausgewählt, bei denen der Stickstoff in einer primären Aminogruppe gebunden vorliegt. Weitere Versuche wurden mit der heterocyclischen „1N-Aminosäure“ Prolin durchgeführt, in der der Stickstoff in Form einer sekundären Aminogruppe im Molekül gebunden ist. Als „2N

– Aminosäuren“ wurden Glutamin und Cystin ausgewählt. Arginin enthält vier Stickstoffatome je Molekül, wobei eine in Form einer primären Aminogruppen vorliegt, während sich die drei anderen in einer Guanidinogruppe befinden. In Abbildung 16 sind die Ergebnisse dieser Versuche graphisch dargestellt. Dabei ist die relative Sensoraktivität gegen die Molarität der Testsubstanzen (20 μM – 80 μM) aufgetragen. Mit Ausnahme von Prolin wurde eine weitgehend lineare Abhängigkeit zwischen den Sensoraktivitäten und den Aminosäurenkonzentrationen gefunden. Des weiteren ist zu erkennen, dass die Biosensoren auf gleiche Konzentrationen der „1N-Aminosäuren“ Alanin, Serin, Glutaminsäure und Cystein mit vergleichbaren Signalthöhe reagierten, wobei die Aktivitäten bei einer Konzentration von 20 μM durchschnittlich 6 %, bei 50 μM 11 % und bei 80 μM 16 % betragen. In etwa doppelt so hohe Signale lieferten die Sensoren beim Vorliegen der „2N-Aminosäure“ Cystin, während sie Arginin mit einer ca. vierfach höheren Sensorantwort erfassten. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Höhe der Sensorsignale offensichtlich mit der Zahl der Stickstoffatome im Molekül korreliert. In Abweichung dazu betrug die Sensorsignalthöhe bei Glutamin („2N – Aminosäure“) in etwa das vierfache der Signalthöhe der „1 N-Aminosäuren“.

Tabelle 4: Auswahl an Aminosäuren zur Bestimmung des N-BSB

Aminosäure	Strukturformel	Anzahl N-Atome/Molekül
Alanin	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	1
Serin	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{OH} \end{array}$	1
Cystein	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CH}_2\text{SH} \end{array}$	1
Glutaminsäure	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{COOH} \end{array}$	1
Prolin		1
Cystin	$\begin{array}{c} \text{COOH} \qquad \text{COOH} \\ \qquad \qquad \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \quad \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \qquad \qquad \\ \text{CH}_2-\text{S}-\text{S}-\text{CH}_2 \end{array}$	2
Glutamin	$\begin{array}{c} \text{COOH} \\ \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{H}-\text{C}-\text{H} \\ \\ \text{CONH}_2 \end{array}$	2
Arginin	$\begin{array}{c} \text{COOH} \qquad \qquad \text{H}_2\text{N} \\ \qquad \qquad \qquad \diagdown \\ \text{H}_2\text{N}-\text{C}-\text{H} \qquad \qquad \text{C}=\text{NH} \\ \qquad \qquad \qquad / \\ \text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH} \end{array}$	4

Bei der Interpretation der Ergebnisse ist zu beachten, dass die Nitrifikantenmischkulturen einen gewissen Anteil an Fremdorganismen wie z.B. heterotrophen Mikroorganismen enthalten, woraus ein erhöhter Sauerstoffverbrauch in Folge der Veratmung von organischem Kohlenstoff resultiert [42]. Die Sensoren erfassen Ammonium mit der dreifach höheren Signalstärke als die „1N-Aminosäuren“. Den Nitrifikanten steht Ammonium direkt für den Stoffwechsel zur Verfügung, während organischer Stickstoff durch Ammonifikation zunächst zu NH_4^+ mineralisiert werden muss [46]. Es ist möglich, dass eine vollständige Ammonifikation innerhalb der Messzeit nicht erfolgt. Prolin wird von den Sensoren praktisch nicht erfasst. Wahrscheinlich ist der Stickstoff aufgrund der Bindung im Heterocyclus schwieriger freisetzbar.

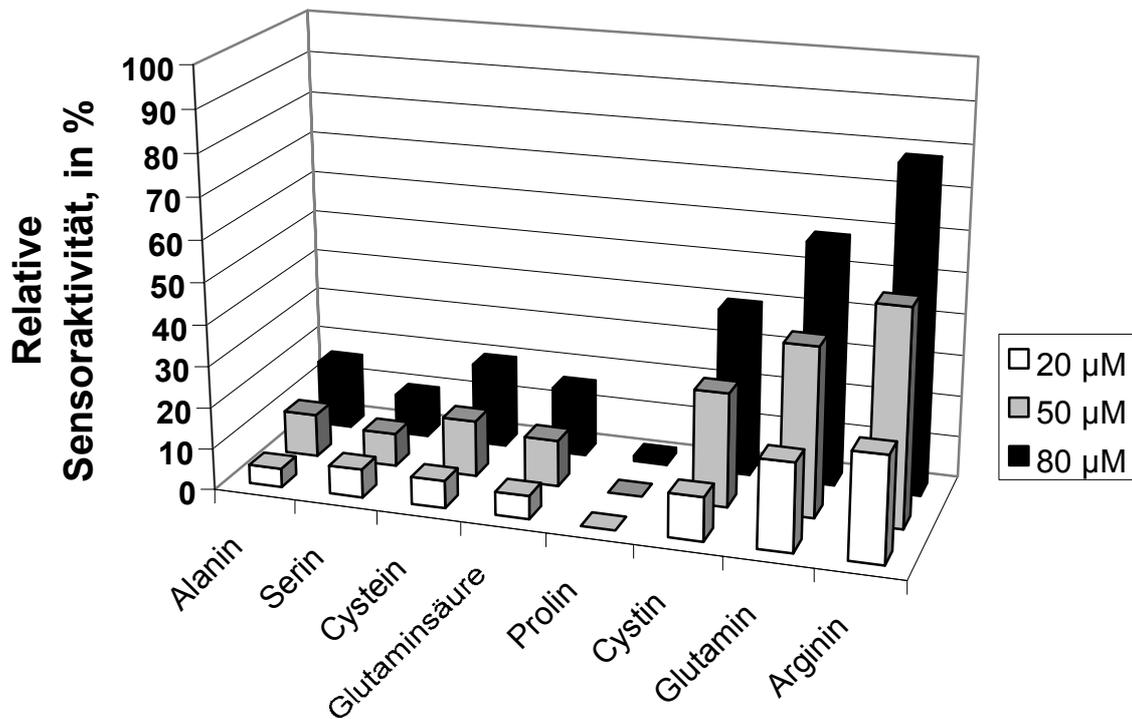


Abbildung 16: Abhängigkeit der Biosensoraktivität von der Konzentration verschiedener Aminosäuren und Ammonium.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Biosensoren eine Detektion und Quantifizierung von Aminosäuren erlauben, wobei strukturelle Unterschiede der Aminosäuren eine Rolle spielen. Über die genauen Abbauwege und –mechanismen

sowie die beteiligten Mikroorganismen können diese Untersuchungen allerdings keine Aussage machen. Zur genaueren Klärung dieser Sachverhalte wären gezieltere Untersuchungen zur Struktur-/Wirkungsbeziehung notwendig.

3.3.4 Nitrifizierbarkeit von Abwasserinhaltsstoffen

Die Untersuchungen zur Nitrifizierbarkeit von Aminosäuren ergaben, dass das Nitrifikantenimmobilisat Aminosäuren verwertet. Weitere Untersuchungen sollten zeigen, inwieweit die Biosensoren Nitrifikationssubstrate *direkt im Abwasser* detektieren können. Exemplarisch werden dazu die Ergebnisse der Untersuchung einer Abwasserprobe des Kläranlagenzulaufs des Lehr- und Forschungsklärwerts Stuttgart-Büsnau in diesem Bericht präsentiert. Zur Durchführung dieser Versuche wurden zunächst die Nitrifikanten-Biosensoren mit Ammonium kalibriert. Für die Bestimmung des N-BSB der Abwasserprobe wurde mit Hilfe der zuvor aufgenommenen Kalibrierfunktionen die mit den Sensoren registrierte Sauerstoffzehrung auf die entsprechende NH_4^+ -N-Konzentration bzw. auf den Gehalt an nitrifizierbarem Stickstoff umgerechnet und als Sensor-N angegeben.

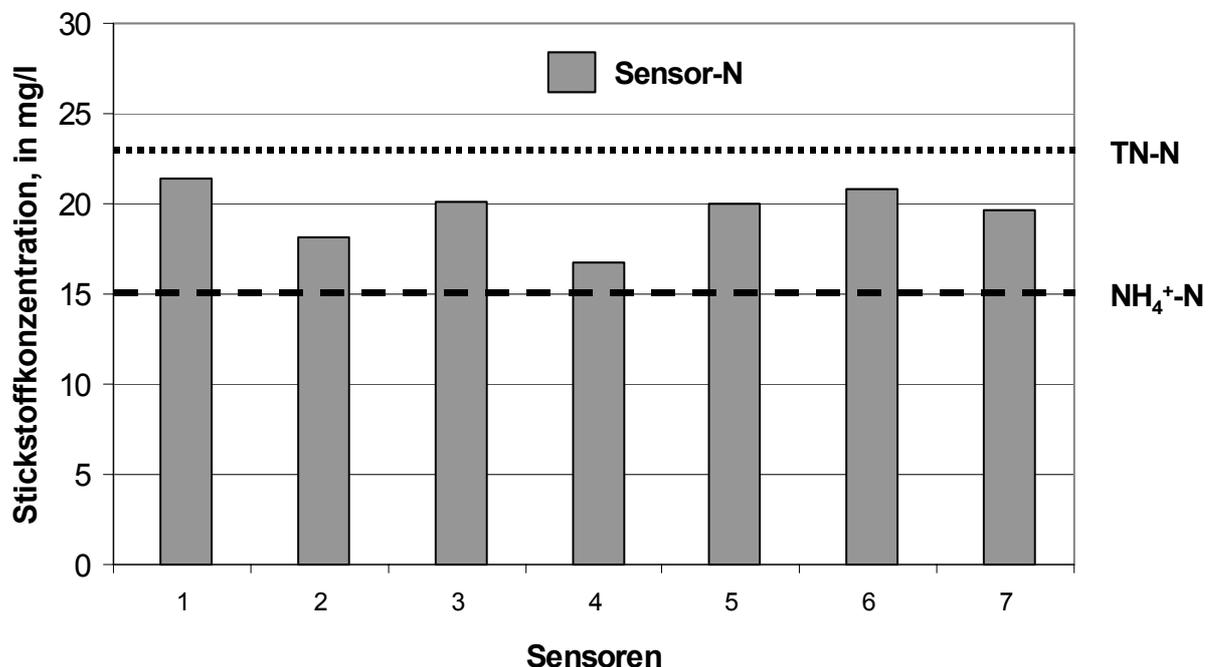


Abbildung 17: Quantifizierung nitrifizierbarer Verbindungen in einer Abwasserprobe. Dem jeweiligen Sensor-N ist die Konzentration an Ammonium- und Gesamtstickstoff des Abwassers gegenübergestellt.

Abbildung 17 zeigt die mit den Biosensoren (Sensor-N) ermittelten Stickstoffkonzentrationen der Zulaufprobe. Zusätzlich zum Sensor-N ist die konventionell bestimmte Konzentration an Ammonium- (NH_4^+ -N) und Gesamtstickstoff (TN) der Abwasserprobe dargestellt. Es ist zu erkennen, dass eine Korrelation zwischen dem Sensor-N und den beiden Stickstoffparametern besteht. Die Stickstoffkonzentration des Abwassers wurde mit den Sensoren um durchschnittlich 4,3 % höher als die tatsächliche NH_4^+ -N- und 3,6 % niedriger als die TN-Konzentration bestimmt. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Sensoren sowohl Ammonium als auch weitere Stickstoffverbindungen des Abwassers erfassen. Die Minderbefunde des Sensor-N im Vergleich zum Gesamtstickstoff machen jedoch wie zu erwarten und schon unter 3.3.3 erwähnt deutlich, dass nicht sämtliche Stickstoffverbindungen von den Sensoren detektierbar sind.

3.4 Bestimmung nitrifikationshemmender Effekte

3.4.1 Untersuchungen mit ATH

Da die Nitrifikanten-Biosensoren primär zur Überwachung der Nitrifikationshemmung in Abwasserreinigungsanlagen entwickelt wurden, erfolgte eine Charakterisierung der Biosensoren anhand umfangreicher Untersuchungen mit dem Standardhemmstoff Allylthioharnstoff (ATH). ATH wurde als Inhibitor für diese Untersuchungen ausgewählt, da es sich dabei um einen bereits vielfach untersuchten, selektiv wirkenden Hemmstoff der ersten Nitrifikationsstufe handelt und deswegen auch bei der Bestimmung des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB) zur Unterdrückung der Nitrifikation eingesetzt wird [47,48].

3.4.1.1 Sensitivität und Reproduzierbarkeit

In Abbildung 18 ist die Abhängigkeit des Biosensorsignals von der ATH Konzentration dargestellt. Dabei ist die gemessene Stromstärke gegen den Logarithmus der ATH-Konzentration aufgetragen, so dass sich eine bei Toxizitätsmessung häufig auftretende sigmoide Kurve ergibt [49]. Zur Quantifizierung des Hemmeffektes einer Testsubstanz wird in der Regel der IC_{50} -Wert herangezogen, der die Sensitivität eines Messsystems beschreibt. Das ist die Inhibitorkonzentration, bei der eine 50%-ige Hemmwirkung im Vergleich zum Kontrollwert beobachtet wird [50].

Obwohl die Stromstärke nach Zugabe eines Hemmstoffes (vgl. 2.5.2) ansteigt, ergeben sich die Messwerte bei der graphischen Darstellung der Konzentrationsabhän-

gigkeit als negative Signale. Auf diese Weise kann im Gegensatz zur Bestimmung nitrifizierbarer Verbindungen (N-BSB) eine Verminderung der Atmungsaktivität erfasst werden [42].

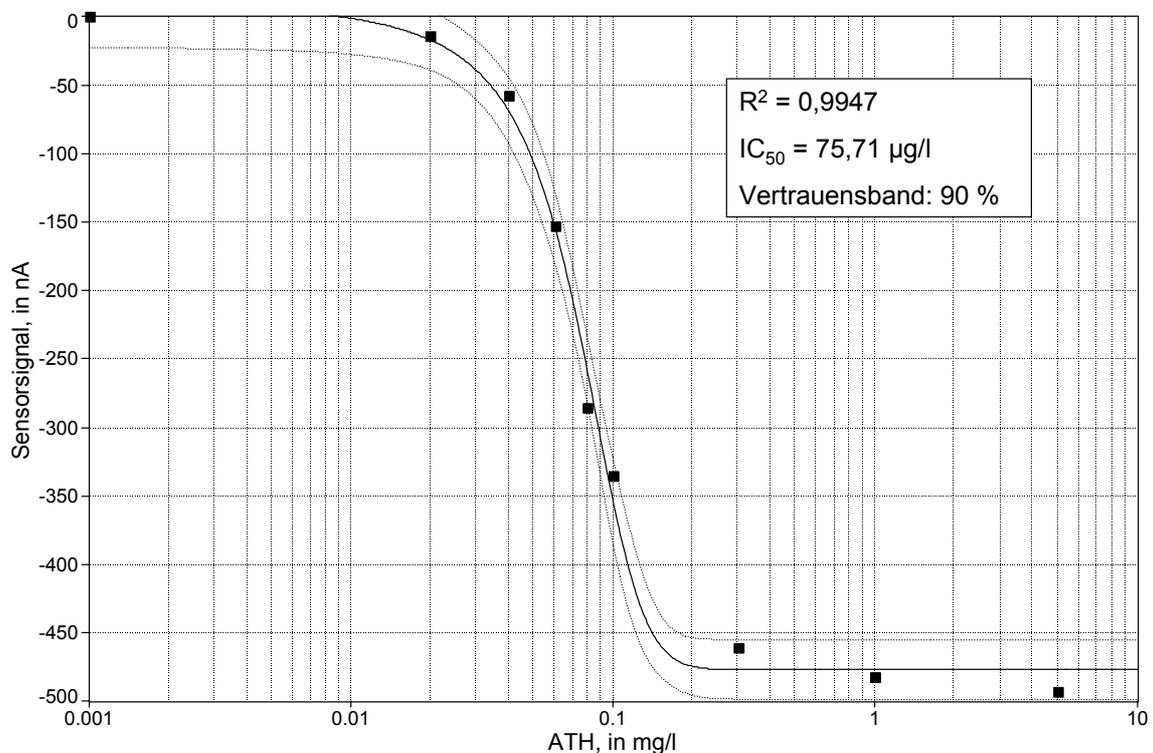


Abbildung 18: Abhängigkeit des Signals der Nitrifikanten-Biosensoren von der ATH-Konzentration bei Auswertung der Strom-Zeit-Kurven nach der Endpunktmethode. Anpassung einer sigmoiden Funktion an die Messwerte (Mittelwert aus 23 Messungen).

Abbildung 19 zeigt die Sensorreaktion auf unterschiedliche ATH-Konzentrationen bei Anwendung der dynamische Auswertemethode. Dabei wird die Steigung im linearen Bereich des Stromsignalanstiegs nach erfolgter Hemmstoffdosierung als Maß für den Hemmeffekt der jeweiligen Konzentrationsstufe herangezogen. Für den Messmodus nach der Endpunktmethode wurde die Empfindlichkeit der Sensoren mit einer IC_{50} von $75,7 \mu\text{g/l}$ ATH bei 23 Messungen ermittelt. Die prozentuale Standardabweichung betrug dabei $13,9 \%$. Für die Auswertung nach der dynamischer Messmethode wurde eine 1,4- bis 2,3-fache unempfindlichere 50%ige-Hemmwirkung von $144,5 \mu\text{g/l}$ ATH ermittelt. Der Variationskoeffizient betrug in diesem Fall $15,2 \%$. Die Reproduzierbarkeit bezogen auf Wiederholungsmessungen pro Einzelsensoren wurde mit Variationskoeffizienten im Bereich zwischen 8 und 13% bestimmt.

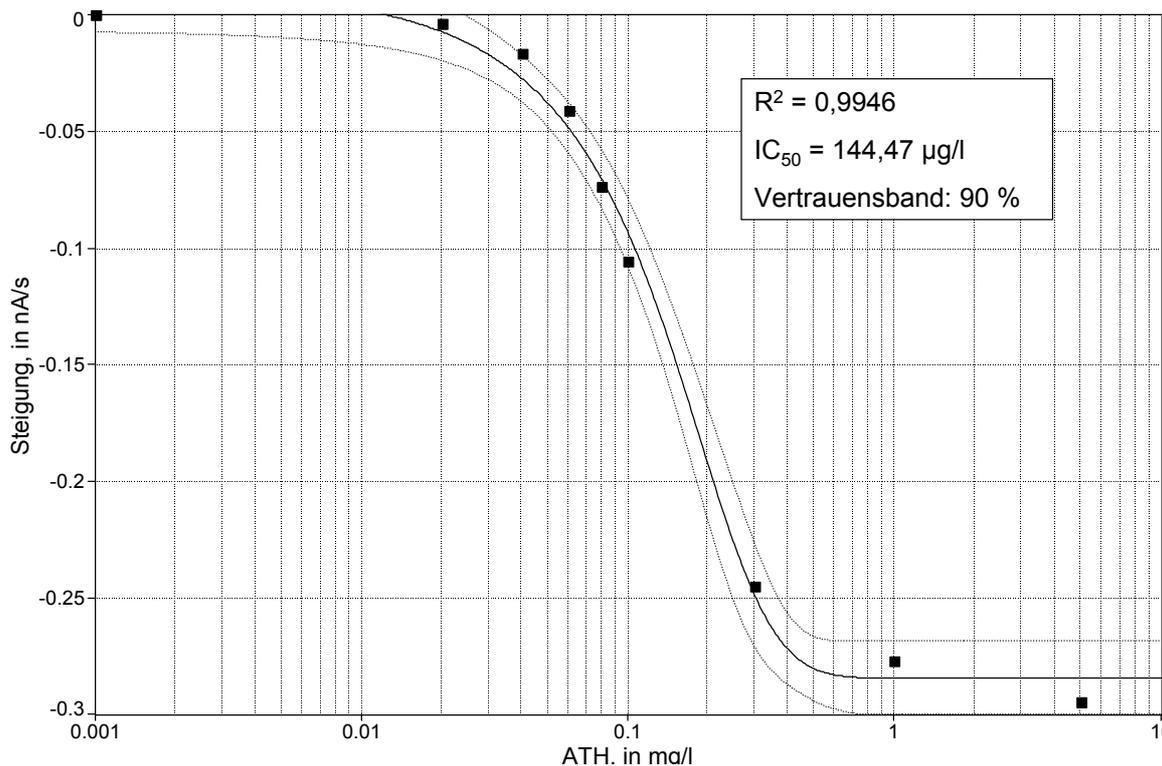


Abbildung 19: Abhängigkeit des Signals der Nitrifikanten-Biosensoren von der ATH-Konzentration bei der Auswertung der Strom-Zeit-Kurven nach der dynamische Methode (Mittelwerte aus 23 Messungen).

3.4.1.2 Lagerungsstabilität

Zur Bestimmung der Lagerungsstabilität der Biosensoren wurden über einen Zeitraum von vier Wochen Wiederholungsmessungen mit ATH durchgeführt. Abbildung 20 zeigt exemplarisch die Abhängigkeit des Sensorsignals eines Biosensors von der ATH-Konzentration über eine Versuchsphase von zwei Wochen. Zusätzlich ist in Abbildung 21 die Aktivität und die Empfindlichkeit dieses Sensors dargestellt. Dabei wurde, entgegen der unter 2.5.1 und 2.5.2 beschriebenen Methoden, als Maß für die Aktivität der Biosensoren das maximale Biosensorsignal bei einer Exposition der Biosensoren in einer Hemmstoffmesslösung mit einer Konzentration von 10 mg/l ATH definiert, während die Empfindlichkeit über die 50%ige Hemmung charakterisiert wurde. Dabei wurde nach der Endpunktmethode eine IC_{50} von 77 $\mu\text{g/l}$ ATH bei einem Variationskoeffizienten von 8,3 % ermittelt. Zu erkennen ist, dass der Sensor über diesen Zeitraum praktisch keinen Verlust an Aktivität bei gleichzeitig konstanter Empfindlichkeit aufwies. Die Lagerung der Sensoren erfolgte bei + 4°C bzw. Raumtempe-

ratur. Zusätzliche Untersuchungen ergaben, dass praktisch kein Unterschied zwischen der Sensorperformance und der Lagerungsbedingungen in einem Zeitraum von zwei Wochen besteht. Wenngleich das Nitrifikantenimmobilisat bis zu vier Wochen für Hemmstoffuntersuchungen eingesetzt werden kann, wird die Verwendungshäufigkeit der Biosensoren jedoch durch die Stabilität des Immobilisates auf den Elektroden eingeschränkt und ist i.d.R nach fünf Messungen nicht mehr gewährleistet. In Anbetracht des Ziels der Herstellung von Einweg-Sensoren ist dies jedoch als ausreichend zu bewerten.

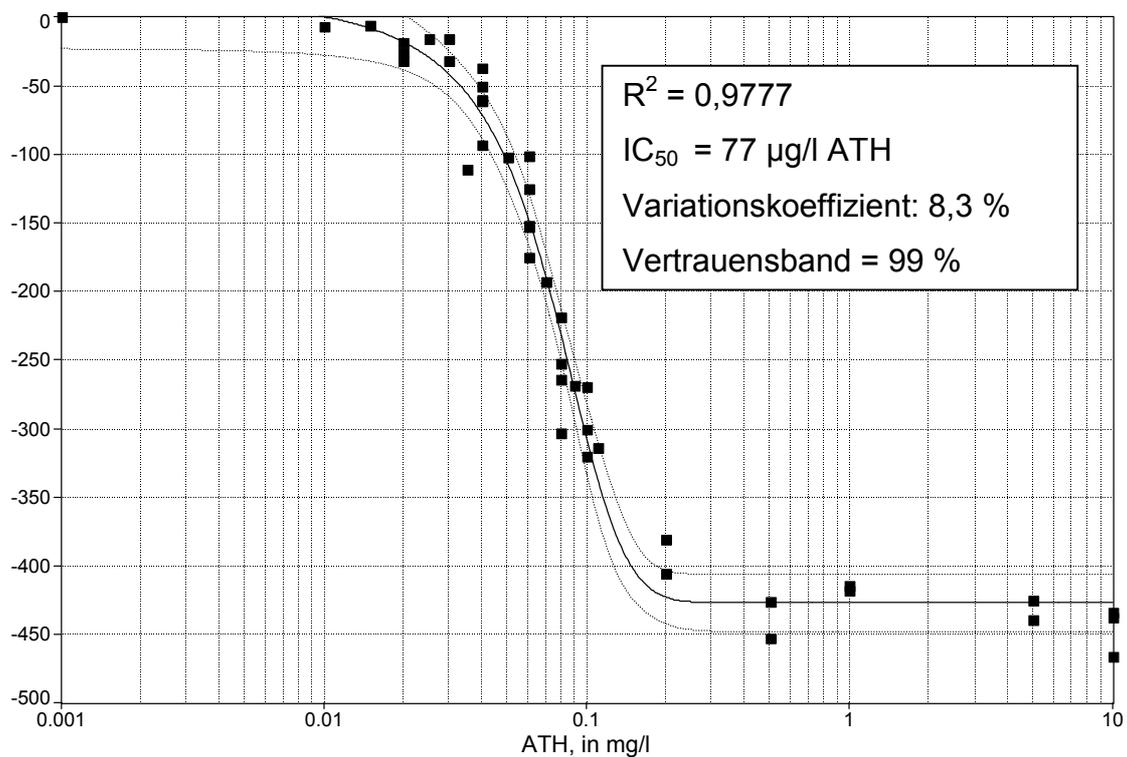


Abbildung 20: Abhängigkeit des Nitrifikantensensorsignals von der ATH-Konzentration bei der Verwendung eines Sensors über einen Zeitraum von zwei Wochen (n = 44).

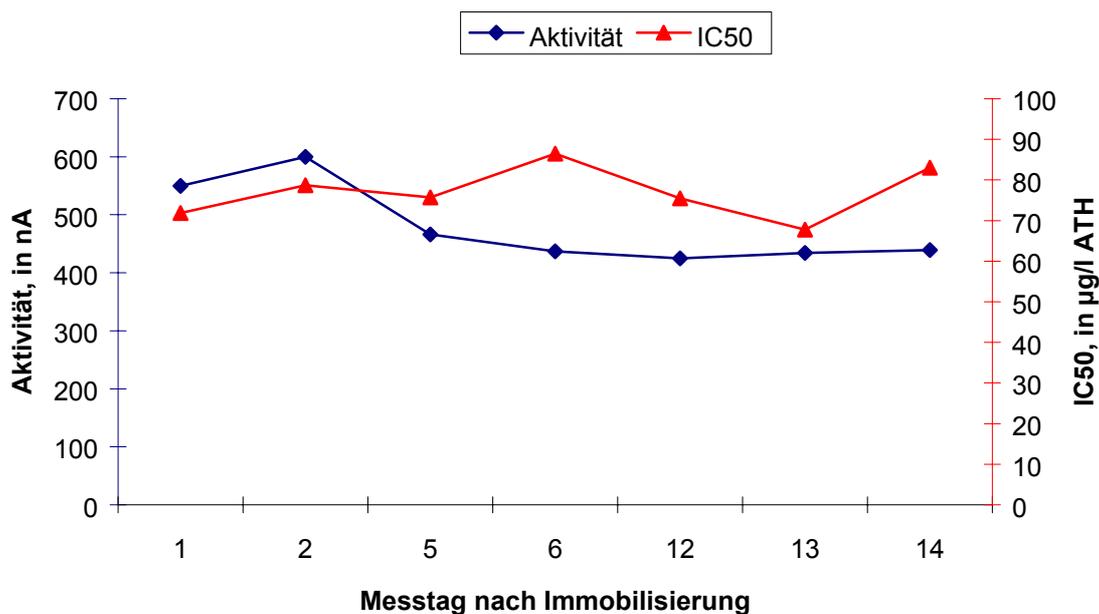


Abbildung 21: Darstellung der Aktivität und Empfindlichkeit eines Biosensors über einen Zeitraum von zwei Wochen.

3.4.1.3 Betriebsparameter des Biosensormesssystems

Zu Beginn einer Hemmstoffuntersuchung erfolgt zunächst die Polarisierung der Biosensoren in ammoniumhaltiger Phosphat-Pufferlösung. Für die Einstellung des Basissignals benötigen die Sensoren in der Regel maximal 30 Minuten. Diese Equilibrierungsphase setzt sich aus verschiedenen, sich überlagernden Effekten am Sensor zusammen und wird sowohl vom Sauerstoffsensor selbst, als auch von Prozessen im Immobilisat beeinflusst. Seitens der Sauerstoffelektroden erfordert die Einstellung eines stabilen Basissignals eine konstante Sauerstoffreduktionsrate am Sensor, während die nitrifizierende Biomasse des Immobilisates eine weitgehend konstante Stoffwechselleistung erreichen muss. Diese beiden Effekten werden durch Diffusionsvorgänge im Immobilisat bestimmt, da das Biomasse/Polymeregemisch eine Barriere gegenüber den Sauerstoff-, Nährstoff- bzw. Hemmstoffmolekülen darstellt. Nach Einstellung des Sensorbasissignals beträgt die Ansprechzeit der Biosensoren nach Hemmstoffdosierung bis zum Erreichen eines stabilen Sensorsignals (t_{100}) zwischen 10 und 20 Minuten, während 90 % des Signals (t_{90}) innerhalb von 5 bis 10 Minuten eingestellt ist. Zuletzt wird für die Kalibrierung der Biosensoren zur Bestimmung der maximalen Hemmung (vgl. 2.5.2) eine ATH-Konzentration von 10 mg/l in die Messzelle dosiert, so dass nach weiteren 15 Minuten der Messvorgang beendet ist. Die gesamte Messdauer für die Bestimmung der Hemmwirkung einer Probe kann

durch die Parallelisierung des Messvorgang somit innerhalb von ungefähr einer Stunde erfolgen (vgl. Tabelle 5). Dies ist ein deutlicher Zeitgewinn im Vergleich zu dem bislang am ISWA für Hemmstoffuntersuchungen eingesetzten Nitrifikanten-Biosensor (Einzelsensor), mit dem zur Quantifizierung des Hemmeffektes einer Probe ein Tag benötigt wurde. Hinsichtlich der Regenerationsfähigkeit der miniaturisierten Nitrifikanten-Biosensoren wurde ermittelt, dass die Biosensoren im Falle maximaler Hemmung durch ATH mehr als fünf Stunden zur Erholung benötigen und somit einmal pro Tag eingesetzt werden können. Zur vollständigen Regeneration hat es sich als günstig erwiesen, die Biosensoren für 24 Stunden in ammoniumhaltiger Nährlösung bei Raumtemperatur aufzubewahren.

Tabelle 5: Betriebsparameter des Biosensormesssystems; ermittelt anhand von Untersuchungen mit ATH

Parameter	Wert
IC ₅₀ (Endpunktmethode) (Variationskoeffizient)	75,7 µg/l (13,9 %)
IC ₅₀ (dynamische Methode) (Variationskoeffizient)	144,5 µg/l (15,2 %)
Equilibrierungsphase	< 30 min
Ansprechzeit t ₉₀	5 – 10 min
t ₁₀₀	10 - 20 min
Sensorkalibrierung	15 Minuten
Messdauer/Probe	ca. 1 h
Regenerationsphase	24 h bei Raumtemperatur
Lagerungsstabilität	> 2 Wochen (Lagerung bei+ 4°C)

3.4.2 Bestimmung der nitrifikationshemmenden Wirkung von Umweltchemikalien und realen Abwasserproben – Vergleichsuntersuchungen mit dem Biosensorsystem und der Methode nach EN ISO 9509

Zur Charakterisierung des Sensorsystems wurden Untersuchungen mit selektiv wirkenden Nitrifikationshemmstoffen und umweltrelevante Verbindungen mit allgemeiner ökotoxikologischer Relevanz als Testsubstanzen durchgeführt. Als Realproben wurden Abwässer aus der anaeroben Schlammbehandlung und Abwasserchargen aus diversen Industriebetrieben untersucht, die zu einer Beeinträchtigungen der Reinigungsleistung von Kläranlagen führen können oder in der Vergangenheit bereits dazu führten. Zusätzlich wurden zur Validierung und Etablierung des Messverfahrens am ISWA Vergleichsuntersuchungen mit der standardisierten Methode nach EN ISO 9509 durchgeführt, um die Nachweisempfindlichkeit des Sensorsystems mit einem normierten Verfahren zu vergleichen [51].

3.4.3 Reinsubstanzen und Substanzgemische

In Tabelle 6 sind die Ergebnisse der Quantifizierung der nitrifikationshemmenden Wirkung verschiedener Substanzen und Substanzgemischen dargestellt, die mit dem Biosensorsystem und der Methode nach EN ISO 9509 erzielt worden sind. Dabei wurde in der Regel die Konzentration an Testsubstanz zur Quantifizierung der Nitrifikationshemmung herangezogen, bei der eine 50%ige Hemmwirkung (IC_{50}) auftrat. Zum direkten Vergleich der Testverfahren wurden diese Hemmstoffkonzentrationen auf das Biosensorsystem normiert und als relative Unempfindlichkeit der Testverfahren angegeben (Abbildung 22).

Tabelle 6: Vergleich der nitrifikationshemmenden Wirkung von Umweltchemikalien; ermittelt mit dem Biosensorsystem und der Methode nach EN ISO 9509

Substanz	IC ₅₀	
	Biosensorsystem	EN ISO 9509
Thioharnstoff	32 µg/l	96 µg/l
Kaliumchlorat	1,2 g/l ^x	0,5 g/l ^x
Phenol	1,2 mg/l	2,8 mg/l
Ethanol	3,4 g/l (IC ₈₀ = 6,8 g/l)	nicht bestimmt
NaCl	(IC ₂₀ = 6,9 g/l) 12 g/l	nicht bestimmt
Palegal SF	1,5 ml/l	0,1 ml/l
Dawn	1,6 ml/l	0,05 ml/l
Prestogen D	175 ml/l	33 ml/l
Kieralon MTF	35 ml/l	nicht bestimmt
Peristal PSN	31 ml/l	nicht bestimmt
Perlavin NIC:	keine Hemmung bis 500 ml/l	nicht bestimmt
ZETAG 57	keine Hemmung bis 1 g/l	nicht bestimmbar

^x IC₇₅

Thioharnstoff wird als selektiver Hemmstoff der ersten Nitrifikationsstufe beschrieben und wirkt dabei auf das Enzym Ammoniummonooxygenase (AMO) der Nitrifikanten ein. AMO ist Cu-haltig und kann durch Thioharnstoff durch Chelatisierung des Metallions inaktiviert werden [52]. Als Umweltchemikalie ist Thioharnstoff von Bedeutung, da es in großen Mengen u.a. als Katalysator in der chemischen Industrie wie z.B. bei der Synthese von Fumarsäure eingesetzt wird [53]. Kaliumchlorat ist hingegen ein selektiver Hemmstoff der zweiten Nitrifikationsstufe und wird technisch u.a. zur Sprengstoffherstellung eingesetzt [53,54]. Phenol weist eine allgemeine bakterizide Wirkung auf. Dabei greift es an der Zellgrenzschicht der Mikroorganismen an und zerstört die Semipermeabilität der Cytoplasmamembran [2]. Industriell wird es als Ausgangsprodukt zur Synthese vielfältiger aromatischer Verbindungen eingesetzt,

wie z.B. zur Herstellung von Phenolharzen, Alkylphenolen, Anilin, Bisphenol-A etc. [53]. Der Vergleich der relativen Unempfindlichkeiten bei der Bestimmung der nitrifikationshemmenden Wirkung von Thioharnstoff, Kaliumchlorat und Phenol zeigt, dass die beiden Verfahren hinsichtlich der Sensitivität um den Faktor 2 bis 3 differieren. Dabei ist das Sensorsystem bei Untersuchungen von Thioharnstoff um den Faktor 3 und bei Phenol um den Faktor 2,3 empfindlicher als die ISO-Methode, während die Sensoren bei Kaliumchlorat eine 2,4-fache geringere Sensitivität aufweisen. Ebenfalls eine bakterizide Wirkung weist Ethanol auf. Dabei bewirkt Ethanol die Koagulation von Proteinen der Mikroorganismen und führt somit zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen. Technisch wird es als Lösungs-, Verdünnungs- oder Extraktionsmittel eingesetzt [53,2]. Untersuchungen von Gomez et al. (2000) zum nitrifikationshemmenden Potenzial von Ethanol mit einem Testsystem auf belebtem Schlamm ergaben eine 80 %-ige Hemmung der Nitrifikation bei 2 g/l [55]. Die gleiche Hemmwirkung wurden mit den Biosensoren mit einer 3,4-fachen geringeren Sensitivität bei 6,8 g/l ermittelt.

Natriumchlorid wurde als Testsubstanz ausgewählt, da die Nitrifikation durch hohe Salzgehalte gestört wird. Eine Hemmung von 50 % wurde bei der Untersuchung von NaCl mit den Biosensoren bei 12 g/l ermittelt und eine Hemmung von 20 % bei 6,9 g/l. Hingegen wurden von Dincer et al. (2001) bei einem Testsystem auf Basis von Belebtschlamm lediglich einen Rückgang der Nitrifikationsaktivität um 20 % bei einer Konzentration von 50 g/l NaCl ermittelt [56]. Bis zu einer Konzentration von 2 g/l NaCl konnte mit den Biosensoren keine hemmende Wirkung festgestellt werden. Dies deckt sich auch mit Untersuchungen von Eilersen et al. (2001), der ebenfalls bis zu einer Konzentration von 1 g/l NaCl keinen Einfluss auf die Nitrifikation feststellen konnte [57]. Dabei wird die Beeinträchtigung der Nitrifikation durch hohe Salzkonzentrationen wahrscheinlich durch Veränderungen des osmotischen Druckes hervorgerufen, da bei Untersuchungen an Reinkulturen von *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* mit Chlorid- und Sulfatkonzentrationen bis zu 17 g/l kein deutlicher Unterschied in der Wirkung der einzelnen Salze festgestellt werden konnte [47].

Palegal SF wird in der Textilveredelungsindustrie als Hilfsmittel bei der Färbung von Polyesterfasern eingesetzt und besteht aus einem Gemisch von aliphatischen Estern und nichtionischen sowie anionischen Tensiden, dessen nitrifikationshemmende Wirkung von Wagner bereits beschrieben wurde [58,59]. Ferner wurde das Geschirrspülmittel Dawn (Inhaltsstoffe nach Herstellerangabe: 5 – 15 % nichtionische Tensi-

de, 15 – 30 % anionische Tenside) untersucht, da Haushaltsreinigungsmittel generell eine abwasserrelevante Bedeutung aufweisen. Obwohl die mikrobizide Wirkung von nichtionischen und anionischen Tensiden generell weniger stark ist als die von kationischen Tensiden, führt die Anwendung hoher Konzentrationen dennoch zur Schädigung der Zellmembran, was die Freisetzung von Zellinhaltsstoffen zur Folge hat [60]. Untersuchungen der nitrifikationshemmenden Wirkung von Palegal SF ergaben, dass die Hemmwirkung mit der ISO-Methode 15-fach empfindlicher bestimmt wurde als mit den Biosensoren. Ebenso zeigte sich diese hohe Empfindlichkeit bei der Untersuchung des Geschirrspülmittels, bei dem die Sensoren sogar um das 32-fache unempfindlicher reagierten als die ISO-Methode. Diese wesentlich höhere Empfindlichkeit der ISO-Methode wurde auch schon bei Vergleichsuntersuchungen mit einem Nitrifikanten-Einzelbiosensor beobachtet. Tenside verursachen Schwierigkeiten bei der Erfassung und Quantifizierung von Hemmeffekten, weil die Diffusion von höhermolekularen Verbindungen durch das bakterielle Immobilisat erschwert ist und deshalb sensitive Messungen nicht durchführbar sind [18,61]. Solche diffusionslimitierende Effekte äußern sich bei Biosensormessungen durch eine verzögerte Einstellung eines stabilen Signales.

ZETAG 57 ist ein kationisches Acrylamidcopolymer, welches nach der anaeroben Behandlung von Schlämmen als Entwässerungshilfsmittel zur Konditionierung des Faulschlammes eingesetzt wird. Es ist von abwasserrelevanter Bedeutung, da die bei der Entwässerung anfallenden Trübwasser der biologischen Reinigungsstufe zugeführt werden [62]. Bis zu einer Konzentration von 1 g/l wurde keine nitrifikationshemmende Wirkung mit den Sensoren festgestellt. Höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht, da dieses Polymer im konkreten Anwendungsfall maximal in einer Konzentration von 250 mg/l im Trübwasser vorkommen kann. Eine Untersuchung dieses Polymers mit der ISO-Methode war nicht möglich, da diese Verbindung eine Koagulation des suspendierten belebten Schlammes zur Folge hatte und somit eine ausreichende Versorgung der Biomasse mit Nährstoffen und Sauerstoff nicht gewährleistet war.

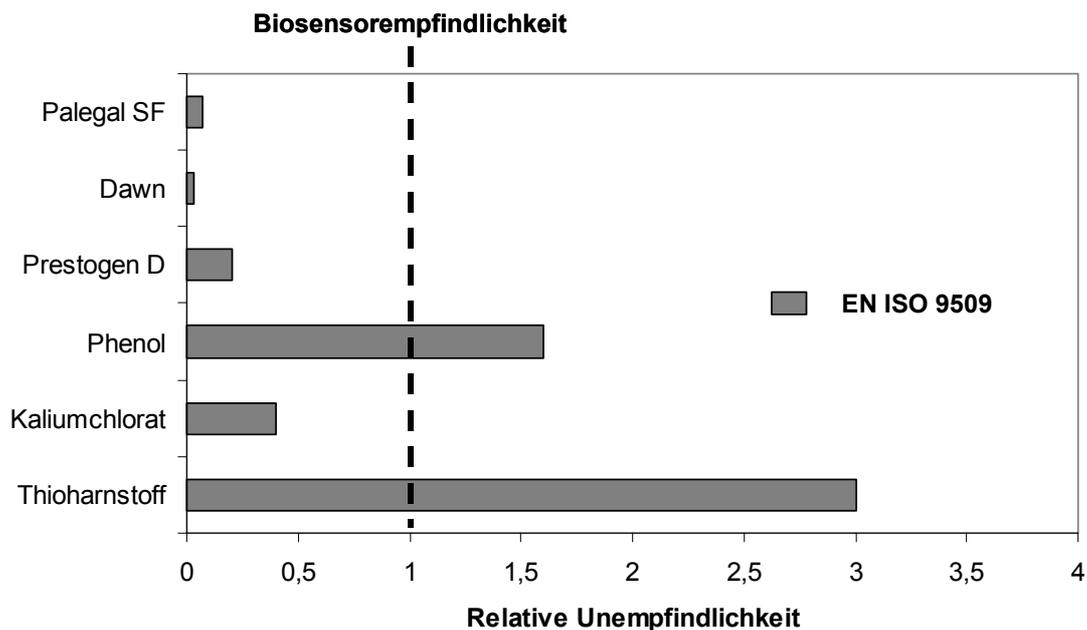


Abbildung 22: Nitrifikationshemmende Wirkung von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen bestimmt durch die EN ISO 9509 und das Biosensorsystem. Dargestellt ist die relative Unempfindlichkeit der ISO-Methode bezogen auf das Sensorsystem.

Bei den Proben *Prestogen D*, *Kieralon MTF*, *Peristal PSN* und *Perlavin NIC* handelt es sich um Hilfsstoffe aus der Textilveredelungsindustrie, die im Rahmen von Auftragsuntersuchungen mit dem Sensorsystem bearbeitet wurden.

Prestogen D wird beim Bleichen von Baumwolle eingesetzt und besteht aus einer Mischung von Salzen organischer Polysäuren [58]. Kieralon MTF ist ein Gemisch sequestrierender und oberflächenaktiver Substanzen und wird als Waschmittel zur Entfernung von Baumwollbegleitstoffen bei diversen Vorbehandlungsschritten in der Textilveredelung eingesetzt [58]. Peristal PSN besteht aus verschiedenen Polycarbonsäuren und wird als Bleich- sowie Bleichereihilfsmittel eingesetzt [63]. Perlavin NIC ist ein Färbereihilfsmittel und besteht aus Fettalkoholpolyglykolethern und Alkylsulfonaten [63]. Mit den Biosensoren wurde für Prestogen D eine 50 %-ige Hemmwirkung bei einer Konzentration von 175 ml/l festgestellt, während die gleiche Hemmwirkung bei der ISO-Methode bei einer Konzentration von 33 ml/l auftrat, die damit um das 5,3-fache empfindlicher ist. Eine deutlich stärkere nitrifikationshemmende Wirkung wiesen die Produkte Kieralon MTF und Peristal PSN bei der Unter-

suchung mit dem Sensorsystem auf, während bei Perlavin NIC keinerlei hemmende Wirkung bis zu einer Konzentration von 500 ml/l auftrat. Aufgrund der geringen Probenmengen konnte ein zusätzlicher Vergleich mit der ISO-Methode mit den drei zuletzt genannten Verbindungen nicht durchgeführt werden.

3.4.4 Reale Abwasserproben

Ebenso wie bei der Bestimmung von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen, wurde die nitrifikationshemmende Wirkung von verschiedenen realen Abwasserproben mit dem Sensorsystem und der Methode nach ISO 9509 ermittelt (Tabelle 7). Abbildung 23 zeigt die relativen Unempfindlichkeiten der beiden Verfahren.

Tabelle 7: Vergleich der nitrifikationshemmenden Wirkung von realen Abwasserproben, ermittelt mit dem Verfahren der EN ISO 9509 und dem Biosensorsystem.

Substanz	IC ₅₀	
	Biosensorsystem	EN ISO 9509
Trübwasser 1	430 ml/l	270 ml/l
Trübwasser 2	820 ml/l ^x	400 ml/l ^x
Lebensmittelindustrie	1,2 ml/l	1,6 ml/l
Metallverarbeitung	5,3 µl/l	3,4 µl/l
Gerbereibetrieb	100 ml/l ^{xx}	40 ml/l ^{xx}
Abwasser aus der anaeroben Behandlung von Farbstoffkonzentraten (Zulaufprobe/Ablaufprobe)	keine Hemmung	nicht bestimmbar

^x IC₄₀ ; ^{xx} IC₃₀

Es wurden Untersuchungen mit Trübwassern aus zwei Kläranlagen durchgeführt. Bei beiden Proben konnte eine nitrifikationshemmende Wirkung nachgewiesen werden. Dabei wurde mit dem Sensorsystem eine 50 %-ige Hemmwirkung für Trübwasser 1 bei einer Konzentration von 430 ml/l und für Trübwasser 2 bei 270 ml/l bestimmt. Die Vergleichsuntersuchungen ergaben, dass die ISO-Methode die nitrifikationshemmende Wirkung in den beiden Fällen um den Faktor 1,6 bis 2,1 empfindlicher erfasste als die Biosensoren. Es zeigte sich bei beiden Methoden, dass das Trübwasser 2

im Mittel eine um das 1,6-fache höhere Hemmwirkung aufwies als das Trübwasser 1. Die Hemmwirkung wird vermutlich u.a. durch die hohen Ammoniumstickstoffkonzentrationen ($\text{NH}_4^+\text{-N}$) der Trübwasser verursacht. Die $\text{NH}_4^+\text{-N}$ -Konzentration betrug in der unverdünnten Probe des Trübwassers 1 800 mg/l und in Trübwasser 2 275 mg/l. Dabei steht Ammonium im pH-Wert abhängigen Gleichgewicht zu Ammoniak [16]. Von Ammoniak ist bekannt, dass es die Nitrifikation schon bereits in relativ geringen Konzentrationen hemmt. Die Hemmung der Ammoniumoxidation kann nach Literaturangaben bei 8 – 123 mg/l $\text{NH}_3\text{-N}$ und die Hemmung der Nitritoxidation bereits bei 0,1 – 1 mg/l $\text{NH}_3\text{-N}$ einsetzen [47]. Wird der Anteil des Ammoniaks auf die in Tabelle 7 angegebenen Trübwasserkonzentrationen umgerechnet, so entspricht die Ammoniakkonzentration bei einer $\text{NH}_4^+\text{-N}$ -Konzentration des Trübwassers 1 von 378 mg/l einem Anteil von 18 mg/l $\text{NH}_3\text{-N}$ (pH 7,9, T = 24 °C). Im Falle des Trübwassers 2 errechnet sich dieser $\text{NH}_3\text{-N}$ -Anteil bei 226 mg/l $\text{NH}_4^+\text{-N}$ zu 5,8 mg/l (pH 7,64, T = 24 °C). Die stärkere Hemmwirkung des Trübwassers 1 kann sicherlich somit auch auf den höheren Anteil an Ammoniak zurückgeführt werden.

Bei der Probe aus der metallverarbeitenden Industrie handelt es sich um ein stark mit Schwermetallen und Cyaniden belastetes Abwasser, während die Probe aus der Lebensmittelindustrie aus einer durch unbekannte Inhaltsstoffe verunreinigten Alkoholmischung bestand und als externe C-Quelle für die Denitrifikation eingesetzt wurde. Ein Störfall auf einer Kläranlage führte zu einer mindestens 20-fachen Überdosierung des Co-Substrates in das Denitrifikationsbecken und verursachte erheblich erhöhte Ammoniumkonzentrationen im Abwasser des Ablaufs der Kläranlage. Für beide Proben wurden mit den zwei Testsystemen nahezu identische Hemmwirkungen nachgewiesen.

Die Probe aus einem Gerbereibetrieb war eine Abwassercharge, die auf einer Kläranlage zur Störung der Nitrifikationsstufe führte. Eine 50%ige Hemmwirkung wurde mit der ISO-Methode bei 40 ml/l ermittelt, während die Sensoren um den Faktor 2,5 unempfindlicher reagierten.

Im Gegensatz dazu wurde bei einer Zulauf- bzw. Ablaufprobe aus der anaeroben Behandlung von Farbstoffkonzentraten mit dem Sensorsystem keine hemmende Wirkung nachgewiesen. Die Untersuchung der Proben mit der Methode nach EN ISO 9509 war nicht möglich, da diese Abwässer hohe Eigenfärbungen aufwiesen, die eine photometrische Bestimmung der Parameter Nitrat und Nitrit nicht erlauben.

Abbildung 23: Nitrifikationshemmende Wirkung von realen Abwasserproben bestimmt durch die EN ISO 9509 und das Biosensorsystem. Dargestellt ist die relative Unempfindlichkeit der ISO-Methode bezogen auf das Sensorsystem.

3.4.5 Zusammenfassende Bewertung der Vergleichsuntersuchungen

Der Vergleich des Biosensorsystems und der Methode nach EN ISO 9509 mit abwasserrelevanten Umweltchemikalien und realen Abwasserproben zeigte, dass die Resultate des Sensorsystems hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit eine akzeptable Korrelation mit den Werten, die mit dem standardisierten Verfahren ermittelt wurden, aufweist. So differiert die Sensitivität dieser beiden Methoden in der Regel maximal um den Faktor 5. Lediglich bei der Erfassung der Hemmwirkung höhermolekularer Verbindungen ist die ISO-Methode wesentlich empfindlicher als die Sensoren. Ein wesentlicher Vorteil des Biosensormesssystems besteht darin, dass es im Gegensatz zu der ISO-Methode, sehr schnell Aussagen über eine mögliche hemmende Wirkung einer Probe erlaubt. So ist das inhibitorische Potenzial schon nach wenigen Minuten zu erkennen. Für die Quantifizierung der Hemmwirkung beträgt der Zeitbedarf bei einer Probe inklusive Probenvorbereitung in der Regel zwei Stunden, während für die Durchführung der ISO-Methode mindestens ein Tag benötigt wird. Des weiteren reichen für das Sensorsystem schon geringe Probenmengen für die Durchführung von Hemmtests auf. Dies ist immer dann von Vorteil, wenn nur begrenzte Probenmengen zur Verfügung stehen.

4 Zusammenfassung

Für die Erfassung von Hemmstoffen und Substraten des Nitrifikationsstoffwechsels (N-BSB) in der Abwasserüberwachung wurden miniaturisierte Nitrifikanten-Biosensoren auf der Basis von Sauerstoffdickschichtelektroden entwickelt. Dazu wurden in Zusammenarbeit des Instituts für Siedlungswasserbau, Wassergüte- und Abfallwirtschaft (ISWA) mit dem Institut für Technische Biochemie (ITB) der Universität Stuttgart bestehende Sauerstoffdickschichtelektroden weiterentwickelt. Durch Optimierungen des Elektrodenlayouts und Veränderungen der Sensormaterialien wurden langzeitstabile und wiederverwendbare Sauerstoffsensoren hergestellt. Zur Fixierung nitrifizierender Mikroorganismen auf diesen Elektroden wurden diverse Polymere als Einschlussmatrix getestet. Durch die Verwendung eines photovernetzbaren Polyvinylalkohols wurde eine praktikable und einfache Immobilisierungsmethode realisiert. Integriert wurden diese Nitrifikanten-Biosensoren in einen mehrkanaligen Laborprototypen, der in Zusammenarbeit mit der Fa. „Energy of Nature“ – Projektgesellschaft für umwelttechnische Anlagensysteme Leipzig mbH im Rahmen dieses Projektes entwickelt wurde. Dabei können die Signale von bis zu zehn Biosensoren parallel aufgenommen werden. Charakterisiert wurde das System zunächst anhand von Messreihen mit Substraten des Nitrifikantenstoffwechsels. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass die Biosensoren in der Lage sind, neben den eigentlichen Substraten von litho-autotrophen Nitrifizierern wie Ammonium und Nitrit, auch organische Stickstoffverbindungen zu erfassen. Anhand von Untersuchungen zur Erfassung des N-BSB von Abwassermatrizes wurde gezeigt, dass eine hohe Korrelation zwischen dem Sensor-N und der Gesamtstickstoffkonzentration von Abwasserproben besteht. Zur Charakterisierung des Messsystems für die Erfassung nitrifikationshemmender Effekte wurden Untersuchungen mit Standardhemmstoffen und umweltrelevanten Reinsubstanzen durchgeführt. Zur Validierung des Biosensormesssystems wurden Vergleichsuntersuchungen anhand von Reinsubstanzen, Substanzgemischen und realen Abwasserproben mit dem standardisierten Nitrifikationshemmtest nach EN ISO 9509 durchgeführt. Es wurde ermittelt, dass das Sensorsystem hinsichtlich der Nachweisempfindlichkeit vergleichbar mit dem normierten Verfahren ist. Letztendlich wurde das Biosensormesssystem am ISWA für die Routineanalytik etabliert und damit zahlreiche Auftragsanalysen durchgeführt.

Es wurde ein Screeningverfahren für die Abwasseranalytik entwickelt, welches sehr schnell und zuverlässig die Quantifizierung von nitrifikationshemmenden Effekten in Abwässern sowie die Detektion nitrifizierbarer Verbindungen innerhalb einer Stunde ermöglicht. Diese Neuentwicklung ergänzt als sehr kostengünstige Untersuchungsmethode bestehende Testverfahren. Ein zweiter, weiterentwickelter Prototyp der Analysenstation wird momentan gebaut und soll auf einer Industriekläranlage eingesetzt werden und unter praxisorientierten Aspekten bewertet werden.

5 Verwertungsaussichten

Ziel des Forschungsvorhabens war die Entwicklung eines kommerziellen Analysenmessgerätes für Abwasseruntersuchungen auf der Basis von Einweg-Nitrifikanten-Biosensoren. Durch die simultane Aufnahme der Signale von bis zu 10 Biosensoren ermöglicht das System eine sehr schnelle Bestimmung und Quantifizierung der akuten Toxizität auf aquatische Mikroorganismen.

- **Vermarktungsfähigkeit:**

Das Multimessgerät in der derzeitigen Bauform ist ausschließlich für die Verfahrensentwicklung konzipiert. Es besteht allerdings die Möglichkeit, wenige Einzelstücke für Anwendungen in Umweltlaboratorien, auf Industriekläranlagen oder in der chemischen Industrie zur Toxizitätsprüfung von Umweltchemikalien in der bestehenden Form zu bauen. Für eine breitere Vermarktung sind jedoch weitere Entwicklungsarbeiten erforderlich. Dies betrifft insbesondere die (Teil-) Automatisierung des Messverfahrens und Entwicklungen, die (Quasi-) Online-Messungen erlauben. Für eine Vermarktung der Nitrifikanten-Biosensoren bestehen noch Einschränkungen hinsichtlich der Lagerungsstabilität und der Herstellungsmethode von Nitrifikantenimmobilisaten. Dazu ist eine Erhöhung der Haltbarkeit der Immobilisate anzustreben und ein Verfahren zur Automatisierung der Immobilisierungsprozedur zu entwickeln.

Hingegen kann das Messgerät durch Modifikationen an der Geräteelektronik für den Einsatz anderer (elektrochemischer) Sensoren umgerüstet werden. Dies würde den Anwendungsbereich des Messsystems auf zusätzliche Gebiete der Umweltanalytik erweitern.

- **Schutzrechte:**

Gegenwärtig bestehen auf das Messsystem keine Schutzrechte. Jedoch sind einige Gerätebaugruppen bereits durch Dr. Frank Riechert (Ingenieurbüro Dr. Riechert GmbH, Dresden) patentiert.

6 Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Prinzip des Siebdruckverfahrens.
- Abbildung 2: Schematischer Aufbau der Transducerbasis einer Sauerstoffdickschichtelektrode. Dargestellt ist der schrittweise Druckprozess: 1. Silberleiterbahnen, 2. Graphitunterlage, 3. Arbeitselektrode (Rhodium/Graphit), 4 Isolationsschicht.
- Abbildung 3: Transducerbasis der Sauerstoffdickschichtelektroden in einer Konfiguration von 2 x 10 Elektroden.
- Abbildung 4: Schematischer Querschnitt durch die Arbeits- und Referenzelektrode einer vollständig gefertigten Sauerstoffdickschichtelektrode.
- Abbildung 5: Mehrkanalmessgerät für Biosensoruntersuchungen.
- Abbildung 6: Detektionsprinzip der Nitrifikantensensoren bei der Bestimmung nitrifizierbarer Verbindungen.
- Abbildung 7: Detektionsprinzip der Nitrifikantensensoren bei der Bestimmung von Nitrifikationshemmstoffen.
- Abbildung 8: Hydrodynamisches Voltammogramm der Sauerstoffdickschichtelektroden in sauerstofffreiem und -gesättigtem Messmedium.
- Abbildung 9: Dynamisches Verhalten der Sauerstoffdickschichtelektroden bei Wechsel von sauerstoffgesättigtem und -freiem (Na_2SO_3) Messmedium.
- Abbildung 10: Abhängigkeit des Sensorsignals der Dickschichtelektroden von der Sauerstoffstoffkonzentration. Die Fehlerbalken sind über den Variationskoeffizienten bei einer Anzahl von fünf Wiederholungsmessungen pro Konzentrationsstufe angegeben.
- Abbildung 11: Signalstabilität der Sauerstoffdickschichtelektroden.
- Abbildung 12: Abhängigkeit des Nitrifikanten-Biosensorsignals von Ammonium. Anpassung der Messwerte an eine Sättigungsfunktion. Die einzelnen Messpunkte stellen Mittelwerte aus einer siebenfachen Konzentrationsbestimmung dar (app. $K_m = 1,29 \text{ mg/l NH}_4^+\text{-N}$, $R^2 = 0,9925$, Vertrauensband: 99 %).

- Abbildung 13: Linearer Bereich von Nitrifikanten-Biosensoren bei der Quantifizierung von Ammonium ($R^2 = 0,9953$, Nachweisgrenze: $63,5 \mu\text{g/l NH}_4^+\text{-N}$, Bestimmungsgrenze = $216,9 \mu\text{g/l NH}_4^+\text{-N}$). Die Fehlerbalken geben die Standardabweichung ($n = 7$).
- Abbildung 14: Abhängigkeit des Nitrifikanten-Biosensorsignals vom Nitrifikationssubstrat Harnstoff. Anpassung der Messwerte an eine Sättigungsfunktion ($n = 25$, app. $K_m = 1,15 \text{ mg/l Harnstoff-N}$, $R^2 = 0,9643$, Vertrauensband 99 %).
- Abbildung 15: Abhängigkeit des Nitrifikanten-Biosensorsignals von der Nitritkonzentration. Anpassung der Messwerte an eine Sättigungsfunktion ($n = 39$, app. $K_m = 6,22 \text{ mg/l Nitrit-N}$, $R^2 = 0,9895$, Vertrauensband 99 %).
- Abbildung 16: Abhängigkeit der Biosensoraktivität von der Konzentration verschiedener Aminosäuren und Ammonium.
- Abbildung 17: Quantifizierung nitrifizierbarer Verbindungen in einer Abwasserprobe. Dem jeweiligen Sensor-N ist die Konzentration an Ammonium- und Gesamtstickstoff des Abwassers gegenübergestellt.
- Abbildung 18: Abhängigkeit des Signals der Nitrifikanten-Biosensoren von der ATH-Konzentration bei Auswertung der Strom-Zeit-Kurven nach der Endpunktmethode. Anpassung einer sigmoiden Funktion an die Messwerte.
- Abbildung 19: Abhängigkeit des Signals der Nitrifikanten-Biosensoren von der ATH-Konzentration bei der Auswertung der Strom-Zeit-Kurven nach der dynamische Methode (Mittelwerte aus 23 Messungen).
- Abbildung 20: Abhängigkeit des Nitrifikantensensorsignals von der ATH-Konzentration bei der Verwendung eines Sensors über einen Zeitraum von zwei Wochen ($n = 44$).
- Abbildung 21: Darstellung der Aktivität und Empfindlichkeit eines Biosensors über einen Zeitraum von zwei Wochen.
- Abbildung 22: Nitrifikationshemmende Wirkung von Einzelsubstanzen und Substanzgemischen bestimmt durch die EN ISO 9509 und das Biosensorsystem. Dargestellt ist die relative Unempfindlichkeit der ISO-Methode bezogen auf das Sensorsystem.

Abbildung 23: Nitrifikationshemmende Wirkung von realen Abwasserproben bestimmt durch die EN ISO 9509 und das Biosensorsystem. Dargestellt ist die relative Unempfindlichkeit der ISO-Methode bezogen auf das Sensorsystem.

7 Tabellenverzeichnis

- Tabelle 1: Parameter für den Druck der Basis der Sauerstoffelektroden auf PC-Substrat.
- Tabelle 2: Zusammensetzung der Nährlösung zur Kultivierung von Nitrifikanten-Anreicherungskulturen.
- Tabelle 3: Herstellung von Nitrifikantenimmobilisaten
- Tabelle 4: Auswahl an Aminosäuren zur Bestimmung des N-BSB
- Tabelle 5: Betriebsparameter des Biosensormesssystems; ermittelt anhand von Untersuchungen mit ATH
- Tabelle 6: Vergleich der nitrifikationshemmenden Wirkung von Umweltchemikalien; ermittelt mit dem Biosensorsystem und der Methode nach EN ISO 9509.
- Tabelle 7: Vergleich der nitrifikationshemmenden Wirkung von realen Abwasserproben, ermittelt mit dem Verfahren der EN ISO 9509 und dem Biosensorsystem.

8 Literaturverzeichnis

- 1 Juretschko, S., Timmermann, G., Schmid, M., Schleifer, K.-H., Pommerening-Röser, A., Koops, H.-P., Wagner, M. (1998): Combined molecular and conventional analyses of nitrifying bacterium diversity in activated sludge: *Nitrosococcus mobilis* and *Nitrospira*-like bacteria as dominant populations. *Appl. Environ. Microbiol.*, **64** (8), 3042-3051.
- 2 Schlegel, H.G. (1985): Allgemeine Mikrobiologie. 6. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- 3 Zart, D., Schmidt, I., Bock, E. (1996): Neue Wege vom Ammonium zum Stickstoff. In: Ökologie der Abwasserorganismen (Lemmer, H., Griebe, T. Flemming, H.-C. (Hrsg.)), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 183 – 192.
- 4 Bever, J., Stein, A., Teichmann H. T. (1995): Weitergehende Abwasserreinigung, 3. Aufl., Oldenbourg Verlag, München, Wien, 95 – 115.
- 5 Tomlinson, T. G., Boon, A. G., Trotman C. N. A. (1966): Inhibition of nitrification in the activated sludge process of sewage disposal. *J. Appl. Bacteriol.*, **29**, 266 - 291.
- 6 Hooper, A. B., Terry, K. R. (1973): Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. Bacteriol.*, **115**, 480 - 485.
- 7 Wood, L. B., Hurley, B. J. E., Matthews, P. J. (1981): Some observations on the biochemistry and inhibition of nitrification. *Wat. Res.* **15**, 543 - 551.
- 8 Abraham, A., Matsché, N., Streichbier F., Röhr M. (1979): Laborversuche über die Wirkung toxischer Abwässer auf Belebungsanlagen. *Österr. Abwasser Rundschau.*, **24**, 79 - 82.
- 9 Richardson, M. L. (1985): Nitrification inhibition in the treatment of sewage. The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London, W1V OBN, Thames Water Reading, U. K..
- 10 Richardson, M. L. (1992): The dictionary of substances and their effects. The Royal Society of Chemistry, Burlington House, London. U. K..
- 11 Beg, S. A., Hassan, M. M. (1987): Effects of inhibitors on nitrification in a packed-bed biological flow reactor. *Wat. Res.*, **21**, 191 - 198.
- 12 Stuhlfauth, T. (1995): Ecotoxicology monitoring of industrial effluents. In: Environmental toxicology assessment (Richardson, M. (Hrsg.)), Taylor & Francis Ltd, London, UK, 187 - 198.
- 13 Weidmann, M., Ewald, M. (1990): Der Einfluß von abwasserabgaberelevanten Wasserinhaltsstoffen auf die Nitrifikation und Denitrifikation von Belebtschlammanlagen. *Vom Wasser*, **74**, 135 - 143.

-
- 14 Decker, J., Dohmann, M. (1993): Gegenüberstellung verschiedener Ansätze zur Indirekteinleitererfassung und -bewertung. *Gewässerschutz – Wasser – Abwasser*, 125, 293 - 316.
- 15 Fearnside, D., Booker, H. (1995): The effects of industrial wastes on nitrification processes found within wastewater treatment works. In: *Environmental toxicology assessment* (Richardson, M. (Hrsg.)), Taylor & Francis Ltd, London, UK, 281 - 294.
- 16 Gujer, W. (1999): *Siedlungswasserwirtschaft*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 17 König, A., Bachmann, T.T., Metzger, J.W., Schmid, R.D. (1999): Disposable sensor for measuring the biochemical oxygen demand for nitrification and inhibition of nitrification in wastewater. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, 112 – 117.
- 18 König, A., Secker, J., Herb, S., Kayser, G., Flemming, H.-C., Metzger, J. W., Riedel, K. (1997): Ein mikrobieller Sensor zur Erfassung nitrifikationshemmender und nitrifizierbarer Verbindungen. *Vom Wasser*, 88, 185 - 204.
- 19 Renneberg, R., Gründig, B. (1994): Biosensoren für die Umweltanalytik. *Nachr. Chem., Tech. Lab.*, 42, 42 – 49.
- 20 D`Souza, S.F. (2001): Microbial biosensors. *Biosens. Bioelectron.*, 16, 337 – 353.
- 21 Yang, Z., Suzuki, H., Sasaki, S., Karube, I. (1996): Disposable Sensor for Biochemical Oxygen Demand. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 46, 10-14.
- 22 Yang, Z., Sasaki, S., Karube, I., Suzuki, H. (1997): Fabrication of Oxygen Electrode Arrays and Their Incorporation Into Sensors for Measuring Biochemical Oxygen Demand." *Anal. Chim. Acta*, 357, 41-49.
- 23 Habermüller, K., Kranz, C., Schuhmann, W. (1999): Wafer-kompatible Immobilisierung von biologischen Erkennungskomponenten. In: Henze, G., Köhler, M. Lay, J.P. (Hrsg.): *Umweltdiagnostik mit Mikrosystemen*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 304 – 324.
- 24 Bachmann, T.T (1999): Development of disposable sensors for rapid multianalyte detection: Acetylcholinesterase and microbial biosensors. Dissertation, Stuttgart.
- 25 Glaspool, A., Atkinson, J. (1998): A screen-printed amperometric dissolved oxygen sensor utilising an immobilised electrolyte gel and membrane. *Sens. Actuat., B* 48, 308-317.
- 26 Koudelka, M. (1986): Performance characteristics of a planar „Clark-type“ oxygen sensor. *Sens. Act.*, B 9, 249 – 258.

-
- 27 Jobst, G., Urban, G., Jachimowicz, A., Kohl, F., Tilado, O., Lettenbichler, I., Nauer, G. (1993): Thin film Clark-type oxygen sensor based on novel polymer membrane systems for in vivo and biosensor application. *Biosens. Bioelectron.*, **8**, 123 - 128.
- 28 Suzuki, H., Tamiya, E., Karube, I. (1988): Fabrication of an oxygen electrode using semiconductor technology. *Anal. Chem.*, **60**, 1078 - 1080.
- 29 Suzuki, H., Sugama, A., Kojima, N. (1992): Micromachined Clark oxygen electrodes and biosensors. *Fujitsu Sci. Tech. J.*, **28** (3), 393 – 401.
- 30 Wang, J. (1994): *Analytical Electrochemistry*. VCH-Verlag, New York.
- 31 Yang, Z., Suzuki, H., Sasaki, S., Karube, I. (1997): Design and validation of a low cost-paper-based oxygen electrode. *Anal. Lett.*, **30** (10), 1797 – 1807.
- 32 Olschewski, H., Erlenkötter, A., Zaborosch, C., Chemnitz, G.-C. (2000): Screen-printed enzyme sensors for L-lysine determination. *Enzyme Microb. Technol.*, **26**, 537-543.
- 33 König, A., Zaborosch, C., Muscat, A., Vorlop, K.-D., Spener, F. (1996): Microbial sensors for naphthalene using *Sphingomonas* sp. B1 or *Pseudomonas fluorescence* WW4. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **45**, 844-850.
- 34 Vogelsang, C., Husby, A., Østgaard, K. (1997): Functional stability of temperature-compensated nitrification in domestic wastewater treatment obtained with PVA-SBQ/alginate gel entrapment. *Wat. Res.*, **7**(31), 1659-1664.
- 35 Tsafack, V. C., Marquette, C.A., Leca, B., Blum, L.J. (2000): An electrochemiluminescence-based fibre optic biosensor for choline flow injection analysis. *Analyst*, **125**, 151-155.
- 36 Hertzberg, S., Moen, E., Vogelsang, C., Østgaard, K. (1995): Mixed photo-cross-linked polyvinyl alcohol and calcium-alginate gels for cell entrapment. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **43**, 10-17.
- 37 Produktinformation Toyo Gosei Kogyo Co., Ltd, Japan.
- 38 Huber, W. (1993): Nachweis-, Erfassungs- und Bestimmungsgrenze nach DIN 32645. *Vom Wasser*, **80**, 7-13.
- 39 Liu, B. (1996): Studies on microbial biosensor for DL-phenylalanine and its dynamic response process. *Anal. Lett.*, **29** (9), 1497 – 1515.
- 40 Racek, J. (1991): A yeast biosensor for glucose determination. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **34**, 473 – 477.
- 41 Lee, W.-Y., Kim, S.-R., Kim, T.-H., Lee, K. S., Shin, M.-C., Park, J.-K. (2000): Sol-gel derived thick-film conductometric biosensor for urea determination in serum. *Anal. Chim. Acta*, **404**, 195-203.

-
- 42 König, A. (1999): Entwicklung von Nitrifikanten-Biosensoren für die Abwasseranalytik. Stuttg. Ber. Siedlungswasserwirtsch. *Band 152*, R. Oldenbourg Verlag, München.
- 43 Knowles, G., Downing, A.L., Barrett, M.J. (1965): Determination of kinetic constants for nitrifying bacteria in mixed culture with the aid of an electronic computer. *J. Gen. Microbiol.*, *38*, 263 – 278.
- 44 Van Haandel, A. C., Dold, P.L., Marais, G. v. R. (1982): Optimization of nitrogen removal in the single sludge activated sludge process. *Wat. Sci. Technol.*, *14 (6/7)*, 443 – 461.
- 45 Koppe, P., Stozek, A. (1986): *Kommunales Abwasser. 1. Aufl.*, Oldenbourg Verlag, München, Wien.
- 46 Underhill, S.E. (1990): Techniques for studying the microbial ecology of nitrification. *Methods. Microbiol.*, *22*, 417 – 445.
- 47 Nowak, O. (1996): Nitrifikation im Belebungsverfahren bei maßgebendem Industrieabwassereinfluß. *Band 135*, Wien. Mitt.: Wasser-Abwasser-Gewaesser.
- 48 DIN EN ISO 1899-1 H51 (1998): Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs nach n Tagen (BSB_n): Teil 1: Verdünnungs- und Impfverfahren nach Zugabe von Allylthioharnstoff. DIN Deutsches Institut für Normung e. V. Beuth Verlag GmbH, Berlin
- 49 Kayser, G., Koch, M., Ruck, W. (1994): Simultane quantitative Erfassung von Abbaubarkeit und Toxizität umweltrelevanter Chemikalien. *Vom Wasser*, *82*, 219 – 232.
- 50 Painter, H. A. (1993): A review of tests for inhibition of bacteria (especially those agreed internationally). In: *Ecotoxicology monitoring (Richardson, M., Hrsg.)*, *1. Aufl.*, VCH-Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 17 – 35.
- 51 DIN EN ISO 9509 (1995): Verfahren zur Bestimmung der Nitrifikationshemmung von Mikroorganismen im Belebtschlamm durch Stoffe und Abwasser. DIN Deutsches Institut für Normung e.V., Beuth Verlag GmbH, Berlin.
- 52 Weise, A., Benckiser, G., Ottow, C.G. (2001): Einfluss der neuen Pyrazol-Nitrifikationsinhibitoren auf die Freisetzung klimarelevanter Gase (N₂O, CO₂, CH₄). In: *Wasser-Kal.*, Erich Schmidt Verlag, Berlin, 122 – 140.
- 53 Römpp Chemie Lexikon (1995): Falbe, J., Regitz, M. (Hrsg.), *9. Aufl.*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- 54 Surmacz-Gorska, J., Gernaey, K. (1996). Nitrification monitoring in activated sludge by oxygen uptake rate (OUR) measurements. *Water Res.*, *30(5)*, 1228 – 1236.

55 Gomez, J., Mendez, R., Lema, J. M. (2000). Kinetic study of addition of volatile organic compounds to a nitrifying sludge. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 87(3), 189 - 202.

56 Dincer, A. R., Kargi, F. (2001): Salt inhibition kinetics in nitrification of synthetic saline wastewater. *Enzyme Microb. Technol.*, 28, 661-665.

57 Eilersen, A. M., Henze, H. (1994): Effect of volatile fatty acids and trimethylamine on nitrification in activated sludge. *Water Res.*, 28(6), 1329-1336.

58 Produktinformation der BASF AG, Ludwigshafen.

59 Wagner, R., Kayser, G. (1990): Laboruntersuchungen zur Hemmung der Nitrifikation durch spezielle Inhaltsstoffe industrieller und gewerblicher Abwässer. *Gas-Wasserfach: Wasser/Abwasser*, 313(4), 165 - 177.

60 Kayser, G. (1997): Einflüsse organischer Abwasserinhaltsstoffe auf die Nitrifikation. *IHI-Schriften Internationales Hochschulinstitut Zitta*, Heft 4.

61 Baumeister, F. , König, A. , Metzger, J. W. (2002): Drei Testsysteme zur Bestimmung der Nitrifikationshemmung in Abwässern – Vergleichende Untersuchungen mit einem Respirometer, einem Biosensor und der Methode nach EN ISO 9509. *Korrespondenz Abwasser* (im Druck).

62 Produktinformation der Fa. Allied Colloids GmbH, Hamburg.

63 Informationsstudie des österreichischen Bundesministeriums für Umwelt, Jugend und Familie (1999): *Textilchemikalien in Österreich: Teil 1: Textilhilfsmittel – Einsatzmengen, Anwendungsgebiete und ökologische Bewertung.*

