

Entwicklung neuartiger Trägermaterialien für die Wasseraufbereitung und Kreislaufführung in Marikultur-Produktionsanlagen der Fischzucht

Projekt-Phase I

Eva Spieck¹, Peter-Georg Jozsa¹, Mashal Alawi¹, Florian Brill¹,
Gerrit Quantz², Stefanie Beth², Ralf Wolbeck³, Burkard Watermann⁴

¹Universität Hamburg, Biozentrum Klein Flottbek, Abteilung Mikrobiologie

²Ecomares MariFarm GmbH, Strande, ³H Kunststoff GmbH, Wettringen,

⁴LimnoMar, Hamburg



März 2007

AZ : 23821

Laufzeit: Mai 2006 – Juli 2007

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
1.1	Aquakultur.....	6
1.2	Biofiltration	6
1.3	Toxische Effekte von Stickstoffverbindungen auf aquatische Lebewesen	7
1.4	Nitrifikation	8
1.5	Identifizierung von nitrifizierenden Bakterien	8
1.6	Anheftung von Nitrifikanten	9
1.7	Populationsanalysen von Nitrifikanten in der Aquakultur	9
1.8	Starterkulturen	10
1.9	Konkurrenz mit heterotrophen Begleitorganismen.....	10
1.10	Inhaltsstoffe von Polymeren.....	11
1.11	Darstellung der Anlagen von Ecomares	14
1.11.1	Büsum.....	14
1.11.2	Strande	16
1.11.3	Aufbau und Design der Biofilter.....	16
1.12	Ziel der vorliegenden Untersuchungen.....	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Laborversuche Universität Hamburg	20
2.1.1	Probenahmen	20
2.1.2	Methodik der Probenahme	20
2.1.3	Nährmedien	21
2.1.4	Anreicherung von nitrifizierenden Bakterien	22
2.2	Vergleich Füllkörper/Biocarrier - Strande.....	23
2.2.1	Pilotversuche zur Erstbesiedlung von Biocarriern – Anlage Strande	25
2.3	Inhaltsstoffe der zur Verfügung gestellten Granulate.....	26
3	Mikrobiologisch-chemische Labor-Arbeiten an Füllkörpern und Biofiltern	28
3.1	Visualisierung des mikrobiologischen Bewuchses	28
3.2	Quantifizierungen.....	28
3.2.1	Probenahme: 22.5.06.....	28
3.2.2	Quantifizierung am 28.9.06	29
3.3	Kultivierung der nitrifizierenden Bakterien	29
3.4	Identifizierung der dominierenden Nitrifikanten	30
3.4.1	Elektronenmikroskopie	30
3.4.2	Immunologische Identifizierung der Nitrit oxidierenden Bakterien.....	37
3.4.3	FISH (Fluoreszenz in-situ Hybridisierung) mit spezifischen Gensonden.....	38
3.4.4	Populationsanalyse des nitrifizierenden Biofilms mittels PCR	45

3.5	Besiedlung von neuen Füllkörpern:.....	49
3.6	Aktivitätstest.....	50
3.7	Hemmversuche mit neuem HDPE-Material.....	61
4	Messung der löslichen Stickstoffverbindungen in der Anlage Büsum (19.10.06)...	66
5	Ergebnisse der Betriebsmessungen am Kreislauf Büsum	73
6	Ergebnisse Vergleichstests Biocarrier/Füllkörper	76
6.1	Ergebnisse der Pilotversuche zur Erstbesiedlung	76
6.2	Ergebnisse der „Belastungsversuche“ unterschiedlicher Biocarrier	78
7	Diskussion.....	81
7.1	Quantifizierung und Kultivierung	81
7.2	Identifizierung	81
7.3	Aktivitätsbestimmungen	83
7.4	Materialtestverfahren	83
7.5	Feldversuch in Strande	84
7.6	Toxizität von Metallen auf die Nitrifikation	84
7.7	Hemmende Wirkung von Inhaltsstoffen auf biofilmbildende Bakterien	84
7.8	Chemische Analyse	85
7.9	Hemmung von Nitrifikanten durch Ammonium und Nitrit	85
7.10	Hemmung von Nitrifikanten durch Nitrat.....	86
8	Vorschläge für die zweite Projektphase.....	87
9	Anhang	87
10	Literatur	91

Zusammenfassung

In einem vielschichtigen Ansatz wurden die nitrifizierenden Bakterien aus den Biofiltern der Ecomares Fischfarmen in Büsum und Strande untersucht. Sie wurden quantifiziert, zum Teil identifiziert und in Laboransätzen kultiviert.

Nach einer Inkubationszeit von 14 Wochen bei 17°C konnten in Büsum durchschnittlich $8,0 \times 10^5$ Zellen von Ammoniakoxidanten pro Füllkörper in Modul 1 und $3,7 \times 10^5$ Zellen von Ammoniakoxidanten pro Füllkörper in Modul 2 nachgewiesen werden. Bei den Nitritoxidanten betrug die mittlere Zellzahl $2,6 \times 10^5$ Zellen pro Füllkörper in Modul 1 und $4,1 \times 10^5$ Zellen pro Füllkörper in Modul 2.

Der Aufbau des nitrifizierenden Biofilms in Form von Mikrokolonien konnte elektronenmikroskopisch visualisiert werden. Anhand der charakteristischen Ultrastruktur konnten Zellen von *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus* als Ammoniakoxidanten und *Nitrospira* als häufigster Nitritoxidant identifiziert werden. Die Dominanz von *Nitrospira* konnte immunologisch bestätigt werden.

Die molekularbiologische Untersuchung mittels spezifischer PCR bestätigte das Vorkommen von *Nitrosomonas* und *Nitrospira*. Die 16S rRNA Sequenzierung zeigte, dass es sich bei einem Stamm von *Nitrosomonas* um die bekannte Art *Nm. cryotolerans* handelt, während der andere Vertreter zu einer neuen Linie gehört, von der bereits andere Isolate aus marinen Lebensräumen vorliegen. Die molekularbiologische Identifizierung von *Nitrosococcus* steht noch aus.

Die phylogenetische Einordnung von *Nitrospira* zeigte, dass es sich um einen bislang unbekanntem Vertreter dieser Gattung handelt, da er mit nur 92% Sequenzhomologie eine sehr geringe Verwandtschaft zu der beschriebenen Art *Ns. marina* aufweist. Eine Isolierung dieses Stammes ist sinnvoll, da er eine hohe Substrattoleranz gegenüber Nitrit aufweist, die mit der eines terrestrischen Vertreters aus Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage vergleichbar ist. Nitritoxidanten der Gattung *Nitrobacter* konnten nur in geringer Anzahl im Biofilm aus Modul 1 detektiert werden.

In einem Kurzzeit-Aktivitätstest konnte das Abbaupotential der Ammoniak und Nitrit oxidierenden Bakterien gemessen werden, um den „Ist-Zustand“ der Biofilmzellen aufzunehmen. Es zeigten sich deutliche Abhängigkeiten von der Temperatur, der Zufuhr von Sauerstoff, von den eingesetzten Stickstoffkonzentrationen und der Besatzdichte in den Fischbecken. Bei gleicher Substratmenge zeigten die Nitritoxidanten eine etwa dreimal so

hohe Aktivität wie die Ammoniakoxidanten. In Modul 1 wurden Substratumsätze von 153 – 433 nmol/h x Füllkörper für die Ammoniakoxidanten und von 430-1128 nmol / h x Füllkörper für die Nitritoxidanten gemessen.

Anhand eines Langzeit-Hemmversuches war es möglich, den Einfluss verschiedener Kunststoffmaterialien auf das Wachstum der Nitrifikanten zu analysieren. Die hemmende Wirkung variierte in Abhängigkeit der Versuchsparameter, sie war aber bei zwei weißen fabrikneuen Granulaten am stärksten ausgeprägt.

Eine intensive Beprobung der Wasserwerte in der Anlage Büsum ergab eine geringe Belastung an Ammonium (9 – 37 μM), eine mittlere an Nitrit (15 – 43 μM) und eine relativ hohe Konzentration an Nitrat (6.000 – 6.500 μM entspricht 375 – 400 mg/L). Dies könnte einen hemmenden Einfluss auf die nitrifizierenden Bakterien im Biofilter haben, wie erste Versuche im Kurzzeit-Aktivitätstest gezeigt haben. Die maximale Abbauleistung für Ammonium im Biofilter aus Modul 1 betrug am 19.10.06 18 μM pro Durchlauf. Für Modul 2 wurde eine Ammoniumabnahme von 8 μM bestimmt. Beim Durchlauf des Kreislaufwassers durch die Biofilter konnte keine Nitritabnahme nachgewiesen werden.

In einem Feldversuch in der Anlage Strande wurde bei 5 untersuchten Füllkörpern nach der Erstbesiedlung die beste Abbauleistung für Ammonium und Nitrit beim Typ E1 (entspricht F1) und E3 (entspricht F2) festgestellt. Der Typ F2 aus recyceltem PE wird zurzeit standardmäßig als Biocarrier in Büsum und Strande eingesetzt, bei F1 handelt es sich um die entsprechende Rohware. Dagegen schnitt der Biocarrier E3 (F2) in einem längerangelegten Belastungstest schlechter ab als die anderen Füllkörper. In diesem Fall zeigte der Biocarrier E4 aus recyceltem PE, der eine andere Form aufweist als E3, die beste Nitrifikationsaktivität.

1 Einleitung

1.1 Aquakultur

Die Bedeutung der Nahrungsmittelproduktion durch Aquakulturen nimmt weltweit zu. Während die Fischereierträge aufgrund der intensiven Nutzung der Weltfischbestände mit Tendenzen zur Überfischung einzelner Arten und Gebiete auf dem heutigen Niveau von ca. 90 Mio. Jahrestonnen stagnieren, kann der wachsende Bedarf an Fischprotein nur durch die Steigerung der kontrollierten Produktion von Meeres- und Süßwasserorganismen in Farmen gedeckt werden. Insbesondere wegen des ressourcenschonenden Verfahrens und der erheblich verringerten Umweltbelastungen stellt die Kreislauftechnologie eine Alternative zu den weniger nachhaltigen offenen Verfahren (Teiche, Netzkäfige) dar. In einem solchen Betrieb erfolgt Aufzucht und Mast von Fischen etc. in geschlossenen Gebäuden unter kontrollierten Bedingungen hinsichtlich Wasser- und Futterqualität.

Aquakultur ist der am schnellsten wachsende Bereich der Lebensmittelproduktion. Der in Aquakultur produzierte Anteil an Fischen, Weichtieren und Krebsen stieg von 3,9 % in 1970 auf 27,3 % im Jahr 2000 an (FAO, 2002). Eine Konsequenz ist die Intensivierung der Biomasseproduktion. Durch hohe Besatzdichten und hohe Retentionszeiten kommt es in den Anlagen aber zur Anhäufung von Stoffwechselendprodukten (Piedrahita, 2003), die das Wasser und damit die Fische belasten.

1.2 Biofiltration

Das von Fischen abgegebene Ammonium ist das Hauptprodukt des Eiweißstoffwechsels (Handy und Poxton, 1993). Darüber hinaus wird das Wasser durch Futterreste und Exkretionsprodukte verschmutzt. Die Konzentration des für Fische toxischen Ammoniums kann im Tagesgang und in Abhängigkeit von der verabreichten Futtermenge erheblich schwanken. Um das Ammonium aus dem Kreislaufwasser zu entfernen, werden Biofilter zur Nitrifizierung (Oxidation) der Stickstoffverbindungen eingesetzt. Diese Biofilter enthalten Trägermaterialien mit Biofilm aus nitrifizierenden und heterotrophen Bakterien (Sakano und Kerkhof, 1998; Fdz-Polanco et al., 2000; Okabe et al., 2002).

Dabei besteht eines der Probleme darin, dass der Biofilter mit dem nitrifizierenden Biofilm für einen vollständigen Abbau entsprechend dimensioniert sein muss. Ebenso unterliegen der CSB (chemischer Sauerstoffbedarf) und der Gehalt an partikulärer Substanz im Ablaufwasser erheblichen Schwankungen, so dass Einbrüche in der Abbauleistung der nitrifizierenden Biofilter immer wieder zu beobachten sind (Ling und Chen, 2005). In Aquakulturen ist die Oxidation des von den Fischen produzierten Ammoniums jedoch wegen seiner bei höheren Konzentrationen toxischen Wirkung essenziell (Mc Caig et al. 1999). Die Folgen unvollständiger Abbauvorgänge sind erhöhter Stress für die Fische durch eine verschlechterte Wasserqualität, was zu geringer Futteraufnahme und -verwertung und damit zu noch stärkerer Belastung des Wassers führt. Besonders in Marikultur-Anlagen kann die ungenügende Kapazität der Biofilter limitierend wirken, da die dort vorkommenden Nitrifikanten aufgrund des Salzgehaltes im Wasser weniger aktiv sind als die im Süßwasser (Nijhof und Bovendeur, 1990).

Durch das langsame Wachstum der nitrifizierenden Bakterien (die minimale Generationszeit beträgt 8 Stunden) kann es in neuen Aquarien bei hohen Fischdichten zu toxischen Konzentrationen des giftigen Ammoniums und Nitrits kommen („new tank syndrome“). Diese Startphase kann 28-60 Tage dauern (Carmignani und Bennett, 1977). Charakteristisch ist hierbei die über einen langen Zeitraum auftretende hohe Konzentration an toxischem Nitrit (Van Rijn und Rivera, 1990), da die nitritoxidierenden Bakterien deutlich langsamer wachsen als die Ammoniak oxidierenden Bakterien. Als Endprodukt der biologischen Nitrifikation

reichert sich Nitrat an, welches aber wesentlich weniger toxisch ist als Ammonium oder Nitrit. Um die Umweltbelastung weiter zu verringern, können Aquakulturanlagen zusätzlich mit einer Denitrifikationsstufe ausgestattet werden (Boley et al., 2000).

Der Filter, der im Mittelpunkt dieses Projektes steht, nutzt die Bewegtbett-Technologie („Moving-bed“). Dieses Funktionsprinzip findet zunehmende Beachtung in der Aquakultur und Marikultur, da die Durchmischung und Belüftung des Trägermaterials vom Durchfluss abgekoppelt ist und daher wichtige Betriebsparameter wie Strömungsgeschwindigkeit an den Medienoberflächen, Verweilzeit des Substrats und Sauerstoffangebot gezielt beeinflusst werden können. Die internen Strukturen der Biofilter werden inzwischen überwiegend aus Kunststoffen hergestellt, denen aus materialtechnischen (Langlebigkeit) und verarbeitungstechnischen Gründen (Extrudierfähigkeit) von den Herstellern Additive wie Katalysatoren und Weichmacher beigegeben werden, deren teils biozide Eigenschaften bei der Anwendung im Biofilter erhebliche Probleme bereiten können.

Bisher sind keine Erfahrungen verfügbar, die eine gezielte Zusammensetzung dieser Materialien für eine Förderung der Besiedlung mit nitrifizierenden Biofilmen ermöglichen würden. Im Projekt sollten in Kooperation mit dem Branchenführer detaillierte Untersuchungen zur Optimierung solcher Träger für Nitrifikanten durchgeführt werden. In der ersten Phase wurden zunächst von der Fa. 2H - Kunststoffe weltweit vermarktete Füllkörper des „Kaldnes“-Typs eingesetzt.

1.3 Toxische Effekte von Stickstoffverbindungen auf aquatische Lebewesen

Ammonium

Fische scheiden Ammoniak (NH_3) über die Kiemen aus. Verschiedene Autoren geben für Fische NH_3 -Grenzwerte je nach Einwirkungszeit, Temperatur und Fischart von 0,01 - 2 mg/L an (0,6 – 117 μM).

Das Ammoniumion ähnelt dem Kaliumion sowohl in Größe als auch Ladung, wodurch kaliumgesteuerte Synapsen dauerhaft blockiert werden können. Außerdem steht das Ammoniumion in einer Gleichgewichtsreaktion mit dem ebenfalls sehr giftigen Ammoniak. Ammoniumgehalte im Wasser von 0,5–1 mg/L (28-56 μM) werden für Fische als bedenklich eingestuft; Werte über 1 mg/L (56 μM) sind für Fischereizwecke nicht geeignet.

Nitrit

Nitrit dringt hauptsächlich über die Chloridzellen auf den Kiemen in den Blutkreislauf des Fisches ein und blockiert dort das Hämoglobin, wodurch es im Extremfall zum Erstickungstod kommen kann. Ein Chloridüberschuss, wie er im Salzwasser vorkommt, schützt die Fische teilweise vor dem Nitrit. Die Toxizität nimmt bei sauren pH-Werten zu, da bei niedrigem pH undissoziierte salpetrige Säure entsteht. Die Toleranz ist bei den einzelnen Fischarten sehr verschieden, so dass man keinen allgemeingültigen Grenzwert angeben kann. In einer Krebszucht wurde eine zunehmende Sterblichkeit bei 2 mg Nitrit/L (43 μM) beobachtet (Manthe et al., 1984). In einem aktuelleren Review sind die LC50 Werte verschiedener Fischarten für Nitrit zusammengetragen (Philips et al., 2002). Sie liegen zwischen 0,1 und 607 mg N/L (7 - 43 μM), d.h. es gibt eine große Reaktionsbreite. Lewis und Morris (1986) geben je nach Fischart LC50 Werte nach 96 h von 0,24 bis 140 mg/L (5 - 3000 μM) an. Neben dem direkten toxischen Effekt von Nitrit gibt es das Problem der Bildung von krebserregenden Nitrosaminen.

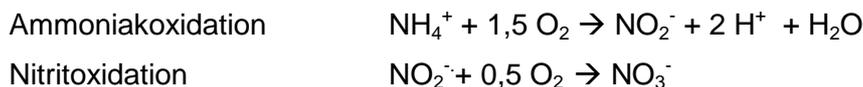
Nitrat

Nitrat gilt zwar selbst nicht als gesundheitsschädlich, kann aber im Verdauungstrakt der Fische durch Reduktion zu Nitrit umgewandelt werden.

1.4 Nitrifikation

Nitrifizierende Bakterien nehmen im globalen Stickstoffkreislauf eine zentrale Position ein. Sie oxidieren das bei der Mineralisation organischer Substanz freigesetzte Ammoniak in zwei Schritten zu Nitrit und weiter zu Nitrat. Es handelt sich um zwei Gruppen chemolithoautotropher Mikroorganismen, die Ammoniak- und die Nitritoxidanten, die für ihr Zellwachstum Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle nutzen.

Der mikrobielle Umsatz von Ammonium zu Nitrat in zwei Teilschritten kann wie folgt dargestellt werden:



In der Literatur sind fünf morphologisch definierte Gattungen der Ammoniakoxidanten unterteilt: *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus* und *Nitrospira* (Watson et al., 1989). Bislang sind insgesamt 16 Arten Ammoniak-oxidierender Bakterien beschrieben und 15 weitere identifiziert worden (Purkhold et al., 2000). Marine Vertreter stammen aus den Gattungen *Nitrosomonas* und *Nitrospira*. Zu einem anderen Entwicklungszweig gehören die salzliebenden Ammoniakoxidanten *Nitrosococcus oceani* und *Nitrosococcus halophilus*.

Der zweite Schritt der Nitrifikation ist die Oxidation von Nitrit zu Nitrat, die von Nitrit oxidierenden Bakterien durchgeführt wird. Als Gattungen sind *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospina* und *Nitrospira* mit bislang 8 Arten beschrieben worden (Bock und Koops, 1992). In der mikrobiellen Ökologie konnte gezeigt werden, dass Vertreter der Gattung *Nitrospira*, und nicht die besser bekannten Arten von *Nitrobacter*, die dominierenden Nitritoxidanten in Aquarien mit Salz- oder Frischwasser sind (Hovanec und De Long, 1996). Von dieser Gattung existieren zurzeit nur zwei beschriebene Reinkulturen, *Ns marina* (Watson et al., 1986) und *Ns. moscoviensis* (Ehrich et al., 1995).

Bei Abwesenheit von Sauerstoff werden beide Produkte der Nitrifikation – Nitrit und Nitrat – infolge der Aktivität von denitrifizierenden Bakterien zu gasförmigen Stickoxiden (NO_x) bzw. molekularem Stickstoff (N_2) reduziert. Auch Nitrifikanten können bei Sauerstoffmangel denitrifizieren (Goreau et al., 1980) und tragen somit zur Freisetzung klimarelevanter Stickoxide wie N_2O bei.

1.5 Identifizierung von nitrifizierenden Bakterien

Die klassische Einteilung der Gram-negativen Nitrifikanten erfolgt anhand der Zellgestalt und Ultrastruktur. Zellen von *Nitrosomonas* haben die Form von Kurzstäbchen, die von *Nitrosococcus* sind kugelförmig. Bei *Nitrospira* handelt es sich um Spirillen, während Vertreter von *Nitrosolobus* lobuläre Zellen bilden. Die stäbchenförmigen Zellen von *Nitrosovibrio* sind gebogen. Intracytoplasmatische Membranen sind bei *Nitrosomonas* und bei *Nitrosococcus* als abgeflachte Vesikel vorhanden, die peripher oder zentral angeordnet sind.

Bei der Gattung *Nitrobacter* handelt es sich um pleomorphe Kurzstäbchen mit einem peripheren Stapel aus intracytoplasmatischen Membranen (ICM). Die kugelförmigen Zellen von *Nitrococcus* enthalten tubuläre ICM. Für *Nitrospira* sind spiralige Stäbchen charakteristisch und die Gattung *Nitrospina* besteht aus langen, geraden Stäbchen. Die Vertreter dieser beiden Gattungen enthalten keine ICM.

Die meisten Ammoniakoxidanten (*Nitrosomonas*, *Nitrospira*, *Nitrosovibrio*, *Nitrosolobus*) gehören abstammungsgeschichtlich zu den *Betaproteobakterien*. Eine Ausnahme bilden die beiden marinen Arten der Gattung *Nitrosococcus*, die den *Gammaproteobakterien* angehören.

Die Nitritoxidanten zeichnen sich durch eine hohe phylogenetische Heterogenität aus. Während *Nitrobacter* und *Nitrococcus* zu den *Alpha*- bzw. *Gammaproteobakterien* gehören, ist *Nitrospira* die namensgebende Gattung eines tief abzweigenden Phylums im Stammbaum der Bakterien (Ehrich et al., 1995). Die phylogenetische Stellung von *Nitrospina* ist noch nicht endgültig geklärt, aber vermutlich kann die vorläufige Eingruppierung in die *Deltaproteobakterien* (Teske et al., 1994) nicht aufrecht erhalten werden.

Heutzutage konzentrieren sich die meisten Studien an komplexen Naturproben auf den Einsatz molekularer, kultivierungsunabhängiger Methoden. In den meisten Fällen wurde die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) mit Sonden gegen die 16S rRNA oder spezielle Enzyme angewendet. Eine alternative Nachweismethode auf funktioneller Ebene stellt die Reaktion mit monoklonalen Antikörpern dar, die gegen das Schlüsselenzym der Nitritoxidation – die Nitritoxidoreduktase – gerichtet sind (Aamand et al., 1996). Der selektive Nachweis mit drei verschiedenen Antikörpern ermöglicht eine Differenzierung der Nitritoxidanten auf Gattungsebene (Bartosch et al., 1999).

1.6 Anheftung von Nitrifikanten

In Aquakulturen wird die sessile Lebensweise von Nitrifikanten genutzt, um den Biofilm gezielt auf Füllkörpern zu fixieren, die in den Biofiltern für die Wasserreinigung eingesetzt werden. Um die Effizienz zu steigern, wurden verschiedene Kunststoffe als Biofilter-Material getestet (Krüner und Rosenthal, 1983; Lekang und Kleppe, 2000; Sandu et al., 2002), die große Unterschiede aufzeigten.

Es ist seit vielen Jahren bekannt, dass die Aktivität und die Überlebensfähigkeit von Nitrifikanten durch die Anheftung an Oberflächen gesteigert wird (Diab und Shilo, 1988). Bei diesen Experimenten dienten z.B. Kreide oder Partikel aus Bentonit bzw. Amberlit als Aufwuchsmedium für *Nitrosomonas* und *Nitrobacter*, die zuvor aus Fischfarmsedimenten isoliert worden waren. Experimente an Glas- und Harz-Perlen zeigten zudem eine höhere Toleranz von *Nitrobacter* gegen saure pH-Werte (Keen und Prosser, 1987). Eine vergleichbare Stimulierung der Nitrifikation erfolgte mit Bodenpartikeln und Polysaccharidperlen (Gadkari, 1990).

Weitere Materialien, die zur Anheftung von Nitrifikanten im Rahmen einer Abwasserbehandlung benutzt wurden, sind Linpor und PVA (Rostron et al., 2001), sowie Cellulose (Matsumura et al., 1997) oder Styroporkugeln (Wiegel, 2002). Die Biofilmbildung auf Glasperlen durch *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* ist rasterelektronenmikroskopisch von Cox et al. (1980) visualisiert worden. Das Wachstum von *Nitrosomonas* in Form von Mikrokolonien auf Polypropylen-Röhren mit einer rauen Oberfläche wurde von Kloep et al. (2000) dokumentiert. Dabei bildete sich der Biofilm auf der Außenseite der Röhren in kanalartigen Strukturen aus, die in Längsrichtung verliefen. In einer anderen Studie wurde das Polyester Dacron als künstliches Aufwuchsmedium für Nitrifikanten benutzt (Franco-Rivera et al., 2007).

1.7 Populationsanalysen von Nitrifikanten in der Aquakultur

Erst seit wenigen Jahren werden Populationsanalysen von nitrifizierenden Bakterien auf Biofiltern in Aquakulturen durchgeführt, wobei es nur wenig Informationen über marine Anlagen gibt. Es existieren weiterhin kaum Laborkulturen von Ammoniak- oder Nitritoxidanten, die aus Aquakulturanlagen stammen.

Wie oben bereits erwähnt, konnte die weitverbreitete Lehrmeinung, dass es sich beim dominierenden Nitritoxidanten um *Nitrobacter* handelt, nicht bestätigt werden (Hovanec et al., 1998; Kloep et al., 2000). Dagegen stellte sich heraus, dass in Süß- und Salzwasseraquarien *Nitrospira* der Schlüsselorganismus ist, mit einer Art, die an den jeweiligen Salzgehalt angepasst ist. So wurde in einer Marikulturanlage *Ns. marina* detektiert (Tal et al. 2003), während in Frischwassersystemen nahe Verwandte von *Ns. marina* bzw.

Ns. moscoviensis vorkamen (Hovanec et al., 1998; Sugita et al. 2005). Ebenso sind die Ammoniumkonzentration und der Salzgehalt im Wasser entscheidend für die Etablierung einzelner Arten von Ammoniakoxidanten (Burrell et al., 2001; Grommen et al., 2005). Als Schlüsselorganismus in Frisch- sowie Salzwasseraquarien wurde *Nitrosomonas* identifiziert, wobei sich als dominierende Arten in Salzwasseraquarien *Nm. cryotolerans* (Tal et al., 2003), *Nm. europaea* (Hovanec und DeLong, 1996) und *Nm. aestuarii* (Itoi et al., 2006) fanden.

1.8 Starterkulturen

In der kritischen Startphase der Nitrifikation in einem Aquarium bzw. einer Aquakulturanlage werden teilweise kommerziell erhältliche Produkte (Bower und Turner, 1984) eingesetzt, die hohe Zellkonzentrationen an Ammoniak- und Nitritoxidanten enthalten. Die Zusammensetzung der bakteriellen Population dieser Inokula ist aber oftmals unbekannt und die Wirkung nicht wissenschaftlich dokumentiert.

Als Starterkultur ist z.B. „Fritz-Zyme“ erhältlich, welches als Frischwasserprodukt Vertreter von *Nitrosomonas* und von *Nitrobacter* enthält. Die Alternative für marine Anlagen beinhaltet obligat halophile Nitrifikanten der Gattungen *Nitrosococcus* und *Nitrococcus*. Diese Organismen konnten jedoch in einer neuen Anlage nur die Ammoniak-, nicht aber die Nitritoxidation stimulieren (Bower und Turner, 1984). Dagegen konnte die Nitrifikation in einer israelischen Marikulturanlage erfolgreich mit einer Anreicherungskultur von Ammoniak- und Nitritoxidanten beschleunigt werden, die aus Böden der Umgebung gewonnen wurde (Grossa et al., 2003). Weiterhin wurde ein Produkt aus nitrifizierendem Belebtschlamm hergestellt (Grommen et al., 2002), welches nach mehrjähriger Versorgung mit hohen Stickstoffkonzentrationen hauptsächlich *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* enthielt (Vanparys et al., 2007). Der Einsatz von *Nitrospira* als Starterkultur für Aquarien wurde von Hovanec et al. (1998) patentiert.

Eine weitaus einfachere Möglichkeit der Verkürzung der Startphase besteht in der „Beimpfung“ des Biofilters mit Trägermaterial aus einer laufenden Anlage, so dass die Nitrifikanten an die vorherrschenden Bedingungen bereits angepasst sind.

1.9 Konkurrenz mit heterotrophen Begleitorganismen

Neben den erwünschten nitrifizierenden Bakterien können sich auch unerwünschte chemoorganotrophe Mikroorganismen auf dem Trägermaterial anreichern, die den Aufwuchs von nitrifizierenden Bakterien stören. So zeigten Ling und Chen (2005), dass die Nitrifikationsrate mit der Zugabe von organischen Substanzen exponentiell abnahm, was eine entscheidende Bedeutung für die Kontrolle der Feststofffracht im System hat. Hohe Konzentrationen an organischen Substanzen verursachen eine Konkurrenz der nitrifizierenden Bakterien mit den heterotrophen Begleitorganismen um den gelösten Sauerstoff als auch um den Lebensraum im Biofilm (Wanner und Gujer, 1985; Furumai und Rittmann, 1992). Infolge der höheren Wachstumsrate der heterotrophen Bakterien können die Nitrifikanten von der Oberfläche verdrängt und somit kann eine ungenügende Substratversorgung hervorgerufen werden (Fdz-Polnaco et al., 2000). Ein kritischer Faktor für die Dominanz der heterotrophen Bakterien ist das C:N-Verhältnis (Okabe et al., 1996; Verhagen und Laanbroek, 1991; Ballinger et al., 2002). Zusätzlich werden die Begleitorganismen durch die Ausscheidung von löslichen Produkten infolge einer aktiven Nitrifikation gefördert (Furumai und Rittmann, 1992).

1.10 Inhaltsstoffe von Polymeren

Alle Polymere sind stoffliche Gemische und bestehen aus einer Reihe von Komponenten, die sowohl während der Polymerisation als auch in der späteren Verwendung eine bestimmte Funktion ausüben und somit für die Qualität des Produktes, seiner Einsatzmöglichkeiten und Langlebigkeit von entscheidender Bedeutung sind. Dieses bedeutet, dass z.B. PE oder PP keineswegs Reinprodukte sind, sondern in der Regel aus 10 – 20 Komponenten bestehen.

Im Wesentlichen handelt es sich folgende Inhaltsstoffe:

- Ausgangsstoffe, zugesetzte Polymerisate, bzw. Mischpolymerisate
- Katalysatoren
- Emulgatoren (PVC)
- Schutzkolloide (PVC)
- Stabilisatoren, syn. Alterungsschutzmittel
- Gleit- und Formtrennmittel
- Weichmacher
- Füllstoffe und Pigmente
- Vulkanisationsbeschleuniger, -aktivatoren, -verzögerer und -hilfsmittel für Natur- und Synthetikgummi, Vernetzer, Oberflächenhärter

Bei Stabilisatoren handelt es sich in der Regel um technische Biozide, die in anderen Zusammenhängen Konservierungsstoffe genannt würden. Auch Antioxidantien sind häufig toxische Substanzen. Sie sollen den mikrobiellen Abbau des Polymers verhindern oder zumindest verzögern. Zudem ist zu beachten, dass die bei der Polymerisation verwandten Katalysatoren häufig organometallische Verbindungen mit toxischen Eigenschaften sind.

Eine besondere Problematik der eingesetzten Inhaltsstoffe besteht darin, dass sie in der Regel nicht zu 100% chemisch fest gebunden sind, sondern entweder als Restmonomere, nicht gebundene Katalysatorenrückstände oder als frei assoziierte Additive im Polymer migrieren, aus dem Polymer diffundieren und damit in das Umgebungswasser gelangen können. Daraus erklärt sich, dass für Polymere mit Trinkwasserkontakt Migrationsraten bestimmt werden, die bestimmte Werte nicht überschreiten dürfen. Hierbei wird häufig zwischen einer kurzfristigen Induktionsphase der Migration oder des Leachings und eines dauerhaften, langfristigen Übertritts von Inhaltsstoffen in das Umgebungswasser unterschieden.

In der Literatur finden sich zahlreiche Beispiele für die Migration von Stoffen und Einzelkomponenten aus Polymeren mit Trinkwasserkontakt. So fanden sich im Wasser und im Biofilm in PE-Rohren, in denen Oberflächenwasser und Trinkwasser transportiert wird, Abbauprodukte von Antioxidantien wie Irgafos 168, Irganox 1010 und Irganox 1076, die HDPE (High Density Poly Ethylene) -Polymeren zugesetzt werden. Beispielsweise konnten als Abbauprodukte von Irgafos 168 und Irganox 1010/1076 2,4-di-tert-butylphenol und 2,6-di-tert-butylbenzoquinon im Wasser (60 – 600 ng/L) und im Biofilm nachgewiesen werden (Skjerve et al., 2003; 2005). Diese Stoffe migrieren nicht nur kurzfristig aus dem Polymer, sondern waren auch noch nach 41 Tagen im Wasser nachweisbar. Da die eingesetzten Ausgangssubstanzen als Antioxidantien, offenbar auch als Biozide zur lebenslangen Verhinderung des mikrobiellen Abbaus zugefügt wurden, muss mit einer permanenten Leachingrate gerechnet werden. Ebenso sind Untersuchungen über die Migration dieser Substanzen in tiefgefrorenen Lebensmitteln durchgeführt worden, in denen 0,02 – 0,80 µg/g nachgewiesen wurden (Tanaka et al., 2003). Weichmacher wie Nonyl-Phenol oder Bisphenol A können aus HDPE- und PVC-Behältern austreten, wobei von Werten von 180 bis 300 ng/L berichtet wird (Loyo-Rosales et al., 2004). In PVC-Materialien tritt zusätzlich die Problematik

der Migration von Organozinn-Verbindungen auf (Sadiki et al., 1996; Watermann et al., 2005).

Darüberhinaus können auch aromatische Kohlenwasserstoffe, wie z.B. Benzol, Toluol, Ethylbenzol, Xylol und Styrol in Konzentrationen von 200 -1300 ng/L austreten. Für Benzol wurden Werte zwischen 500 und 1000 ng/L berichtet. Der Grenzwert der EU-Trinkwasser-Verordnung liegt bei 1000 ng/L (Skjevraak et al., 2003).

In der Lebensmittelkonservierung werden zunehmend ionisierende Strahlen eingesetzt, welche ebenfalls daraufhin untersucht wurden, ob durch ihren Einfluss Additive aus HDPE, PVC oder anderen Polymeren herausgelöst werden können (Goulas et al., 2002). Diese Untersuchungen sind für die Aquakultur von besonderem Interesse, da hier das Wasser und damit die Beckenauskleidungen regelmäßig mit UV-Strahlung behandelt werden, welche in ihrer Intensität aber deutlich geringer ist.

Da in der Aquakultur auch PE-Materialien aus recyceltem Material eingesetzt werden, sind das Migrationsverhalten und die möglichen Kontaminanten von besonderem Interesse. Messungen ergaben, dass in recyceltem HDPE-Granulat ungesättigte Oligomere sowie Abbauprodukte von Antioxidantien zu finden waren. Die Unterschiede zu frisch produziertem HDPE waren relativ gering (Welle, 2005).

Zu den wichtigsten Polymeren, die für den Einsatz im Trinkwasserbereich empfohlen werden, gehören Polyvinylchlorid, Polyethylen, Polypropylen, Epoxi- und Acetalharze. Für die Aquakultur sind insbesondere solche Polymere interessant, die keine negativen Effekte auf die erzeugten Fische, Krebse und die Anlage haben.

Seit 1977 - fast 30 Jahre vor der Einführung von REACH (Registration Evaluation Authorization of Chemicals) – werden für Polymere mit Trinkwasserkontakt so genannte KTW (Kunststoffe und Trinkwasser)-Empfehlungen herausgegeben, welche auf Positivlisten der Inhaltsstoffe und besonderen Prüfverfahren hinsichtlich ihrer Inhaltsstoffe und Materialbeschaffenheit basieren. Sowohl der Inhalt der Positivlisten als auch die Prüfverfahren wurden laufend aktualisiert und werden zur Zeit auf EU-Ebene harmonisiert. Aktuell gilt die Leitlinie des Umweltbundesamtes zur veränderten Durchführung der KTW-Prüfungen bis zur Gültigkeit des Europäischen Akzeptanzsystems für Bauprodukte im Kontakt mit Trinkwasser (EAS), welche seit Anfang 2006 die alten KTW-Leitlinien teilweise ersetzt. In dieser Leitlinie sind Positivlisten für die Überprüfung der Rezeptur und für die Festlegung der rezepturabhängigen Einzelstoffanforderungen festgelegt.

Die Positivlisten umfassen immer noch eine sehr große Zahl von Substanzen, deren Bewertung häufig auf dürrtiger Datenlage basiert. Allein das „Synoptic document“ als Positivliste der Additive umfasst mit seinen Listen 367 Seiten. In diesem Dokument werden die Substanzen in 8 verschiedenen Kategorien in Abhängigkeit von der Datenlage zu ihrer Toxizität aufgelistet, wobei auch solche Stoffe gelistet sind, deren Verwendung ausdrücklich nicht empfohlen wird.

Positiv hervorzuheben ist aber, dass konsequenterweise mehrere Überlegungen zusammenfließen. Erstens wird die Gesetzgebung für Polymere mit Trinkwasserkontakt mit derjenigen für Polymere mit Lebensmittelkontakt zusammengeführt. Zweitens wird in einer Art kleinem „REACH“ ein Prüfverfahren für Inhaltsstoffe eingeführt. Im Hinblick auf die Aquakultur schließt sich der Kreis, da hier Lebensmittel (Fische) hergestellt werden und die Fische das Wasser gleichzeitig als Lebensmittel nutzen.

Grob zusammengefasst gelten bis Ende 2006 die folgenden Empfehlungen und Leitlinien:

Organische Materialien		Positivlisten
Kunststoffe	Monomere und Additive	Richtlinie 2002/72/EG, Bedarfsgegenstände-Verordnung
	Zusätzlich nur bei Additiven	Nationale Bewertungen in den Empfehlungen des BfR, sowie bewertete Stoffe des Synoptic Document
	Polymerisationshilfsstoffe	BfR-Empfehlungen
Beschichtungen		Leitlinien für Epoxidharze und für organische Beschichtungen mit Listung der DWPLL für die Einzelstoffe und relevante Summenparameter
Silikone		BfR-Empfehlung XV
Schmierstoffe		Leitlinien für Schmierstoffe

Quelle: UBA Leitlinie 2005

Abkürzungen: DWPLL = Drinking Water Positive List Limit

BfR = Bundesinstitut für Risikobewertung

Synoptic document = Provisional list of monomers and additives notified to European Commission as substances which may be used in the manufacture of plastics intended to come into contact with foodstuffs (367 Seiten)

Bei der Eignungsprüfung werden folgende Eigenschaften herangezogen:

- Mechanische Festigkeit
- Wärmestandfähigkeit
- Chemische Inertheit
- Undurchlässigkeit gegenüber flüchtigen Stoffen
- Reinigungsmöglichkeit

Zur Prüfung der Inertheit oder Reaktionsträgheit wird die Migration organischer Kohlenstoffverbindungen gemessen. Zudem wird eine so genannte Chlorzehrung vorgenommen. Hierbei wird dem Prüfwasser freies, reaktives Chlor zugesetzt, welches im Kontakt mit dem Bedarfsgegenstand nur bis zu einem bestimmten Grenzwert gezehrt werden darf. Als letzte Eigenschaft soll sich der Bakteriengehalt, sprich die Keimzahl des Prüfwassers, nicht erhöhen.

Insbesondere die Zehrung durch reaktives Chlor ist für die Aquakultur von Interesse, da in verschiedenen Anlagen stoßweise reaktives Chlor zu Desinfektionszwecken zugeführt wird. Bei solchen Reinigungsvorgängen sollten weder schädliche Inhaltsstoffe der Polymere herausgelöst, chemisch als Beiprodukte erzeugt oder die Stabilität des Polymers beeinträchtigt werden.

Im laufenden Projekt stellte sich heraus, dass die eingesetzten Füllkörper sowohl mit chromhaltigen Katalysatoren polymerisiert worden waren, als auch Irganox 1076 (Octadecyl 3,5-Di-(tert)-butyl-4-hydroxyhydrocinnamate CASRN: 2082-79-3) enthalten.

Im Sicherheitsdatenblatt zu Irganox finden sich folgende Angaben:

Akut-Toxizität Fisch	Akut-Toxizität Invertebraten	Akut-Toxizität Algen	Akut-Toxizität Abwasser-Bakterien
Bluegill 96 Stunden: LC50 > 100 ppm	<i>Daphnia magna</i> 24 Stunden: EC50 >100 ppm	Grünalgen (n. Spez.) 0-72 Stunden: EC50 > 30 ppm	Inhibierende Wirkung auf die Atmung von Aerobiern: IC20, IC50, IC80 >100 ppm
Regenbogenforelle 96 Stunden: LC50 > 100 ppm			

Irganox 1076, bzw. seine chemische Bezeichnung ist nicht in einer Liste des „Synoptic Documents“ aufgeführt, also offenbar nicht für Polymere im Kontakt mit Trinkwasser geeignet. Auf der anderen Seite zeigen die Publikationen von Skjevraak et al (2003 und 2005), dass Irganox dennoch solchen Polymeren zugesetzt wird.

Es soll anhand von PE-Granulaten, die Irganox 1076 wahrscheinlich nicht enthalten, und die wahrscheinlich nicht mit kupferhaltigen Katalysatoren polymerisiert wurden, geprüft werden, ob eine unmittelbare Besiedlung durch Nitrifikanten stattfindet.

1.11 Darstellung der Anlagen von Ecomares

1.11.1 Büsum

Die Steinbuttfarm der Fa. ECOMARES in Büsum hat eine Produktionskapazität von 100 Jahrestonnen und ist in zwei identische Produktionsmodule das Modul 1 (M1) auf der Seeseite der Anlage und Modul 2 (M2) auf der Straßenseite unterteilt. Die Anlagen sind in einer isolierten Halle mit einer Grundfläche von 2400 m² untergebracht. Jedes Modul hat 44 Zuchtbecken, davon 12 Rundbecken mit Durchmessern von 2m bis 7m und 10 Becken von 8 m x 8m Grundfläche.

Die Fische werden in quadratischen Becken (1) gehalten. Alle Becken sind mit regelbarem Zulauf, Ablaufanschlüssen, Wasserstandsmeldern und Sauerstoffsonden ausgestattet. Das "Abwasser" aus den Fischbecken wird zunächst von Futterresten, Kotpartikeln und anderen Feststoffen mechanisch gereinigt. Dazu fließt es durch ein Trommelsieb (3). Die Filtertrommel ist mit einer Nylongaze bespannt, die alle Partikel größer als 60 µm zurückhält. Der Schmutz wird entsprechend dem Verstopfungsgrad des Filters mit Hochdruck-Spüldüsen aus dem Filtersieb entfernt. Das Spülwasser mit dem Schlamm wird dem Kreislauf entnommen. Das gereinigte Wasser wird in einem Pumpensumpf, der über die gesamte Hallenbreite geht, gesammelt.

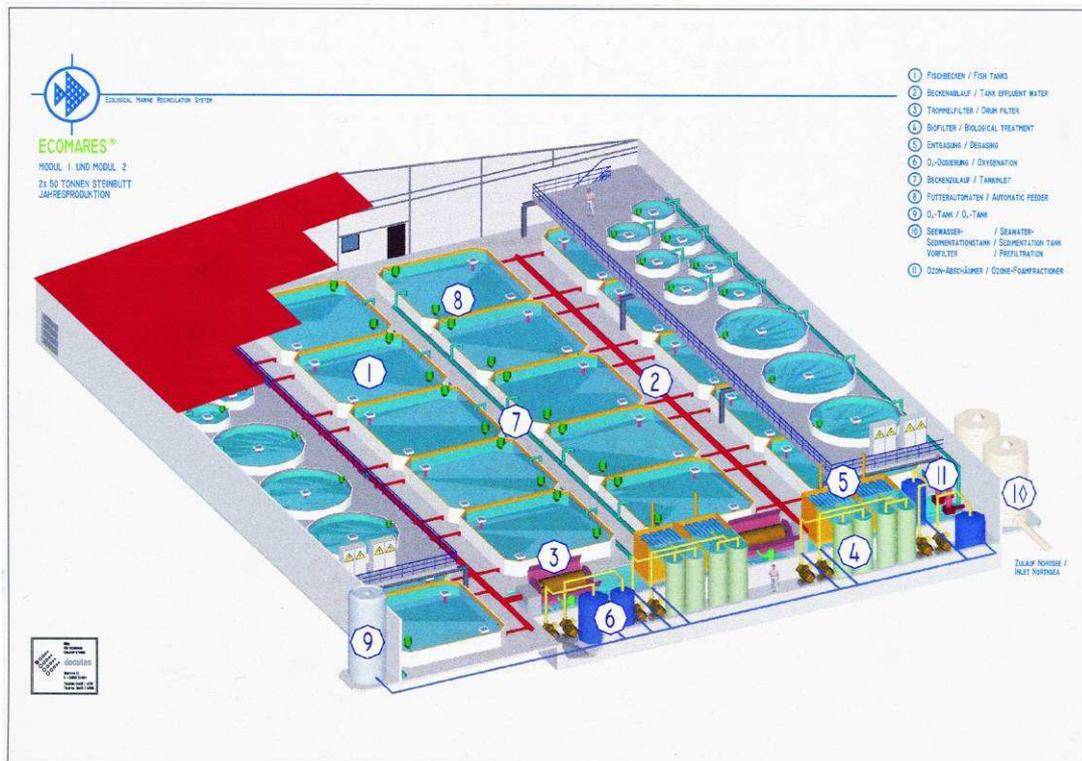


Abb. 1: Schema der Steinbuttfarm Büsum

Neben den Feststoffen ist das Wasser mit Ammonium belastet, das die Fische als Stoffwechselprodukt ausscheiden. Ammonium wird mit ansteigender Konzentration für die Fische selbst giftig. In 2 Bioreaktoren werden die toxischen Ammoniumverbindungen durch bakterielle Nitrifikation zu Nitrat oxidiert. In Kunststoffbecken (6m Durchmesser) werden spezielle Kunststoff-Füllkörper – Biocarrier (BC) – durch Boden-Belüftungen durchmischt und belüftet. Diese Füllkörper dienen als Besiedlungsflächen für die Biofilme. Die verwendeten Biocarrier haben eine spezifische Oberfläche von $800 \text{ m}^2/\text{m}^3$ Füllmaterial.

Der Ablauf aus den Bioreaktorbecken fließt über eine Kaskade (5) zur Entgasung des Wassers in eine Kammer des Pumpensumpfes, wo es von dem mechanisch gereinigten Abwasser abgeteilt ist. Aus dieser Kammer wird das Wasser mit Pumpen über einen Niederdruck-Sauerstoffüberträger (6) in die Fischbecken zurückgepumpt. In den Sauerstoffüberträgern wird dem Wasser technischer Sauerstoff, der in einem Flüssiggastank (9) gespeichert wird, eingemischt, um in den Fischbecken optimale Sauerstoffverhältnisse einzustellen. Die Sauerstoffanreicherung erfolgt über eine automatische Steuerung, die den vorgegebenen Sättigungswert unabhängig von der Stoffwechselaktivität der Fische konstant hält.

Das Wasser der Fischbecken wird 2mal pro Stunde ausgetauscht, das entspricht einem Wasservolumen von $300 \text{ m}^3/\text{h}$, das durch die Komponenten der Wasseraufbereitung fließt.

Etwa 5 – 8% des Gesamtwasservolumens der Anlage (600 m^3) werden täglich durch frisches Seewasser ersetzt. Dieses Seewasser wird in einer Pumpstation am Kopf des Helgolandkais unmittelbar im Einstrombereich des Sperrwerks bei auflaufendem Wasser entnommen und in Vorrattanks (10) gespeichert. Vor Zumischung in die Produktionsanlage wird das Wasser mit Ozon entkeimt und alle organischen Bestandteile werden abgeschäumt.

Alle Prozesse werden über eine speicherprogrammierbare Steuerung (SPS) kontrolliert. Sensoren für Sauerstoff, Temperatur, pH, Leitfähigkeit, CO_2 und Redoxpotential überwachen die wichtigsten Wasserparameter und liefern die Daten für die Steuerung von Sauerstoffbegasung, Pufferzugabe, Kühlung/Heizung und anderen Komponenten.

1.11.2 Strande

Die Versuche wurden an einer geschlossenen Meerwasser-Kreislaufanlage durchgeführt, die für Tests neuer Aquakulturkanidaten genutzt wird und für die Versuche umgebaut wurde. Sie bestand aus vier Becken, B1, B2, B3 und B4 (Abb. 2). Ein Becken hatte die Außenmaße von 200 x 200 x 140 cm und ein Volumen von 2,7 m³.



Abb. 2: Fischbecken Versuchskreislauf Strande

Über den Beckenablauf gelangte das durch Fischfaeces und Futterreste verunreinigte Wasser aus den Becken in ein GFK-Sammelbecken mit integriertem Trommelfilter, wo es mechanisch über eine 40 µm-Gaze vorgereinigt wurde. Das Volumen des Beckens betrug 1,26 m³. Für eine weitere Vorreinigung wurde ein UV-C Gerät (Jumbo-Koi UV-C) im Zulauf der Biofilter, im bypass installiert. Mikroorganismen, Einzeller und Parasiten, die die Trommelfiltergaze passieren konnten, wurden in der zweiten Vorreinigungsstufe weitestgehend durch zwei 75 W UVC-Röhren abgetötet.

Das so zweifach vorgereinigte Wasser wurde über eine Pumpe in die Zuleitung der Biofilter T1-10 gepumpt. Die Einspeisung des Wassers in die 10 Biofilter erfolgte über jeweils einen Schlauch, der mit einem Kugelhahn versehen wurde, um die Zuflussmenge regeln zu können.

Nach der biologischen Wasseraufbereitung in den Biofiltern T1-T10 wurde das Wasser über ein Rohr in ein weiteres GFK-Sammelbecken geleitet. Eine zweite Pumpe förderte das aufgereinigte Wasser aus der Vorlage in einen Sauerstoffanreicherungszyylinder (V= 0,71 m³). In dem Zylinder wurde das durchströmende Wasser mit technischem Sauerstoff aus Flaschen angereichert. Anschließend wurde das Wasser über die Beckenzuleitung in die Becken B1, B2, B3 und B4 befördert. Um pH-Schwankungen im Kreislaufsystem vorzubeugen, wurde eine Kalkungsvorrichtung am Sammelbecken installiert. Die Vorrichtung bestand aus einem 30 l PVC-Kanister, der täglich morgens und abends mit einer Kalklösung aus ungelöschtem Kalk aufgefüllt wurde. Über einen Schlauch mit Einwegehahn tropfte die Lösung direkt in das Sammelbecken.

Zur konstanten Temperaturregelung wurde ein regelbarer Titantauchbadheizer (m) (der Firma NÜGA) in Becken B2 montiert. Die Wassertemperatur im gesamten Kreislauf wurde zwischen 24° und 26°C gehalten. Um Wasserverluste durch Verdunstung auszugleichen wurde ein konstanter Frischwasserzulauf von 7 l/min eingestellt. Das Gesamt-Wasser-Volumen der geschlossenen Meerwasserkreislaufanlage betrug 15 m³.

1.11.3 Aufbau und Design der Biofilter

Als Biofilter wurden handelsübliche 200 l Regentonnen aus Kunststoff verwendet (Abb. 3). Die Regentonnen wurden für den Einsatz im moving-bed Verfahren wie folgt umgerüstet:



Abb. 3: Biofiltertonnen - Versuchskreislauf Strande

Um einen möglichst ebenen Untergrund zu erhalten wurden die Biofilter auf Kunststoffsockel gestellt. Das zu reinigende Wasser wurde über einen regelbaren Wasserzulaufschlauch von oben mit einer Zulauftrate von 12 L/min in die einzelnen Biofilter eingeleitet, dies entspricht einem Wasseraustausch von 4-mal pro Stunde. Das Füllvolumen eines Biofilters betrug inklusive Biocarrier 160 l.

Das biologisch gereinigte Wasser wurde am Boden der Tonne über ein Wasserablaufrohr abgesaugt. Das Ablaufrohr wurde dafür im unteren Bereich auf einer Länge von 15 cm mit 3 cm langen und 0,5 cm breiten Ansaugschlitzern versehen. Die Position, Länge und Breite der Schlitz wurde so angepasst, dass die Biocarrier nicht über das Ablaufrohr entweichen konnten. Über Rohrleitungen wurde das Wasser in das Sammelbecken geleitet. Auf dem Boden des Biofilters wurde mittig ein Ausströmer-Stempel montiert, der an ein externes Seitenkanalgebläse angeschlossen wurde. Dies sorgte für eine gleichmäßige Durchmischung der BC, so dass sich der moving-bed Effekt einstellen konnte.

Durch die Umwälzung des Wassers wurden die Nitrifikanten gleichzeitig mit nährstoffreichem Wasser und Sauerstoff versorgt, außerdem wurde die Bildung von anaeroben Zonen verhindert. Die Belüftungsintensität konnte für jeden Biofilter individuell über einen Einwegehahn eingestellt werden. Während des gesamten Versuchszeitraums waren insgesamt 10 Biofilter aktiv, die T1-T10 genannt wurden. Die Biofilter wurden aus Konstruktions- und Platzgründen halbkreisförmig angeordnet (Abb. 4).

Firmenintern werden Biofilter der Firma ECOMARES so ausgelegt, dass der Anteil der BC 60 % des Gesamtvolumens des Biofilters ausmacht. Für die hier verwendeten Biofilter ergibt das bei 160 L Gesamtvolumen ein Biocarrier-Anteil von 96 L pro Biofilter.

Als Besatzfisch wurden der Barramundi (*Lates calcarifer*) ausgewählt. ECOMARES verfügte über einen Bestand an adulten Tieren. Die Tatsache, dass es sich bei dem Barramundi um einen Warmwasserfisch handelt, machte ihn für diese Versuche interessant. Seine Kinetik begünstigte einen hohen Nahrungsumsatz und förderte so die Belastung auf die Biofilter.



Abb. 4: Gesamtansicht der 10 Biofiltertonnen des Versuchskreislaufs Strande



Abb. 5: Barramundi als Besatz der Versuchskreislaufanlage Strande

Die Barramundis wurden aus dem bestehenden Kreislaufsystem abgefischt, nach Gewicht sortiert und auf die Becken B1, B2, B3 und B4 verteilt. Den Besatz zeigt die Tabelle 1:

	B1 Maxi	B2 Midi	B3 Mini	B4 Midi
Besatz [kg]	50	50	50	50
Stückzahl	41	63	98	70
Gewicht [kg]	1,2	0,8	0,5	0,7

Die Fütterung der Fische erfolgte mit Trockenfutter des Herstellers Dana Feed. Die verwendete Futtermischung DAN-EX 2055 beinhaltet 20 % Fett und 55 % Protein. Für die unterschiedlichen Größenklassen der Fische standen zwei verschiedene Pelletgrößen (9,0 mm und 11,0 mm) zur Verfügung. Um die Biofilter langsam an die Belastung anzupassen, wurde zu Beginn der Hauptversuchsphase nur eine tägliche Futtermenge von 0,3 kg pro Becken gefüttert. Diese Ration wurde dann innerhalb von 2 Wochen schrittweise auf 0,6 kg pro Becken gesteigert, um die Belastung auf die Biofilter zu erhöhen und somit das Wachstum der Nitrifikanten zu fördern. Die Futtermenge entspricht einer täglichen Futterrate von 1,2 % der Anfangsbiomasse.

1.12 Ziel der vorliegenden Untersuchungen

Ziel des beantragten Projektes ist es, die Nitrifikationsleistung in Biofiltern von Aquakulturanlagen zu verbessern. Zunächst wurden die relevanten Vertreter der Ammoniak- und Nitritoxidanten im Biofilm quantifiziert sowie mittels molekularbiologischer Methoden und Elektronenmikroskopie identifiziert, um Aussagen über die speziellen Ansprüche machen zu können. Ein neu entwickelter Kurzzeit-Aktivitätstest im Labormaßstab diene dazu, das Nitrifikationspotential in Abhängigkeit diverser Anlagenparameter zu erfassen. Hemmversuche mit verschiedenen Kunststoffmaterialien wurden eingesetzt, um toxische Einflüsse vermeiden zu können. Eine 24-Stunden Messung der löslichen Stickstoffverbindungen in der Anlage Büsum erfolgte zur Dokumentation der Anhäufung bzw. des Abbaus von Ammonium, Nitrit und Nitrat infolge der Fischfütterung bzw. der Fischexkretionen.

In einem praxisnahen Feldversuch in der Anlage Strande wurden darüber hinaus verschiedene Füllkörper auf ihre Eignung zur Besiedelung mit nitrifizierenden Bakterien verglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Laborversuche Universität Hamburg

2.1.1 Probenahmen

Datum	Untersuchung
31.10.2005	Elektronenmikroskopie, Anreicherungen
22.05.2006	Elektronenmikroskopie , MPN-Quantifizierung, Identifizierung, Anreicherungen, Aktivitätstest
16.06.2006	molekularbiologische Untersuchungen
02.08.2006	Aktivitätstest
08.09.2006	Aktivitätstest
28.09.2006	MPN-Quantifizierung, molekularbiologische Untersuchungen
06.10.2006	Aktivitätstest
19.10.2006	chemische Analysen in der Anlage Büsum
23.10.2006	Aktivitätstest
09.11.2006	Aktivitätstest
23.11.2006	Hemmversuche

Mit Ausnahme der Probe vom 23.10.2006, die aus der Garnelenfarm in Strande stammt, wurden alle anderen Proben an Füllkörpern aus dem Biofilter der Ecomares-Anlage in Büsum entnommen.

2.1.2 Methodik der Probenahme

Die Füllkörper wurden zu verschiedenen Zeitpunkten aus Biofilter 1 und 2 der Anlage entnommen und gekühlt nach Hamburg transportiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C im entsprechenden Wasser.

Die Probenahmekampagne für die Quantifizierung der löslichen Stickstoffverbindungen in der Betriebsanlage Ecomares Büsum begann am 19.10.2006 um 15.30 Uhr und wurde über 24 Stunden fortgesetzt. Die Wasserproben wurden mit Hilfe eines Probenahmebechers entnommen, wobei der Becher mindestens 2mal ausgespült wurde. Es erfolgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 13.000 rpm. Vom klaren Überstand wurden 250 µL in HPLC-Glasvials überführt, die sofort bei -18°C eingefroren wurden.

Analytik

Für die Ammoniumbestimmung wurden 25 µL Probe mit 475 µL Derivatisierungsreagenz versetzt und gleichzeitig mit entsprechenden Eichstandards mittels einer HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie, High Pressure Liquid -Chromatography)-Anlage auf Ammonium gemessen. Die im Erst-Vial verbliebenen 225 µL Probe wurden mit 900 µL 18,2 MΩ Millipore-Wasser verdünnt und mittels HPLC auf Nitrit und Nitrat gemessen.

Ammoniumbestimmung

Die Bestimmung des Ammoniumgehaltes erfolgte mittels HPLC nach der Methode von Corbin (1984). Die Auftrennung erfolgte auf einer C18-Umkehr-Phasen-Säule. Die

Ammoniumionen der Probe reagieren mit dem o-Phthaldialdehyd und dem Mercaptoethanol zu einem fluoreszierenden N-substituierten 1-(2-Hydroxyethyl)-Thioisindol Heterocyclus. Im Fluorimeter wird dieses Derivat bei einer Wellenlänge von 420 nm angeregt und die Emission bei 470 nm gemessen. Die Emissionsintensität ist proportional zur Konzentration des fluoreszierenden Derivates und wird computergestützt zeitabhängig als Peak aufgezeichnet. Die Peakfläche ist proportional zur Ammoniumkonzentration der Probe.

Nitrit- und Nitratbestimmung

Die Bestimmung der Nitrit- und Nitratkonzentrationen der Proben erfolgte durch HPLC nach Meincke et al. (1992). Der Trennung der stark polaren Substanzen liegt das Prinzip der Ionenpaarchromatographie an einer Umkehr-Phase zugrunde. Als Gegenion wurde der mobilen Phase Tetrabutylammonium zugesetzt. Die aufgetrennten Substanzen wurden mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 225 nm über die Absorptionsänderung detektiert. Die Auswertung der Peaks erfolgt computergestützt durch die Integration der Peakflächen, die den Konzentrationen der Komponenten proportional sind.

2.1.3 Nährmedien

Marines Nitritoxidenten-Medium

Stammlösung 10x	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,050 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,000 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,010 g
	KH ₂ PO ₄	0,017 g
	Seewasser	700 mL
	Aqua dest	300 mL

NOB Medium (marin 0,3 mM)

	NaNO ₂	0,020 g
	Stammlösung 10x	100 mL
	Spurenelemente marin	1 mL (nach Watson et al., 1986)
	Seewasser	630 mL
	Aqua dest	270 mL

Der pH-Wert wurde mit HCl auf 6.5 - 7.0 eingestellt. Nach dem Autoklavieren sollte er bei 7.4 - 7.6 liegen.

Marines Ammoniakoxidenten-Medium (2 mM)

	NH ₄ Cl	0,107 g
	KH ₂ PO ₄	0,054 g
	FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,001 g
	Spurenelemente marin	1 mL (nach Watson et al., 1986)
	CaCO ₃	5,000 g
	alternativ CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,147 g
	Seewasser	700 mL
	Aqua dest	300 mL

2.1.4 Anreicherung von nitrifizierenden Bakterien

Die Anzucht der Nitritoxidanten erfolgte wahlweise mit 0,3 oder 3 mM Natriumnitrit in 300 ml Erlenmeyerkolben. Die Inkubation fand bei 17°C bzw. 22°C stehend im Dunkeln statt. Nur die Versuchsansätze zur Anheftung wurden gerührt. Das Wachstum wurde regelmäßig mit Hilfe eines Tüpfeltests überprüft (Schmidt und Belser, 1982). Durch die Zugabe von Nitritlösung wurde die Ausgangskonzentration wieder eingestellt, um die Zelldichte zu erhöhen. Nach mehrmaligem Füttern der Kulturen wurden diese auf frisches Medium überimpft.

Die Ammoniakoxidanten wurden mit 2 bzw. 10 mM Substrat mit CaCO₃ als Puffer kultiviert. Sollten die Zellen für weitere Versuche geerntet werden, wurde statt dessen CaCl₂ und Kresolrot als Indikator benutzt und der pH-Wert regelmäßig nachgestellt. Dieses Verfahren wurde auch für die Besiedlungsversuche eingesetzt. Wahlweise erfolgte die Kultivierung in terrestrischem Ammoniak- bzw. Nitritoxidanten-Medium (Lebedeva et al., 2005).

Zellzahlbestimmung mittels MPN

Die MPN-Methode (most probable number) ist ein statistisches Annäherungsverfahren zur Lebendzellzahlbestimmung von Mikroorganismen. Mit Hilfe der Methode wird ermittelt, bis zu welcher Verdünnungsstufe Teströhrchen bewachsen sind. Aus Tabellen lässt sich daraus die wahrscheinlichste Zellzahl berechnen (Alexander, 1982).

Zur Lebendzellzahlbestimmung wurden 5 Füllkörper in einem sterilen Greiner-Röhrchen mit 15 mL steriler 2 %-iger NaCl-Lösung vermischt. Anschließend wurden die Proben über Nacht bei 17°C geschüttelt. Bei der 2. Quantifizierung wurden dem Ansatz 5 g sterile Glaskugeln zum Ablösen der Zellen zugesetzt. Danach wurde eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻⁵ angefertigt und jeweils 0,1 mL in Reagenzröhrchen mit 5 mL Medium in 3 Parallelen überführt. Für Ammoniakoxidanten wurde 5 mM als Substrat verwendet, für Nitritoxidanten 0,3 mM. Das Wachstum wurde über die Bildung bzw. den Verbrauch von Nitrit nachgewiesen.

Aktivitätstest

Als Ansatz dienten 300 ml Erlenmeyerkolben im Batch-Verfahren. Falls nicht anders angegeben, wurden die Versuche mit 10 bewachsenen Füllkörpern in 50 ml Medium mit 1 mM Substrat angesetzt. Die Kolben wurden bei 17°C inkubiert und bei 170 rpm geschüttelt. In der Regel erfolgte die Messung von Nitrit und Nitrat über einen Zeitraum von 3 Stunden. Es wurden nur Füllkörper des Typs F2 untersucht, da diese zur Zeit in den Anlagen in Büsum und Strande im Biofilter eingesetzt werden.

Hemmversuche

Vor Einsatz der fabrikneuen Kunststoffgranulate wurden diese für mindestens 5 Tage in destilliertem Wasser gespült. Pro Kolben wurden 40 g auf 100 mL bzw. 58 g auf 150 mL eingewogen. Die Beimpfung mit Nitrifikanten erfolgte mit Zellen, die zuvor durch Schütteln mit Glaskugeln (Durchmesser 1 mm) aus dem Biofilm herausgelöst worden waren. Dem Ansatz wurden pro Füllkörper 1 ml 2%ige NaCl-Lösung zugesetzt und für 2 Stunden im Liegen geschüttelt. Jeder Versuchsansatz wurde mit 5 mL dieser Suspension beimpft und bei 17°C über mehrere Wochen inkubiert. Mehrmals pro Woche erfolgte eine Probeentnahme für die Bestimmung der löslichen Stickstoffverbindungen.

Transmissions-Elektronenmikroskopie

Um Zellen elektronenmikroskopisch untersuchen zu können, müssen diese zunächst fixiert und in Kunstharz eingebettet werden. Die Füllkörper wurden zunächst mit 2,5 % Glutaraldehyd 2 Stunden auf Eis fixiert. Es folgte eine Kontrastierung mit 1 % Osmiumtetroxid über Nacht. In Anlehnung an Watson et al. (1986) wurden die Proben stufenweise entwässert und in Spurr eingebettet.

Nach der Polymerisation wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Es wurde mit Uranylacetat und Bleicitrat nachkontrastiert (Watson et al., 1986) und die Zellen wurden mit Hilfe eines Transmissions-Elektronenmikroskops (Model Leo 906E) untersucht.

Western-Blot

Biofilmmzellen sowie Zellen von Referenzorganismen wurden mittels Zentrifugation aufkonzentriert und durch eine Ultraschallbehandlung aufgeschlossen. Es folgte eine gelelektrophoretische Auftrennung der Zellproteine (Bartosch et al., 1999) und anschließende Inkubation mit monoklonalen Antikörpern Hyb 153-3 gegen das Schlüsselenzym der Nitritoxidanten (Aamand et al., 1996).

Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH)

Zunächst mußten die Zellen durch eine Fixierung mit 3 % Formaldehyd (1 h auf Eis) für die Gensonden permeabilisiert werden (Spieck et al., 2006). Die Methodik der FISH Markierung und Visualisierung am Fluoreszenzmikroskop ist im Detail bei Bartosch et al. (1999) beschrieben. Bei jedem Experiment wurde zum Vergleich eine unspezifische Anfärbung der Zellen mit DAPI vorgenommen.

Molekularbiologische Methoden

Die genomische DNA aus den Biofilmmzellen wurde mit Hilfe des DNA Isolierungskits „Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit“ der Firma MoBio Laboratories Inc. extrahiert (Lebedeva et al., 2005). Danach wurde die DNA mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR) in einem Biometra Tpersonal Minicycler mit verschiedenen Primern vervielfältigt (Alawi, 2003). Die 16S rDNA-Fragmente wurden anschließend durch die Firma DNA-Cloning Service sequenziert. Die erhaltene Sequenz wurde in der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) eingegeben und unter Verwendung des Programms BLAST mit allen in den Datenbanken vorhandenen prokaryotischen DNA-Sequenzen verglichen. Dieses Programm sucht dabei nach den Regionen mit Ähnlichkeit zwischen den Sequenzen und berechnet die Signifikanz der Übereinstimmungen. Die Berechnung der Stammbäume erfolgte über die „neighbour joining“-Methode.

2.2 Vergleich Füllkörper/Biocarrier - Strände

Im Zeitraum von September 2006 bis März 2007 wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Frau Stefanie Beth Versuche zum Vergleich der Abbaukapazität verschiedener handelsüblicher Biocarrier (BC) durchgeführt. Dazu wurde eine Testanlage der ECOMARES MariFarm in Strände bei Kiel mit 10 Biofiltern erweitert und so modifiziert, dass Belastungstests mit einzelnen Filtern möglich waren.

Der Versuchszeitraum gliedert sich in drei Phasen:

Phase 1: Aufbau der Versuchsanlage (4 Wochen),

Phase 2: Startphase der Biofilter ohne Fischbesatz (5 Wochen),

Phase 3: Hauptversuchsphase mit Fischbesatz (10 Wochen).

Die Auswahl der verwendeten BC erfolgte nach bestimmten Kriterien. Alle BC mussten seewasserbeständig und aus Kunststoff gefertigt sein. Die spezifische Oberfläche der einzelnen Fabrikate sollte annähernd gleich groß sein und die BC mussten so konzipiert sein, dass sie im moving-bed Verfahren eingesetzt werden konnten. Mit diesen Einschränkungen wurden fünf BC für die Durchführung der Versuche ausgewählt (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ausgewählte BC

Nr.	Hersteller	Material	spez. Oberfläche [m ² /m ³]	Abbauraten [TAN/m ² /d]	Größe [mm]
E1	Stöhr HX09KL W	HDPE	836	0,59 g	9 x 7
E2	Curler Advanced X-1	PP	800	0,59 g	12 x 9
E3	Stöhr HX09KL S	HDPE recycled	836	0,59 g	9 x 7
E4	Stöhr HXF12KLL	HDPE recycled	859	0,59 g	12 x 12
E5	Kaldnes K3	HDPE	600	0,59 g	25 x 12

Vor dem Einsatz in die Biofilter wurde jeder BC über zwei Wochen mehrfach täglich in Süßwasser gespült und eingeweicht, um evtl. vorhandenen, herstellungsbedingten Kunststoffabrieb und mögliche Oberflächenbeschichtungen zu entfernen. Es wurde ausschließlich mit Süßwasser gespült, um eine vorzeitige Besiedelung der BC mit marinen Nitrifikanten zu vermeiden.



Abb. 6: Verwendete Biocarrier für Vergleichstests. Von links nach rechts die ausgewählten BC Nr. E1-E5.

Jeder BC wurde in einem eigenen Biofilter untersucht, somit richtete sich die Anzahl der Biofilter nach der Anzahl der zu untersuchenden BC. Für eine exaktere Auswertung der Versuchsdaten wurde parallel eine zweite, identische Kontrollreihe installiert. Die Anordnung der BC in den Biofiltern erfolgte in zufälliger Reihenfolge (Tabelle 3).

Tabelle 3: Anordnung der BC in den Biofiltern

	T 1	T 2	T 3	T 4	T 5	T 6	T 7	T 8	T 9	T 10
Stöhr HX09KL W	X					X				
Curler Advanced X-1		X					X			
Stöhr HX09KL S			X					X		
Stöhr HXF12KLL				X					X	
Kaldnes K3					X					X

Um die Biofilter anzupflanzen wurden BC verwendet, die bereits von Nitrifikanten besiedelt waren. Sie wurden dem Biofilter entnommen, der das System versorgte, in dem der Fischbesatz vor Versuchsbeginn gehalten wurde. Diese BC dienten als Animpfmaterial für die einzelnen Biofilter T1-T10, da sie zum einen optisch erkennbar gut besiedelt waren und zum anderen waren die Nitrifikanten dieses Systems bereits an den Besatzfisch angepasst. Zum Beimpfen wurden die besiedelten Füllkörper in verschließbare Wäschenetze gefüllt. Diese wurden zeitgleich in die Biofilter gegeben. Gleichzeitig wurde Ammoniumchlorid so zudosiert, dass in allen Biofiltergefäßen eine mittlere Konzentration von 1 mg NH₄-N/L (55 µM) gehalten wurde. Nach zwei Wochen wurden die Wäschenetze aus den Biofiltern entfernt.

2.2.1 Pilotversuche zur Erstbesiedlung von Biocarriern – Anlage Strände

In der Hauptversuchsphase sollte die Abbauleistung der Nitrifikanten mittels eines Aktivitätstests untersucht werden. Der Aktivitätstest bestand darin, dass die Biofilter vom System abgekoppelt wurden und jedem Biofilter eine definierte Menge NH₄Cl zudosiert wurde. Nach bestimmten Zeitabständen wurden dann die Restmengen an NH₃-N und NO₂-N, wie unter 3.10 beschrieben, gemessen.

Es wurden vier Versuche über einen Zeitraum von 5 Wochen durchgeführt. Pro Versuch konnte nur eine begrenzte Anzahl von Biofiltern vom System abgeschottet werden, da die Wasseraufbereitung des durch Fischfaeces und Futterreste verunreinigten Wassers aus dem System gewährleistet bleiben musste. Für jeden Versuch wurden daher zwei Tage veranschlagt. Pro Tag wurden 5 Biofilter vom System abgeschottet, so dass kein Wasser mehr zu- und abfließen konnte. Die anderen 5 Biofilter blieben weiterhin am Kreislaufsystem angeschlossen. Die Auswahl der Biofilter erfolgte im ersten Versuch in zufälliger Reihenfolge. Diese Reihenfolge wurde bei allen folgenden Versuchen beibehalten (siehe Tabelle 4).

Tabelle 4: Versuchsdurchführung

	NH ₄ Cl [g]	NH ₄ Cl [mg/L]	Biofilter Tag 1	Biofilter Tag 2
Versuch 1	5	31,25	T1, T2, T3, T9, T10	T4, T5, T6, T7, T8
Versuch 2	10	62,5	T1, T2, T3, T9, T10	T4, T5, T6, T7, T8
Versuch 3	20	125	T1, T2, T3, T9, T10	T4, T5, T6, T7, T8
Versuch 4	40	250	T1, T2, T3, T9, T10	T4, T5, T6, T7, T8

Um die Ammonium- und Nitritwerte des Gesamtsystems während der Hauptversuchsphase zu kontrollieren, wurden zusätzlich zu den Versuchen täglich an zwei Stellen im System Proben entnommen und gemessen. Die Probennahme erfolgte immer direkt am Beckenablauf und am Ablaufrohr aus den Biofiltern.

Zu Beginn wurden aus jedem Biofilter Proben entnommen, um die enthaltene Grundlast an $\text{NH}_3\text{-N}$ und $\text{NO}_2\text{-N}$ zu ermitteln. Jedem Biofilter wurde dann die entsprechende NH_4Cl -Lösung zudosiert. Nach 2, 4 und 6 Stunden wurden aus den Biofiltern Proben entnommen, um die Restmengen an $\text{NH}_3\text{-N}$ und $\text{NO}_2\text{-N}$ zu bestimmen und so die Abbauleistung der BC zu vergleichen. Bei jeder Probennahme wurden zusätzlich, für jeden getesteten Biofilter, die Werte für O_2 -Sättigung, Temperatur, Redoxpotential und pH gemessen. Nach der letzten Messung, also nach 6 Stunden, wurden die getesteten BF wieder an das Gesamtsystem angeschlossen, indem der BF-Zulauf auf eine Durchflussrate von 12 L/min eingestellt wurde.

Die Proben für die Startphase und für die Hauptversuche wurden stets mit einem 100 mL Erlenmeyerkolben aus den Biofiltern entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass keine BC in das Probengefäß gelangten. Vor der eigentlichen Messung wurden die Proben über Einwegfilter filtriert, um Bakterienflocken zu entfernen. Der zeitliche Abstand zwischen Probennahme und Messungen im Labor betrug maximal 10 Minuten. Die photometrischen Messungen erfolgten mit dem einem Photometer (Hach-Lange DR 2500,). Alle Messungen wurden nach den von Hach-Lange entwickelten Methoden durchgeführt (Tabelle 5).

Tabelle 5: Angewandte Messungen mit dem Hach-Lange-Photometer DR 2500

Messung	$\text{NH}_3\text{-N}$	$\text{NH}_3\text{-N}$	$\text{NO}_2\text{-N}$
Nachweisgrenze	0,01-0,50 mg/L	0,4-50,0 mg/L	0,002-0,300 mg/L
Methode	8155	10031	8507
Programm	385	343	371
Nachweisgrenze	0,6-30 μM	23-2940 μM	0,04-6,50 μM

2.3 Inhaltsstoffe der zur Verfügung gestellten Granulate

1. Granulat G1 - HX09KL/BS501-17, PE-Rohware

G1 enthält Antioxidantien und ist laut Hersteller für aggressive Haushaltschemikalien und Detergentien empfohlen. Es sind folgende Inhaltsstoffe oberhalb der Nachweisgrenze enthalten:

Extrahierbare Metalle	[$\mu\text{g}/\text{kg}$]
Aluminium	40
Chrom	7
Zink	4
Zirkonium	8

Antioxidantien	% w/w
Di-octadecyl disulphid	<0,3% (TLC)
Di-octadecyl 3,3'-thio-di-propionat	<0,3% (TLC)
Octadecyl 3-(3,5-di-tert-butyl-4-hydroxyphenyl) propionat (Irganox 1076)	0,02% (HPLC)

2. Granulat G2 - HX09KL/BS501-17, PE recycelt, schwarz

G2 enthält theoretisch die gleichen Inhaltsstoffe wie G1, diese können aber durch den vorherigen Gebrauch und das Recyclingverfahren migriert oder evaporiert sein. Zusätzlich enthält recycelte Ware Ruß.

3. Granulat G3 - HXF12KLL/7700M, mit Trinkwasserempfehlung

Laut Herstellerangaben enthält das Produkt nicht spezifizierte Antioxidantien und Gleitmittel. Letztere verhindern die Haftung an den Extrusionsanlagen. Überwiegend werden als Gleitmittel primäre Amide von Fettsäuren eingesetzt (Stearamid, Oleamid, Erucamid). Diese Stoffe wandern nach Zugabe und vor der Extrusion an die Oberfläche des PE und sind wahrscheinlich für die hydrophobe Oberflächenbeschaffenheit der Rohware verantwortlich. Zudem könnten sie direkt nach Benetzung/Einsatz als C-Quelle für heterotrophe Bakterien dienen.

Bezeichnung der Füllkörper (F) und Granulate (G)

Nr. Versuche Univ. HH	Nr. Versuche Strande	Kodierung	Material	Warenqualität	Farbe
G1	E1	HX09KL/BS501-17	HDPE	Rohware	weiss
F1	E1	HX09KL/BS501-17	HDPE	Rohware	weiss
G2	E3	HX09KL/BS501-17	HDPE	Recycelte Ware	schwarz
F2	E3	HX09KL/BS501-17	HDPE	Recycelte Ware	schwarz
G3	E4	HXF12KLL/7700M	HDPE	Rohware, Trinkwasserzul.	weiss
-	E4	HXF12KLL/7700M	HDPE	Recycelte Ware	schwarz
-	E2	CA X-1	PP	Rohware	weiss
-	E5	K3	HDPE	Rohware	weiss

3 Mikrobiologisch-chemische Labor-Arbeiten an Füllkörpern und Biofiltern

3.1 Visualisierung des mikrobiologischen Bewuchses

Rein optisch konnte im Oktober 2005 unter dem Binokular auf den Füllkörpern kein Biofilm beobachtet werden. Dagegen waren die Füllkörper der Probenahme vom 22.05.2006 im Innern fast zugewachsen (Abb. 7).

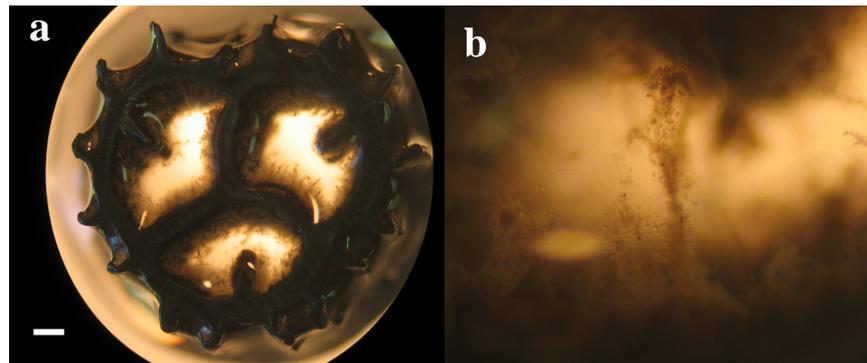


Abb. 7: Nitrifizierender Biofilm auf den Füllkörpern der Firma Stöhr aus schwarzem recyceltem HDPE (F2). a) Übersicht, Balken = 1 mm, b) Ausschnitt.

3.2 Quantifizierungen

Um einen Überblick über die Besiedlungsdichte der nitrifizierenden Bakterien auf den Füllkörpern zu bekommen, wurden die Zellzahlen mit Hilfe der MPN- (most probable number) Technik bestimmt. Die Inkubation erfolgte in Anlehnung an die vor-Ort Bedingungen bei 17°C. Klassischerweise werden Verdünnungsreihen in selektiven Medien nach 6 Wochen ausgewertet, sofern sie bei 28°C bebrütet werden. Wie eigene Untersuchungen an Nitrifikanten aus kalten Lebensräumen jedoch gezeigt haben, dauert es bei niedrigen Temperaturen länger, bis alle Zellen angewachsen sind. Aus diesem Grund wurde die Auswertung zu verschiedenen Zeitpunkten wiederholt.

3.2.1 Probenahme: 22.5.06

In diesem ersten Ansatz erfolgte die Ablösung der Mikrokolonien durch Schütteln (über Nacht). Die Bestimmung der höchst wahrscheinlichen Zellzahl wurde in zwei parallelen Ansätzen durchgeführt. Die Inkubation erfolgte bei 17°C und die Auswertung wurde nach 6 Wochen durchgeführt.

Ammoniakoxidanten	Modul 1	$1,5 \times 10^5$ / Füllkörper
	Modul 2	$7,4 \times 10^3$ / Füllkörper
Nitritoxidanten	Modul 1	$1,3 \times 10^2$ / Füllkörper
	Modul 2	$1,3 \times 10^2$ / Füllkörper

Die Zahlen zeigen, dass durch das Schütteln deutlich mehr Ammoniak- als Nitritoxidanten abgelöst worden sind. Ein weiterer Grund für die Unterschiede ist, dass die jeweiligen Mikrokolonien unterschiedlich viele Zellen enthalten. Der Unterschied beträgt 1 – 3 Zehnerpotenzen. Weiterhin ließen sich zu diesem Zeitpunkt in Modul 1 100mal mehr Ammoniakoxidanten als in Modul 2 nachweisen.

3.2.2 Quantifizierung am 28.9.06

In diesem Versuch erfolgte die Ablösung der nitrifizierenden Mikrokolonien durch Schütteln mit Glasperlen (über Nacht). Die Auswertung nach 10 Wochen Inkubation bei 17°C ergab Folgendes (Mittelwerte aus je 5 Ansätzen):

Ammoniakoxidanten	Modul 1	$8,6 \times 10^4$ / Füllkörper
	Modul 2	$6,8 \times 10^4$ / Füllkörper
Nitritoxidanten	Modul 1	$4,7 \times 10^3$ / Füllkörper
	Modul 2	$4,0 \times 10^3$ / Füllkörper

Nach 4 Wochen wurde die Auswertung wiederholt. Es zeigte sich, dass die Zellzahlen weiter zugenommen hatten.

Ammoniakoxidanten	Modul 1	$8,0 \times 10^5$ / Füllkörper
	Modul 2	$3,7 \times 10^5$ / Füllkörper
Nitritoxidanten	Modul 1	$2,6 \times 10^5$ / Füllkörper
	Modul 2	$4,1 \times 10^5$ / Füllkörper

Es handelte sich erneut um Mittelwerte aus 5 Parallelen. Die Schwankungsbreite betrug maximal 1 Zehnerpotenz. Die Ergebnisse zeigen, dass sich sehr viele Ammoniak- bzw. Nitritoxidanten ($2,6 - 8,0 \times 10^5$ Zellen) auf einem einzelnen Füllkörper angeheftet haben.

Bei dieser letzten Quantifizierung wird deutlich, dass etwa gleich viel Ammoniak- und Nitritoxidanten auf den Füllkörpern vorkommen. Der Vergleich mit der vorherigen Auswertung lässt schließen, dass die Nitritoxidanten langsamer wachsen als die Ammoniakoxidanten und daher eine längere Inkubation sinnvoll ist. Während die erste Zellzahlbestimmung im Mai 2006 wesentlich höhere Zellzahlen im Modul 1 als in Modul 2 ergab, kamen im September 2006 in beiden Modulen vergleichbar viele Ammoniak- und Nitritoxidanten vor. Dies könnte in der unterschiedlichen Besatzdichte der beiden Module begründet sein, da Modul 2 erst Ende Oktober wieder vollgefüllt worden ist.

3.3 Kultivierung der nitrifizierenden Bakterien

Die ersten Anreicherungskulturen von Nitrifikanten in selektiven Medien wurden im Oktober 2005 angelegt. Es zeigte sich sowohl Wachstum in Ansätzen mit terrestrischem als auch marinem Medium. Benutzt wurden Medien mit niedrigen (2 mM Ammonium bzw. 0,3 mM Nitrit), aber auch höheren Substratkonzentrationen (10 mM Ammonium bzw. 3 mM Nitrit). In Hinblick auf eine Isolierung der dominierenden Ammoniak- und Nitritoxidanten wurden Verdünnungsreihen angelegt, um die heterotrophen Begleitorganismen herauszuverdünnen. Diese waren bis zu einer Verdünnungsstufe von 10^{-4} bewachsen, so dass eine Isolierung nach mehrmaliger Wiederholung möglich erscheint. In der MPN-Quantifizierung der Proben vom 28.9.2006 waren sogar einzelne Verdünnungsröhrchen der Stufe 10^{-5} bewachsen.

3.4 Identifizierung der dominierenden Nitrifikanten

3.4.1 Elektronenmikroskopie

Die „rein optisch“ nicht bewachsenen Füllkörper vom Oktober 2005 wurden in Kunstharz eingebettet, um Ultradünnschnitte für die Elektronenmikroskopie herzustellen. Wie eingangs erwähnt, ist es möglich, die verschiedenen Gattungen von Nitrifikanten anhand der Zell-Ultrastruktur zu identifizieren. Darüber hinaus können Aussagen über die Architektur des nitrifizierenden Biofilms gemacht werden.

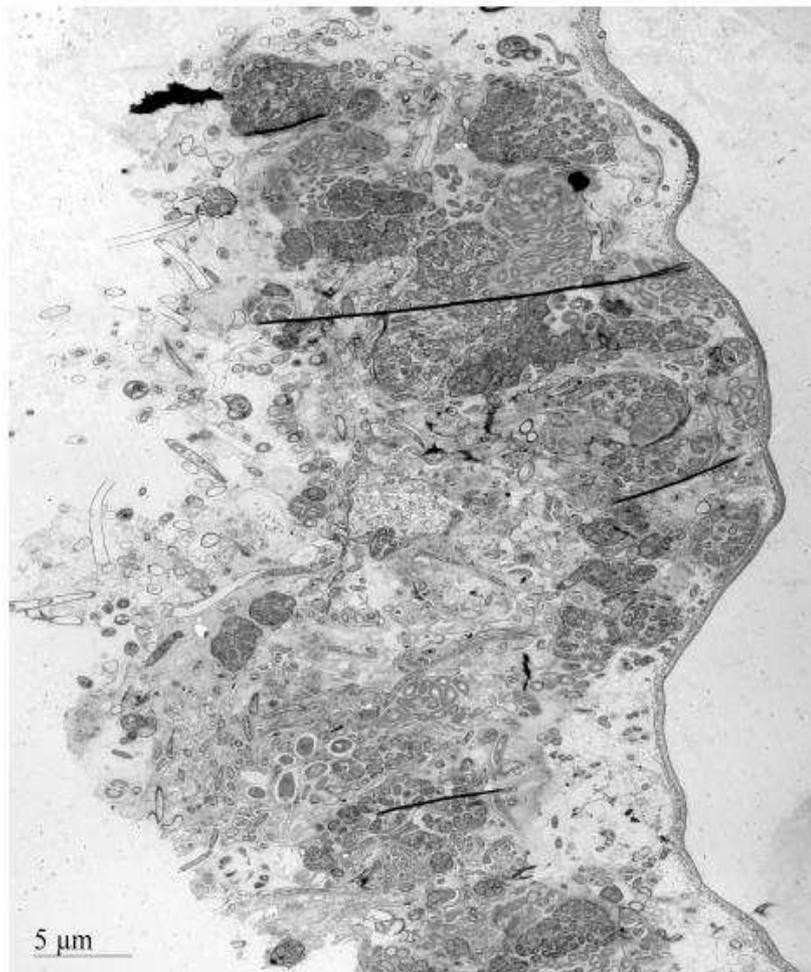


Abb. 8: Ultradünnschnitt eines nitrifizierenden Biofilms auf dem Trägermaterial aus HDPE. Die Nitrifikanten bilden dunkle Zellpakete.

Abbildung 8 zeigt einen Überblick über den am Trägermaterial sitzenden Biofilm. Die Dicke des Biofilms beträgt ca. 30 μm . Deutlich erkennbar sind Mikrokolonien von Ammoniak- und Nitritoxidanten, bei denen die dicht gepackten Zellen in gemeinsame Schleimkapseln eingebettet sind. Sie machen einen Großteil der vorhandenen Mikroorganismen aus. Dagegen liegen die heterotrophen Begleitorganismen als Einzelzellen vor. Hier handelt es sich um stäbchenförmige bzw. coccoide Zellen.

Bei den Nitritoxidanten wurde eindeutig *Nitrospira* als dominierende Gattung erkannt (Abb. 9). Diese Mikrokolonien bilden einen sehr großen Anteil der angehefteten Zellen. Sie sind charakterisiert durch die pleomorphe bis spiralförmige Zellgestalt, wodurch sie im Ultradünnschnitt gebogen erscheinen. Die Organismen enthalten keine intracytoplasmatischen Membranen, aber einen ungewöhnlich großen periplasmatischen Raum (Abb. 9 und 10). Ein weiteres Merkmal ist die typische Anordnung von unregelmäßigen Zellen in runden Kolonien, so wie sie auch für Belebtschlamm typisch sind (Spieck et al., 2006).

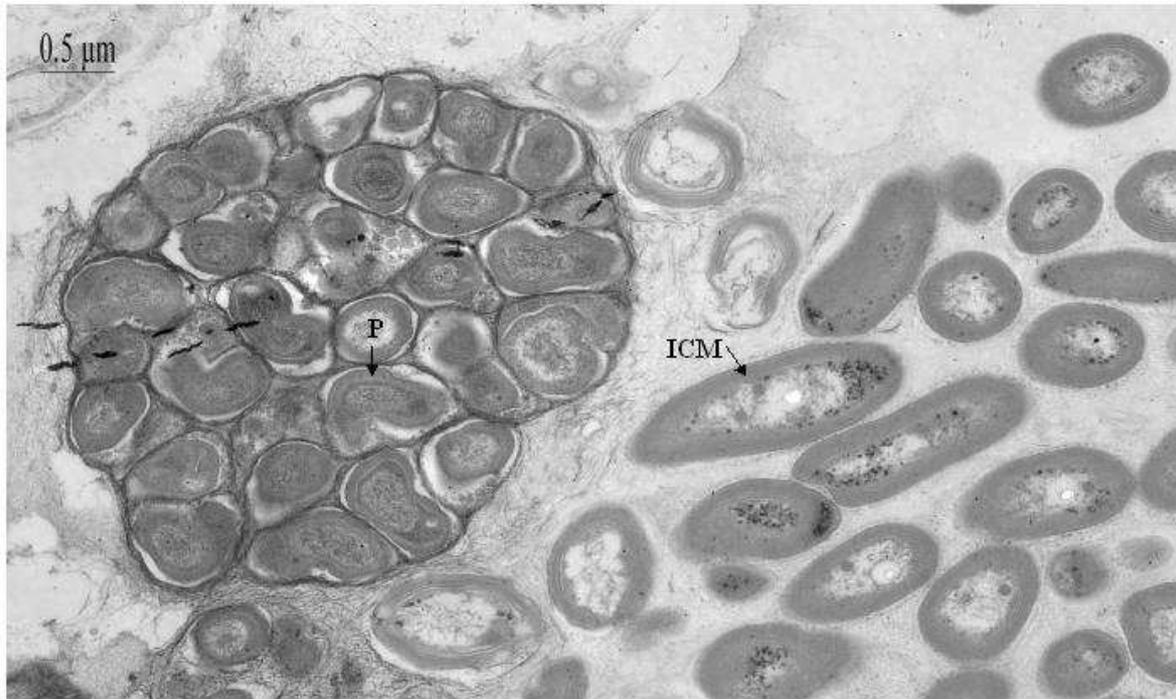


Abb. 9: Detailaufnahme einer Kolonie von Nitrit oxidierenden Bakterien der Gattung *Nitrospira* (links im Bild) in enger Nachbarschaft zu locker assoziierten Zellen von *Nitrosomonas* (rechts im Bild). P = Periplasma, ICM = intracytoplasmatische Membranen.

Die vorherrschenden Ammoniakoxidanten bilden Kurzstäbchen aus, die intracytoplasmatische Membranen in der Zellperipherie besitzen. Diese Merkmale sind typisch für Vertreter der Gattung *Nitrosomonas* (Abb. 9). Dicht daneben finden sich kugelige Zellpakete von *Nitrospira*, deren nZellen deutlich kleiner sind. Das Periplasma hebt sich durch den einheitlichen Grauton von dem stärker granulierten Cytoplasma im Innern der Zelle ab (Abb. 10). Während Abb. 10 eine relativ kleine Kolonie von *Nitrospira* zeigt, bei der ca. 30 Zellen in einer Ebene geschnitten wurden, wurden auch sehr große Aggregate dieser Organismen dokumentiert, die an ein Zellgewebe erinnern (Abb. 11).



Abb. 10: Ultradünnschnitt einer kleinen Mikrokolonie von *Nitrospira*.

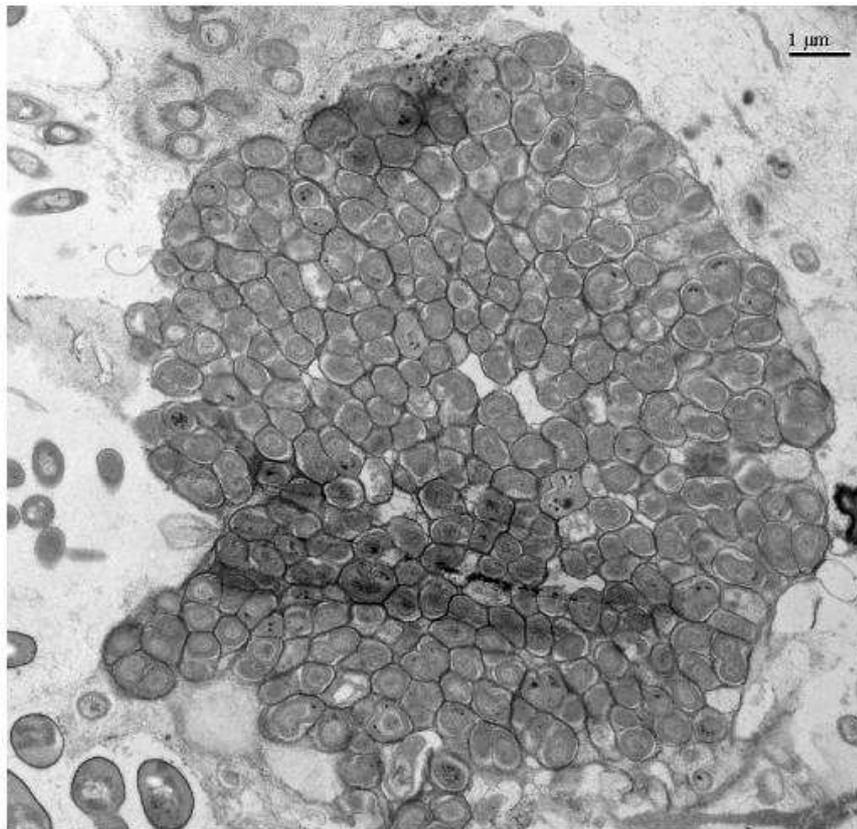


Abb. 11: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer großen Kolonie von *Nitrospira*.

In Abb. 12 sind zwei elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Nitrosomonas* nebeneinander gestellt. Unterschiede in der Dichte der umgebenden extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) lassen darauf schließen, dass es sich hier um verschiedene Arten von *Nitrosomonas* handelt. Mikrokolonien der einen Art sind hell (a), während die der anderen durch das Kontrastierungsmittel dunkel gefärbt worden sind (b).



Abb. 12: Ultradünnschnitte zweier Typen von Ammoniakoxidanten der Gattung *Nitrosomonas*. a) helle Mikrokolonien, b) dunkle Mikrokolonien.

Weiterhin konnten einzelne Kolonien von *Nitrosococcus* identifiziert werden, die ebenfalls zu den Ammoniakoxidanten gehören. Diese Gattung ist charakterisiert durch einen zentralen Stapel von intracytoplasmatischen Membranen (Abb. 13). Hier handelt es sich um runde bzw. ovale Zellen, deren Membranstapel in der Zelle seitlich oder zentral angeordnet ist. Oberhalb der Kolonie von *Nitrosococcus* befindet sich eine Mikrokolonie, die wahrscheinlich ebenfalls aus nitrifizierenden Bakterien besteht. Die Zellen enthalten keine intracytoplasmatischen Membranen. Sie ähneln Ammoniak oxidierenden Bakterien der Gattung *Nitrospira*. Links und rechts neben der Kolonie von *Nitrosococcus* konnten Aggregate von *Nitrospira* ausgemacht werden.

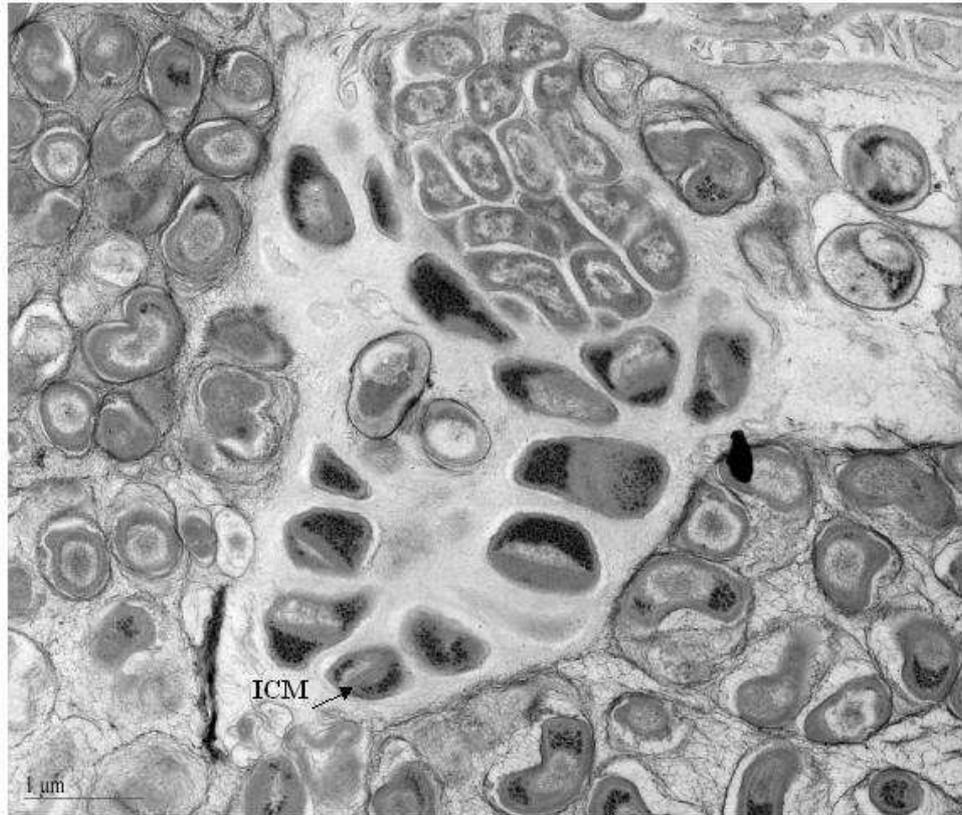


Abb. 13: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer Kolonie von *Nitrosococcus* (Bildmitte).

Die direkte Anheftung der Ammoniak- und Nitritoxidanten an das Trägermaterial lässt darauf schließen, dass es sich um Primärbesiedler handelt. Durch die enge Nachbarschaft zwischen den beiden Organismengruppen (Abb. 14), können die Nitritoxidanten leicht durch Nitrit - das Produkt der Ammoniakoxidanten – gefüttert werden.

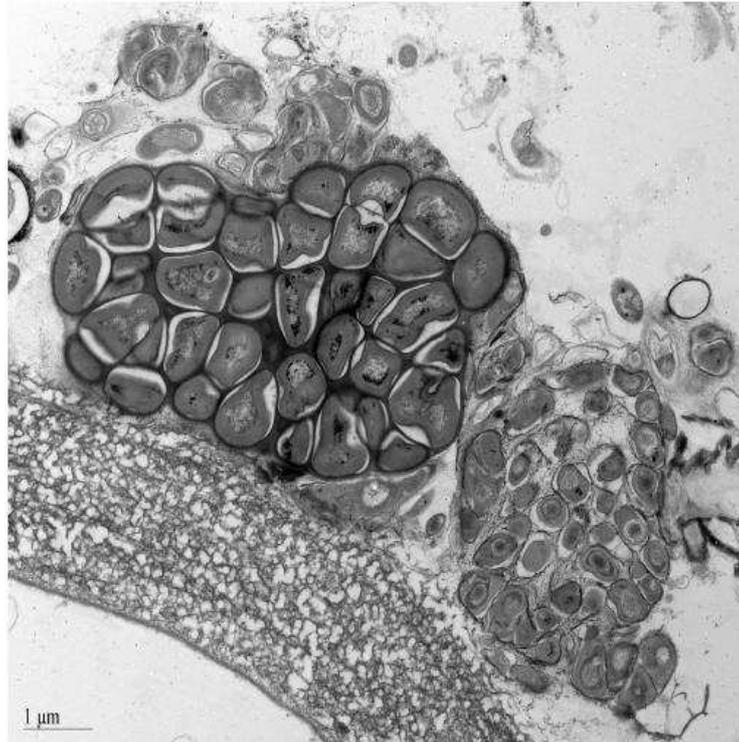


Abb. 14: Anheftung von Ammoniakoxidanten (links) der Gattung *Nitrosomonas* und Nitritoxidanten (rechts) der Gattung *Nitrospira* auf dem Trägermaterial.

Abbildung 15 stellt zwei verschiedene Vertreter von Nitritoxidanten gegenüber. Pleomorphe Kurzstäbchen von *Nitrobacter*, erkennbar an der polaren Membrankappe und der asymmetrischen Zellwand, wurden nur in Ausnahmefällen angetroffen (Abb. 15a). Sie scheinen im nitrifizierenden Biofilm der Ecomares-Anlage sehr selten zu sein. Ihre Ultrastruktur unterscheidet sich deutlich von der von *Nitrospira* (Abb. 15b).

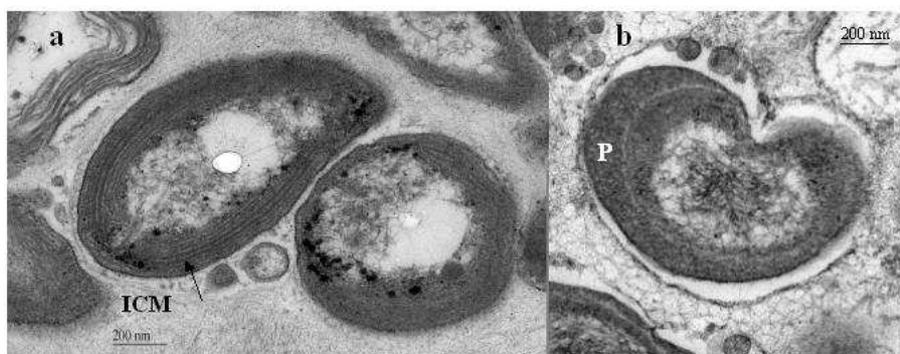


Abb. 15: Vergleich der Ultrastruktur von *Nitrobacter* (a) mit der von *Nitrospira* (b).
ICM = Intracytoplasmatische Membranen, P = Periplasma.

Eine grobe Quantifizierung der Biofilmzellen aus Modul 2 vom 30.10.05 ergab, dass die meisten Mikroorganismen als Nitritoxidanten der Gattung *Nitrospira* identifiziert werden konnten. Ihr Anteil machte ca. 60% aus. Ammoniak oxidierende Bakterien der Gattung *Nitrosomonas* waren ebenfalls sehr häufig. Typ I (helle Mikrokolonien) kamen zu 20% und *Nitrosomonas* Typ II (dunkle Mikrokolonien) zu ca. 10% vor. Vertreter von *Nitrosococcus* waren mit ca. 6% weniger häufig. Heterotrophe Bakterien machten zu diesem Zeitpunkt der Untersuchung nur ca. 3% der Gesamtpopulation aus. Da die verschiedenen Zelltypen aber ungleichmäßig im Biofilm verteilt sind, konnten in Einzelfällen auch Bereiche dokumentiert werden, in denen bis zu 60 % heterotrophe Begleitorganismen auszumachen waren.

Eine weitere elektronenmikroskopische Aufnahme von Füllkörpern aus Modul 1 und 2 vom 22.5.06, ergab ein vergleichbares Bild. Es konnten die gleichen Vertreter an Ammoniak und Nitrit oxidierenden Bakterien identifiziert werden. Da es sich hier aber um einen sehr dicken Biofilm handelte, wurden insgesamt mehr heterotrophe Bakterien angetroffen. Interessant war die Tatsache, dass im Innern des Biofilms bereits eine Auflösung von Zellen eingesetzt hat, die auf einen Alterungsprozess schließen lässt. Es konnten viele leere Mikrokolonien, die wahrscheinlich von Nitrifikanten stammen, beobachtet werden. Weiterhin kam es zu dem bekannten Phänomen (Spieck et al., 2006), dass Zellen von *Nitrospira* sich aus dem Zellverband herausgelöst hatten, um als planktonische Zellen zu existieren (Abb. 16). Diese Zellen liegen als einzelne Stäbchen vor. Der Vorgang könnte dazu dienen, bessere Lebensbedingungen aufzusuchen. In Anreicherungskulturen aus Belebtschlamm wurde er beobachtet, wenn die Zelldichte bzw. die Konzentration des Stoffwechselproduktes Nitrat zu hoch wurde.

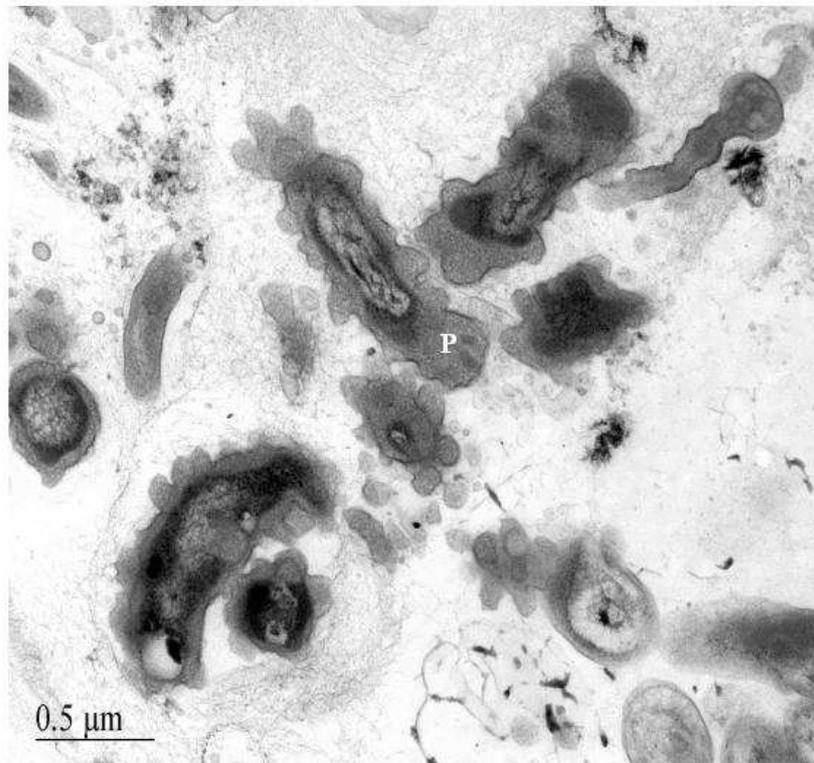


Abb. 16: Planktonische Zellen von *Nitrospira*, erkennbar am großen periplasmatischen Raum (P), im gealterten Biofilm eines Füllkörpers.

An anderen Stellen war der Biofilm bereits aufgelöst und es konnten nur noch wenige intakte Mikrokolonien von *Nitrospira* beobachtet werden (Abb. 17). Dies deutet darauf hin, dass dieser Nitritoxidant sehr widerstandsfähig ist und auch ungünstige Perioden überdauern kann.

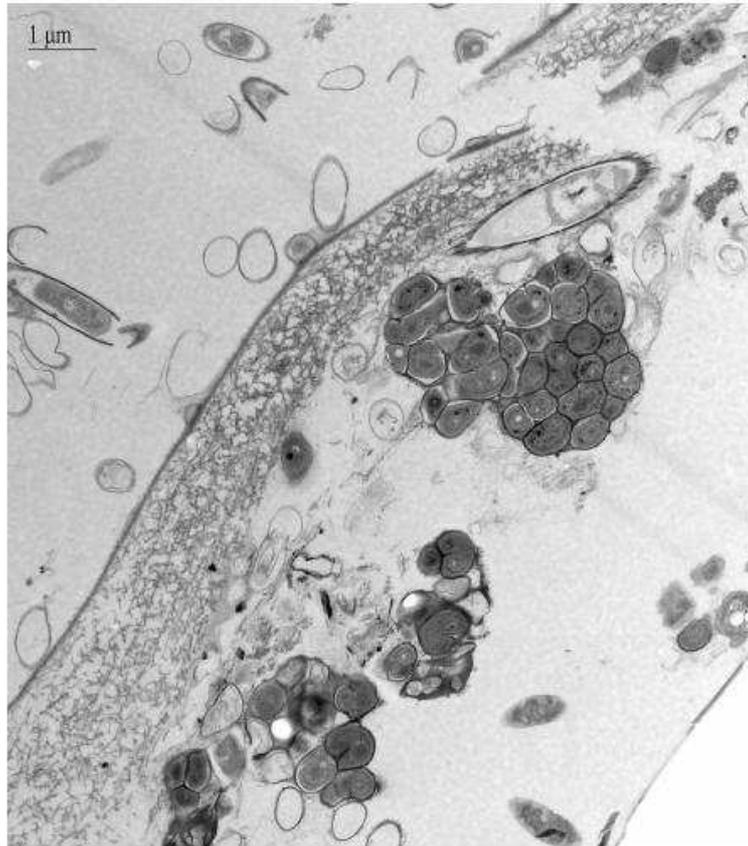


Abb. 17: Am Trägermaterial festsitzende Kolonien von *Nitrospira* in einem sich ablösenden Biofilm.

3.4.2 Immunologische Identifizierung der Nitrit oxidierenden Bakterien

Monoklonale Antikörper (Aamand et al., 1996) gegen das Schlüsselenzym der Nitritoxidanten (Nitritoxidoreduktase bei *Nitrobacter* bzw. das Nitrit oxidierende System bei den anderen Gattungen) ermöglichen einen gattungsspezifischen Nachweis in Western-Blot Analysen (Bartosch et al., 1999), nachdem die Zellproteine gelelektrophoretisch aufgetrennt worden sind. Der Antikörper HYB 153-3 erkennt alle 4 bekannten Gattungen von Nitritoxidanten, wobei eine Unterscheidung zwischen den beiden am häufigsten vorkommenden Gattungen *Nitrobacter* und *Nitrospira* aufgrund unterschiedlicher Molekulargewichte der β -Untereinheiten des Schlüsselenzyms möglich ist (Bartosch et al., 2002).

In Abbildung 18 ist ein Western-Blot mit verschiedenen Reinkulturen von Nitritoxidanten und Biofilmzellen aus Modul 1 der Ecomares-Anlage in Büsum zu sehen. Bei den Vergleichsorganismen handelt es sich um Rohextrakt von *Nitrobacter*, dessen Protein mit dem Antikörper 153-3 eine Reaktion bei 65 kDa hervorruft. Dagegen reagiert bei *Nitrospira* ein Protein mit der relativen Molekularmasse von 46 kDa. Wie deutlich zu erkennen ist, ist das starke Signal der Zellen aus Modul 1 auf ein Protein mit einer relativen Molekularmasse von 46 zurückzuführen. Daraus kann man schließen, dass viele aktive Zellen von *Nitrospira*

in dem Biofilm vorkommen. Auf Höhe des *Nitrobacter*-spezifischen Proteins ist dagegen kein positives Signal zu erkennen. Demnach sind nur sehr wenige oder nur inaktive Zellen dieser Gattung von Nitritoxidanten vorhanden.

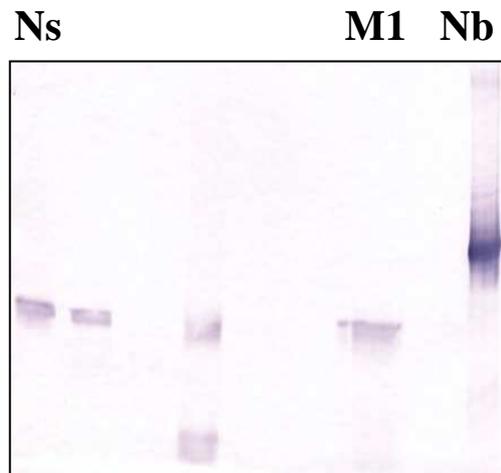


Abb. 18: Western-Blot mit den monoklonalen Antikörpern Hyb 153-3 gegen das Schlüsselenzym der Nitritoxidation. Rohextrakt des Biofilms aus Modul 1 (M1) wurde mit dem der Referenzorganismen *Nitrobacter* (Nb) und *Nitrospira* (Ns) verglichen.

Überraschenderweise war bei der Probe aus Modul 2 gar kein Signal sichtbar (nicht dargestellt). Da zum Zeitpunkt der Probenahme im Mai 2006 die Nitrifikationsleistung im Modul 2 deutlich geringer war als bei Modul 1, könnte dieses auf eine geringere Aktivität der Nitritoxidanten zurückzuführen sein.

3.4.3 FISH (Fluoreszenz in-situ Hybridisierung) mit spezifischen Sonden

Molekularbiologisch können verschiedene Gruppen von Nitrifikanten mittels spezifischer Oligonukleotidsonden gegen die 16S rRNA weiter unterteilt werden. Durch Kopplung an fluoreszierende Farbstoffe werden die Zellen lichtmikroskopisch visualisiert.

Zunächst wurden drei relativ unspezifische Sonden eingesetzt, um Vertreter verschiedener phylogentischer Unterklassen zu markieren (Manz et al., 1992):

- **FISH mit Sonde ALF**

Erkennt *Alphaproteobakterien* (u.a. *Nitrobacter*)

- **FISH mit Sonde BET**

Erkennt *Betaproteobakterien* (alle Ammoniakoxidanten bis auf *Nitrosococcus*)

- **FISH mit Sonde GAM**

Erkennt *Gammaproteobakterien* (u.a. *Nitrosococcus*)

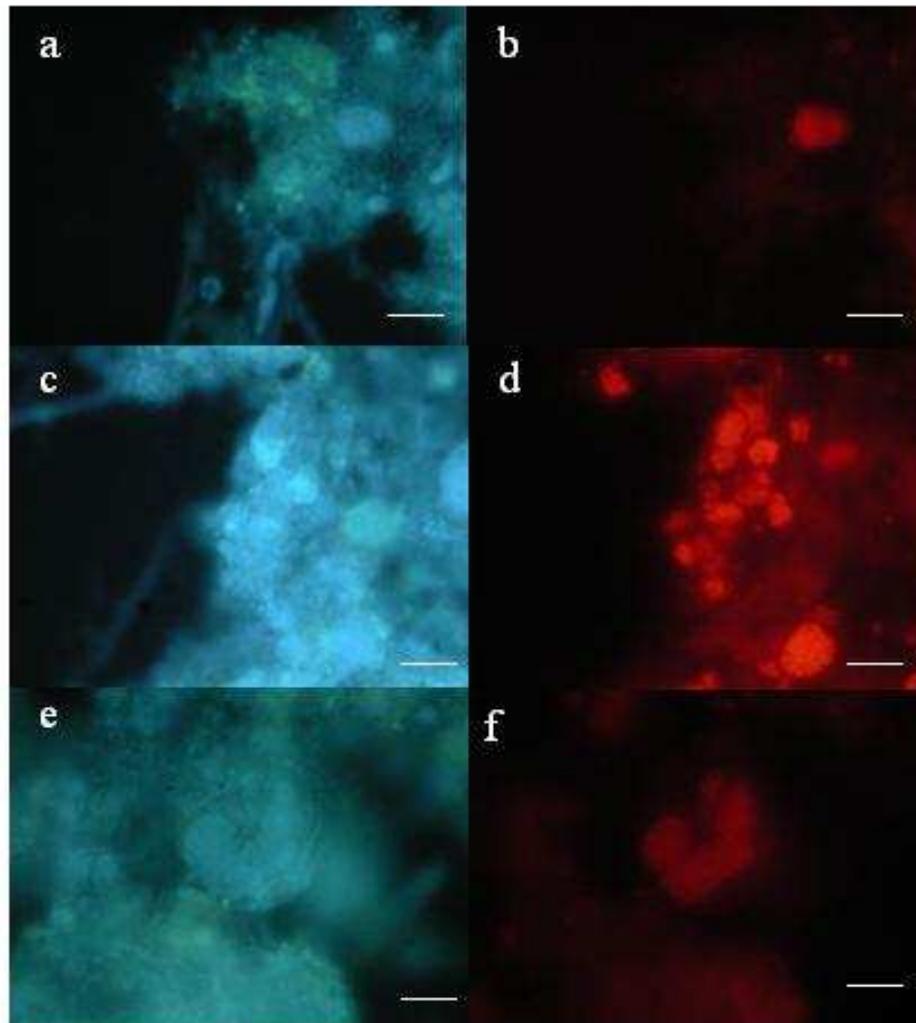


Abb. 19: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) der Biofilmzellen aus Modul 1 mit Sonden gegen die *Alphaproteobakterien* (b), *Betaproteobakterien* (d) und *Gammaproteobakterien* (f) mit den vergleichenden DAPI-Aufnahmen (a, c, e). Balken = 20 μ m.

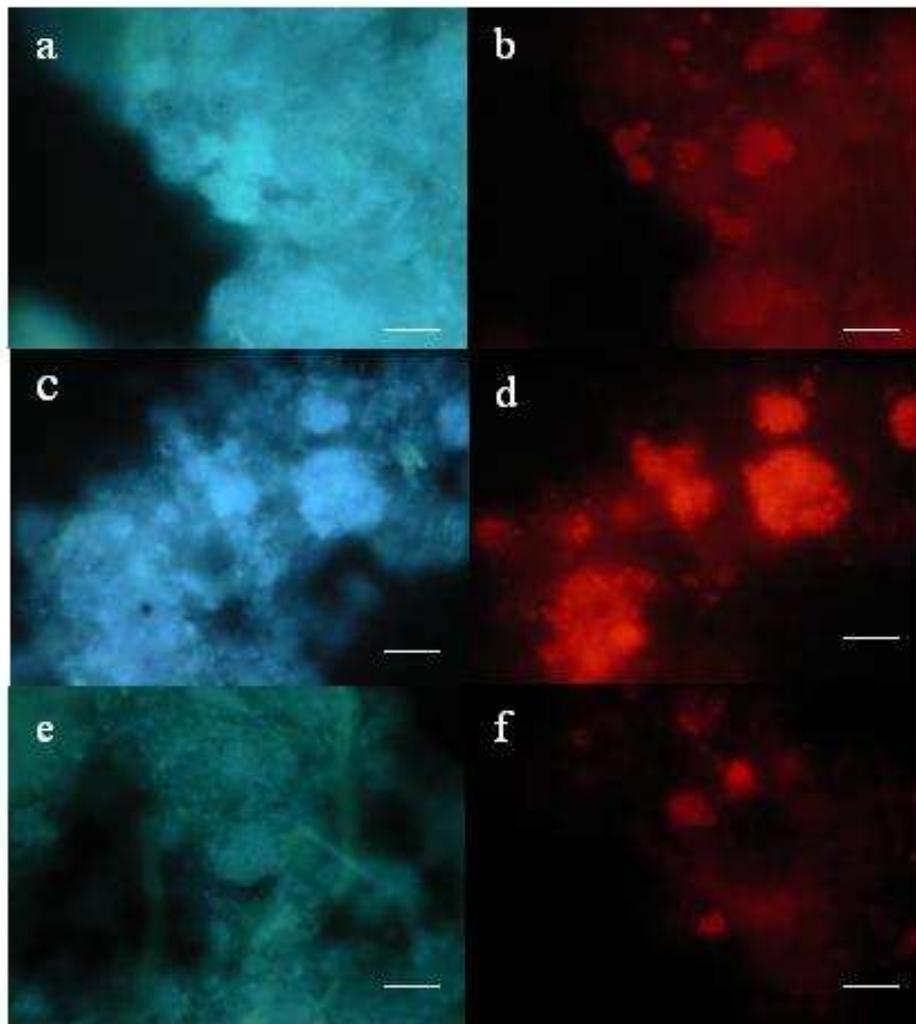


Abb. 20: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) der Biofilmzellen aus Modul 2 mit Sonden gegen die *Alphaproteobakterien* (b), *Betaproteobakterien* (d) und *Gammaproteobakterien* (f) mit den vergleichenden DAPI-Aufnahmen (a, c, e). Balken = 20 μm .

Abbildung 19 (Modul 1) und 20 (Modul 2) zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen. Als Kontrolle wurde jeweils eine unspezifische Färbung mit DAPI vorgenommen (19a, c, e). Während durch die Sonde gegen die *Alpha*- und *Gammaproteobakterien* nur einzelne Kolonien gefärbt werden konnten (Abb. 19 und 20 b und f), machten die *Betaproteobakterien* einen großen Anteil der Biomasse aus (Abb. 19d und 20d). Es ist zu vermuten, dass es sich bei den meisten gefärbten Zellen um Ammoniakoxidanten handelt. Zu den *Gammaproteobakterien* gehören Ammoniakoxidanten der Gattung *Nitrosococcus* wie *Nc. oceani* und *Nc. halophilus*. Mit der GAM Sonde konnten sowohl in Modul 1 als auch Modul 2 Mikrokolonien mit relativ großen Coccen gefärbt werden, wobei im Biofilm von Modul 2 mehr Zellen detektiert wurden als in Modul 1.

Für einen gezielten Nachweis der Ammoniakoxidanten wurden weiterhin zwei spezifische Sonden eingesetzt:

- **FISH mit Sonde Nso 190 (Mobarry et al., 1996)**

Erkennt Ammoniakoxidanten der *Betaproteobakterien*

- **FISH mit AOB Sonde NEU (Wagner et al., 1995)**

Erkennt die meisten halophilen und halotoleranten Arten von *Nitrosomonas*

Für einen gezielten Nachweis der Nitritoxidanten wurden ebenfalls zwei spezifische Sonden eingesetzt:

- **FISH mit Sonde Nspa 662 (Hovanec et al., 1998; Daims et al., 2001)**

Erkennt die Gattung *Nitrospira*

- **FISH mit Sonde Nspa 712 (Daims et al., 2001)**

Erkennt alle Vertreter des Phylums *Nitrospira*

Beide AOB-Sonden ergaben positive Signale bei der Behandlung von Biofilmzellen aus der Ecomares-Anlage. Sowohl mit der Sonde Nso 190 (Abb. 21b und 22b) als auch mit der Sonde NEU (Abb. 21d und 22d) konnte bestätigt werden, dass die Ammoniakoxidanten in Mikrokolonien vorkommen, die aus vielen Kurzstäbchen bestehen, die zum Teil coccoid wirken. Generell wurden für Modul 1 und 2 die gleichen Ergebnisse erzielt.

Die Ergebnisse zeigen, dass im untersuchten Biofilm verschiedene Ammoniakoxidanten vorkommen. Die Sonde Nso 190 erkennt alle Ammoniakoxidanten der *Betaproteobakterien*, wohingegen die Sonde NEU nur gegen halophile bzw. halotolerante Arten von *Nitrosomonas* gerichtet ist. Dies könnten Vertreter der Linien *Nm. eutropha*, *Nm. europaea*, *Nm. halophila*, *Nm. marina*, *Nm. aestuarii*, *Nm. cryotolerans* oder *Nitrosococcus mobilis* (der phylogenetisch zu *Nitrosomonas* gehört) sein.

Während im Biofilm aus Modul 1 und 2 mit den Sonden NEU, Nso 190 und GAM viele Mikrokolonien der Ammoniakoxidanten detektiert werden konnten, waren im Biofilm an der Beckenwand des Biofilters insgesamt nur wenige, kleine Kolonien nachweisbar.

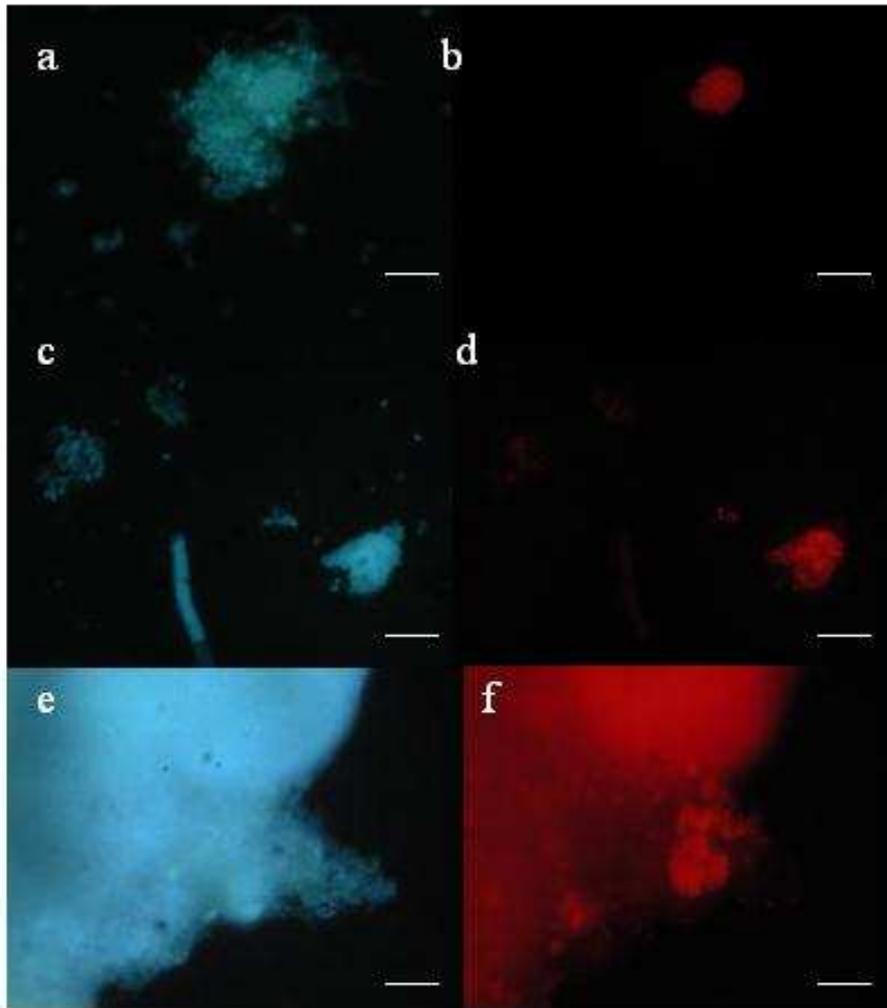


Abb. 21: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) der Biofilmzellen aus Modul 1 mit Sonden gegen Ammoniakoxidanten (b, d) und Nitritoxidanten (f) mit den vergleichenden DAPI-Aufnahmen (a, c, e). Benutzt wurden die Gensonden Nso 190 (b), NEU (d) und Nspa 712 (f). Balken = 20 μ m.

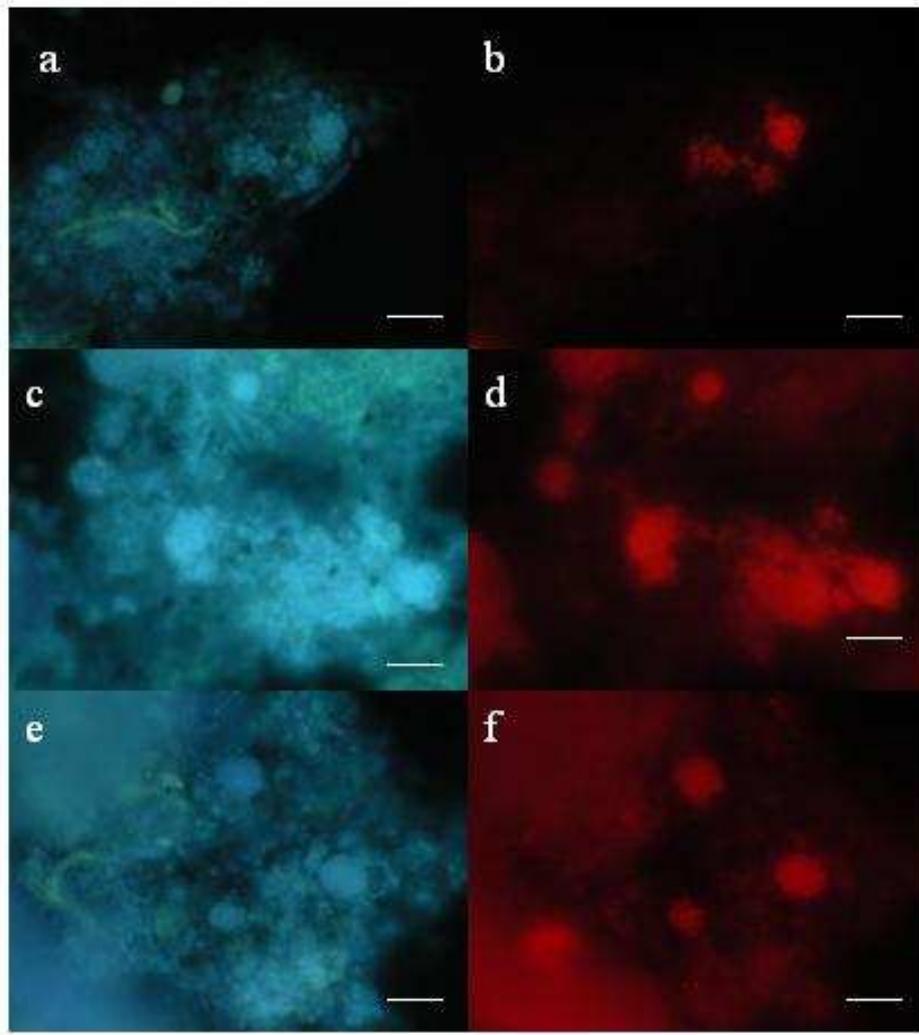


Abb. 22: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) der Biofilmzellen aus Modul 2 mit Sonden gegen Ammoniakoxidanten (b, d) und Nitritoxidanten (f) mit den vergleichenden DAPI-Aufnahmen (a, c, e). Benutzt wurden die Gensonden Nso 190 (b), NEU (d) und Nspa 712 (f). Balken = 20 μm .

Um Nitritoxidanten der Gattung *Nitrospira* spezifisch zu markieren, wurden die Sonden Nspa 712 und Nspa 662 benutzt. Während die Sonde Ns 712 alle Bakterien des Phylums *Nitrospira* erkennt, wurde die Sonde Nspa 662 nur für Vertreter der Gattung *Nitrospira* entwickelt (Hovanec et al., 1998; Daims et al., 2001). Mit beiden Sonden konnten im Biofilm von Modul 1 und 2 viele runde Kolonien mit relativ großen Zellen sowie unregelmäßigere Kolonien mit kleineren Zellen angefärbt werden (Abb. 21f und 22f). Darüber hinaus zeigten viele große Einzelzellen ein positives Signal. Im Biofilm an der Beckenwand der Biofilter wurden ebenfalls viele kleine Kolonien gefärbt (Abb. 23), so dass sich auch hier Zellen von *Nitrospira* angeheftet hatten.

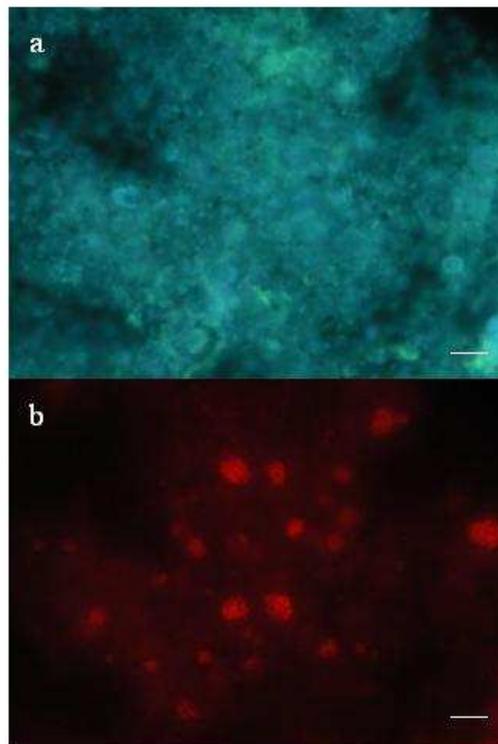


Abb. 23: Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH) von Zellen, die sich an der Beckenwand des Biofilters angeheftet hatten, mit einer Sonde gegen das Phylum *Nitrospira* Nspa 712 (b) mit vergleichender DAPI-Aufnahme (a). Balken = 10 µm.

Wie bei den Ammoniakoxidanten konnte damit auch bei den Nitritoxidanten bestätigt werden, dass die Zellen in großen Aggregaten im Biofilm der Ecomares-Anlage vorkommen. Mittels FISH konnte kein gravierender Unterschied in den Populationen der Ammoniak- oder Nitritoxidanten in Modul 1 und 2 aufgezeigt werden.

3.4.4 Populationsanalyse des nitrifizierenden Biofilms mittels PCR

Die genaueste Aussage, um welche Organismen es sich in einer Mischprobe handelt, kann durch molekularbiologische Untersuchungen getroffen werden. Zunächst erfolgte eine DNA-Extraktion aus der Gesamtprobe des nitrifizierenden Biofilms. Danach wurde die PCR (Polymerase Kettenreaktion) eingesetzt, um die DNA durch Eubakterien Primer zu vervielfältigen. Da in den Proben jedoch sehr viele verschiedene Bakterien vorkamen, war es schwer, die einzelnen Banden mittels DGGE (Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese) voneinander zu trennen. Daher wurden spezifische Primer in der PCR eingesetzt und die Amplifikate einer 16S rRNA Sequenzierung zugeführt. Der Vergleich mit Datenbanken ermöglicht es, die neue Sequenz mit den bekannten Einträgen zu vergleichen und eine Aussage darüber zu treffen, ob der Zielorganismus zu einer bekannten Art gehört oder eine neue Linie darstellt.

Zur Vervielfältigung der DNA aller Eubakterien dienten die Primer 27 und 517 nach Lane et al. (1991) sowie 341 und 907 nach Muyzer et al. (1998).

Für Ammoniak oxidierende Bakterien (AOB) wurden folgende Primer eingesetzt:

- Nso 190 (Mobarry et al., 1996): erkennt AOB der *Betaproteobakterien*
- NIT B (Voytek und Ward, 1995): erkennt alle AOB der *Betaproteobakterien*
- Nsv 443 (Mobarry et al., 1996): erkennt AOB der Gattung *Nitrosospira*
- Nsc neu (Neuentwicklung, diese Arbeit): erkennt AOB der *Gammaproteobakterien*, d.h. *Nitrosococcus oceani*, aber nicht *Nc. halophilus*

Für Nitrit oxidierende Bakterien (NOB) wurden folgende Primer eingesetzt:

- FGPS 1269 (Degrange und Bardin, 1995): erkennt NOB der Gattung *Nitrobacter*
- Nb neu (Neuentwicklung, diese Arbeit): erkennt NOB der Gattung *Nitrobacter*
- Nspa 662 (Alawi, 2003): erkennt Vertreter der Gattung *Nitrospira*
- Nsp neu (Neuentwicklung, diese Arbeit): erkennt terrestrische und marine Arten von *Nitrospira*

PCR mit Ammoniakoxidanten:

Die Amplifikation der DNA mit dem Primerpaar Nso 190 (vorwärts) und Eub 907 (rückwärts) führte zur Sequenzierung von zwei verschiedenen Arten von *Nitrosomonas* (ca. 560 Basenpaare). Bei der Sequenzierung der DNA direkt aus der Biofilmprobe konnte ein Stamm identifiziert werden, der zur bekannten Art *Nitrosomonas cryotolerans* gehört (Abb. 24). Die Analyse einer Anreicherungskultur von Ammoniakoxidanten ergab eine Sequenz, die in eine neue Linie fällt (siehe unten). Es ist zu vermuten, dass jeweils der häufigste Vertreter der AOB erfasst worden ist, der sich in den Medien kultivieren ließ.

Der Einsatz des *Nitrosococcus oceani* spezifischen Primers (Eub 517 F / Nsc neu R) verlief negativ, obwohl *Nitrosococcus*-ähnliche Zellen im Elektronenmikroskop beobachtet werden konnten. Demzufolge handelt es sich bei diesen Zellen um die Art *Nc halophila*, die nicht von diesem Primerpaar erkannt wird, oder im Ecomares Biofilter kommen bislang unbekannte Vertreter dieser Gattung vor.

Die PCR mit dem *Nitrosospira*-spezifischen Primerpaar (Eub 27 F / Nsv 443 R) ergab kein Amplifikat. Allerdings wurden mit den Primern Eub 341 F und Nit B R Mischsequenzen von

Nitrosomonas und *Nitrospira* erhalten, so dass letztere in geringer Zellzahl im Biofilm vorkommen könnten.

Die Analyse der Nitrit oxidierenden Bakterien erfolgte mit dem Primerpaar Nb neu F / FGPS 1269 R. Bei Biofilm-Material aus Modul 1 konnte ein schwaches Signal erhalten werden, bei Modul 2 verlief die PCR negativ. Demzufolge kommen nur wenige Zellen von *Nitrobacter* im Biofilter von Modul 1 vor. Da die verschiedenen Arten dieser Nitritoxidanten sehr nah miteinander verwandt sind, kann anhand eines Sequenzvergleiches der 16S rRNA keine phylogenetische Zuordnung gemacht werden.

Nitritoxidanten der Gattung *Nitrospira* wurden mit dem Primerpaar Nsp neu F / NSPA 662 R untersucht. Das erhaltene Fragment wurde mit den Einträgen der Datenbank verglichen und ein Stammbaum berechnet (Abb. 25). Es zeigte sich, dass die Sequenz des Stammes aus der Ecomares-Anlage mit keiner bekannten Sequenz übereinstimmt.

Stammbaum der Ammoniakoxidanten

In Abb. 24 ist die phylogenetische Einordnung der beiden identifizierten Arten von *Nitrosomonas* aus den Ecomares Biofiltern dargestellt. Ein Stamm konnte der bekannten Art *Nm. cryptolerans* zugeordnet werden, die aus Meerwasser bei Alaska isoliert worden ist (Jones et al.1988). Der andere Stamm ist eng verwandt mit dem Isolat des Stammes Nm 143, der eine neue Linie darstellt. Die Kultur stammt aus einem marinen Estuar in der Dominikanischen Republik (Purckhold et al., 2003). Bisher ist noch keine Artbeschreibung erfolgt, so dass es keinen gültigen Namen gibt.

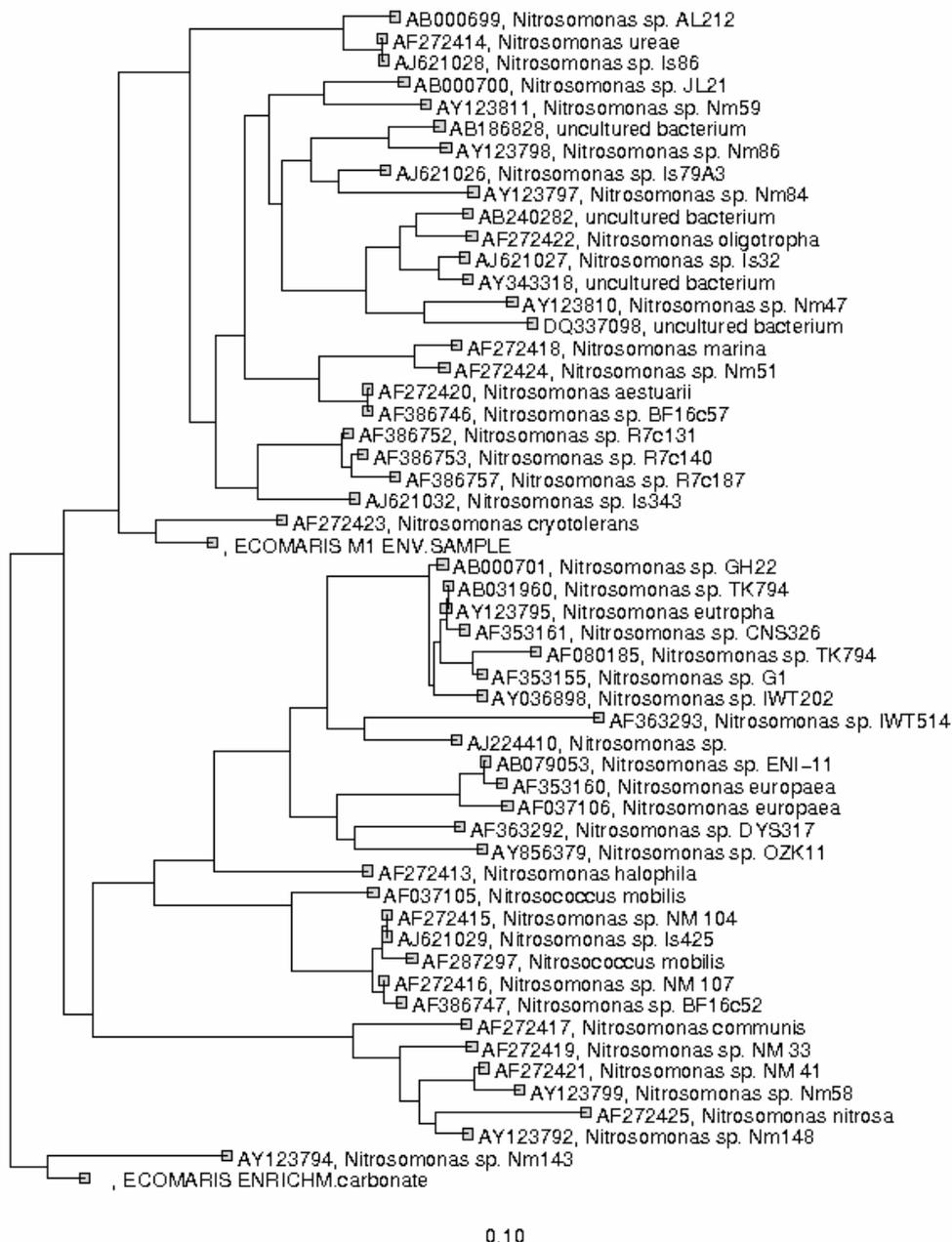


Abb. 24: Stammbaum von *Nitrosomonas*, der die verwandtschaftlichen Beziehungen zwischen den bekannten Arten und den Stämmen aus der Ecomares-Anlage aufzeigt. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10%.

Stammbaum von *Nitrospira*

Der Vergleich der 16s rRNA Teilsequenz der Zellen von *Nitrospira*, die aus der Ecomares-Anlage (Modul 1) stammen, mit den bekannten Sequenzen aus der Datenbank ergab nur eine Ähnlichkeit von 92 % mit *Nitrospira marina*. Die Artgrenze liegt bei 97,5 % Sequenz-Ähnlichkeit, aber für eine genaue taxonomische Zuordnung muss die gesamte 16S rRNA sequenziert werden. Die neue Art von *Nitrospira* aus Büsum ist näher mit den terrestrischen Arten wie *Ns. moscoviensis* oder „*Candidatus Ns. defluvii*“ verwandt als mit *Ns. marina*. Neben der bekannten Art *Ns. marina* sind noch 2 marine Anreicherungskulturen von *Nitrospira* (S 11 und F 2), die aus der Sibirischen Laptev See stammen, in den Stammbaum eingerechnet worden.

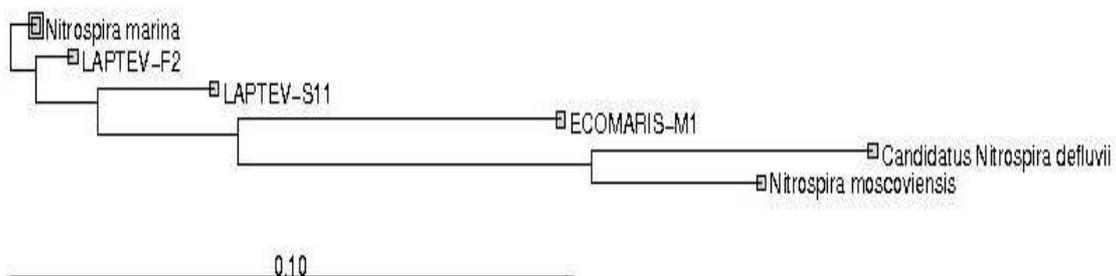


Abb. 25: Verwandtschaftsbeziehungen von Stämmen der Gattung *Nitrospira*. Dieses Dendrogramm basiert auf einer vergleichenden Analyse zwischen den 16S rRNA Sequenzen der bekannten Organismen und der Anreicherung aus der Ecomares-Anlage. Der Balken entspricht einem Sequenzunterschied von 10%.

3.5 Besiedlung von neuen Füllkörpern:

Es wurden neue weiße (Standard PE, F1) und schwarze Füllkörper (recyclertes Material, F2) in Kolben mit mineralischem Medium gegeben (10 Stück pro 150 mL) und mit Anreicherungskulturen von Ammoniak- und Nitritoxidenten aus der Ecomares-Anlage beimpft.

Das Wachstum der Nitrifikanten setzte nach 4 - 8 Wochen ein, erkennbar an der Nitritbildung (AOB) bzw. dem Nitritverbrauch (NOB). Es wurden 0,3 – 10 mM Substrat eingesetzt. Während die Ammoniakoxidanten gut anwuchsen, war das Wachstum der NOB verzögert. Diese Hemmung zeigte sich in einer hohen Nitritanhäufung im Medium.

Um eine größere Zahl an Füllkörpern zu besiedeln, wurden Ammoniakoxidanten-Ansätze im 300 mL Erlenmeyerkolben auf 3 L-Kolben überführt. Damit eine Anheftung der Nitrifikanten auf neuen weißen Füllkörpern sichtbar gemacht werden konnte, wurde das Medium nicht mit CaCO_3 gepuffert, sondern der pH Wert wurde regelmäßig nachgestellt.

Bei Einsatz von 5 mM Ammoniumchlorid als Substrat dauerte es weitere 4 Wochen, bis das durch die Ammoniakoxidanten gebildete Nitrit weiter zu Nitrat oxidiert worden ist. Es ist zu überlegen, ob die Besiedlung evtl durch die Gabe von Nitrit gestartet werden sollte, um die langsam wachsenden Nitritoxidenten zu fördern und danach erst Ammoniumchlorid zuzugeben.

Nach einem Zeitraum von 2 Monaten waren unter dem Binokular einzelne Mikrokolonien erkennbar, die sich an die Oberfläche eines neuen Füllkörpers angeheftet hatten (Abb. 26). Sie wiesen die für Nitrifikanten typische Braunfärbung auf.

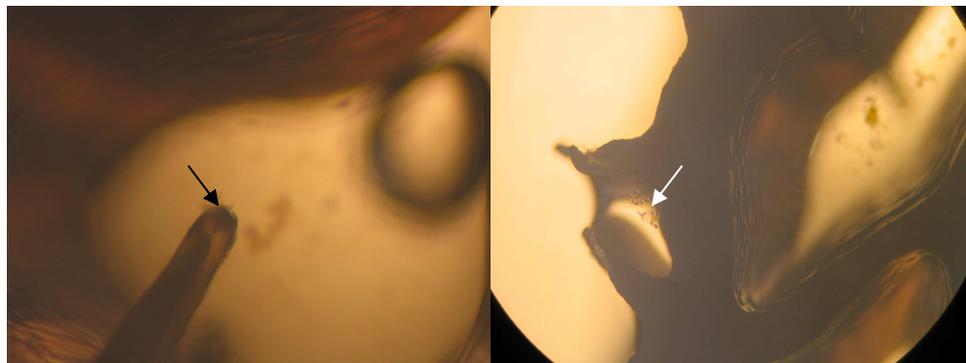


Abb. 26: Lichtmikroskopische Darstellung der beginnenden Anheftung von Nitrifikanten auf neuen Füllkörpern F1.

3.6 Aktivitätstest

Es konnte ein Kurzzeittest entwickelt werden, der in 3 Stunden, getrennt nach Ammoniak- und Nitritoxidanten, eine Aussage über die potentielle Aktivität anhand des spezifischen Substratverbrauchs bzw. Produktbildung (Nitrit bzw. Nitrat) in mineralischem Medium ermöglicht. Als gut geeignet erwiesen sich Ansätze bei 17°C, die bei 170 rpm geschüttelt wurden. Es wurden jeweils 10 Füllkörper des Typs F2 in 50 mL Medium mit jeweils 1 mM Substrat (Ammonium bzw. Nitrit) untersucht.

Zuvor ist in verschiedenen Ansätzen der Einfluss einzelner Parameter (Temperatur, Substratkonzentration, Schüttelgeschwindigkeit, Alter der Füllkörperprobe, etc.) bestimmt worden. Nachfolgend sind die Ergebnisse der einzelnen Tests aufgeführt.

Test 1:

Die Testbedingungen wurden zunächst mit vorhandenen Proben, die 6 Wochen lang bei 4°C gelagert worden waren (Proben vom 22.05.06, Test am 11.07.06), ausprobiert. Insgesamt waren die Aktivitäten nur gering. Die einzelnen Werte (in $\mu\text{M/h} \times \text{Ansatz}$) sind in der Grafik aufgeführt. Es zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit der Aktivität von der Anzahl der eingesetzten Füllkörper, die erwartungsgemäß bei 20 FK höher war als bei 10 FK pro 150 mL Medium. Weiterhin fiel auf, dass die Aktivitäten in Modul 1 höher waren als in Modul 2 und die Nitritoxidanten eine deutlich höhere Umsatzrate (Aktivität) hatten als die Ammoniakoxidanten. Der Test wurde mit relativ hohen Substratkonzentrationen von 10 mM (AOB) und 4 mM (NOB) durchgeführt. Über Steigung der Trendlinie wurde die Aktivität der Probe berechnet.

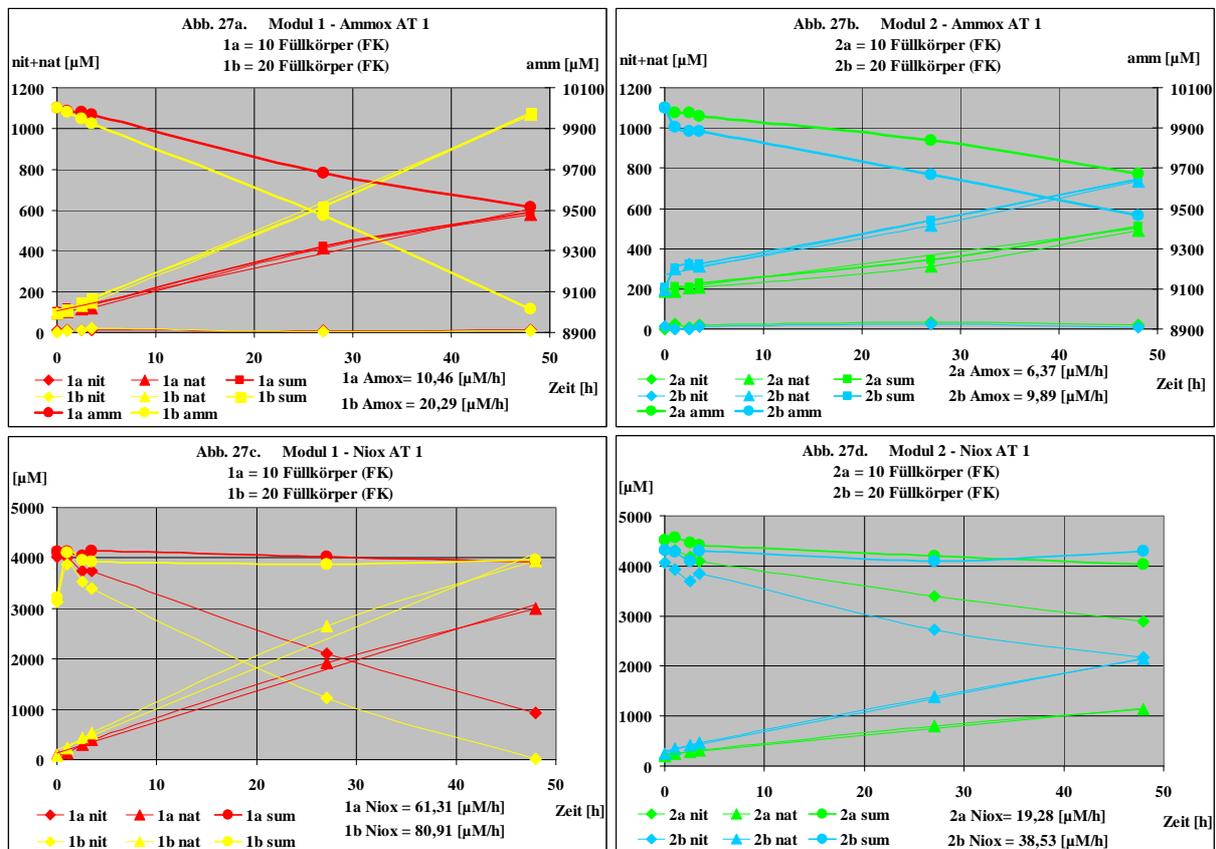


Abb. 27: Umsatzraten der Ammoniak (a und b) und Nitrit oxidierenden Bakterien (c und d) aus Modul 1 (a und c) und Modul 2 (b und d) in Abhängigkeit von der eingesetzten Füllkörpermenge.

Test 2:

Um die Umsatzraten zu erhöhen, wurde das Volumen von 150 auf 50 ml Medium reduziert und es wurde eine einheitliche Substratkonzentration von 3 mM benutzt. Es wurden die gleichen Proben wie in Test 1 eingesetzt, die vor 10 Wochen aus dem Biofilter der Anlage entnommen worden waren (FK vom 22.05.06, Test am 01.08.06). In diesem Versuch wurden 2 verschiedene Inkubationstemperaturen (17 und 28°C) miteinander verglichen.

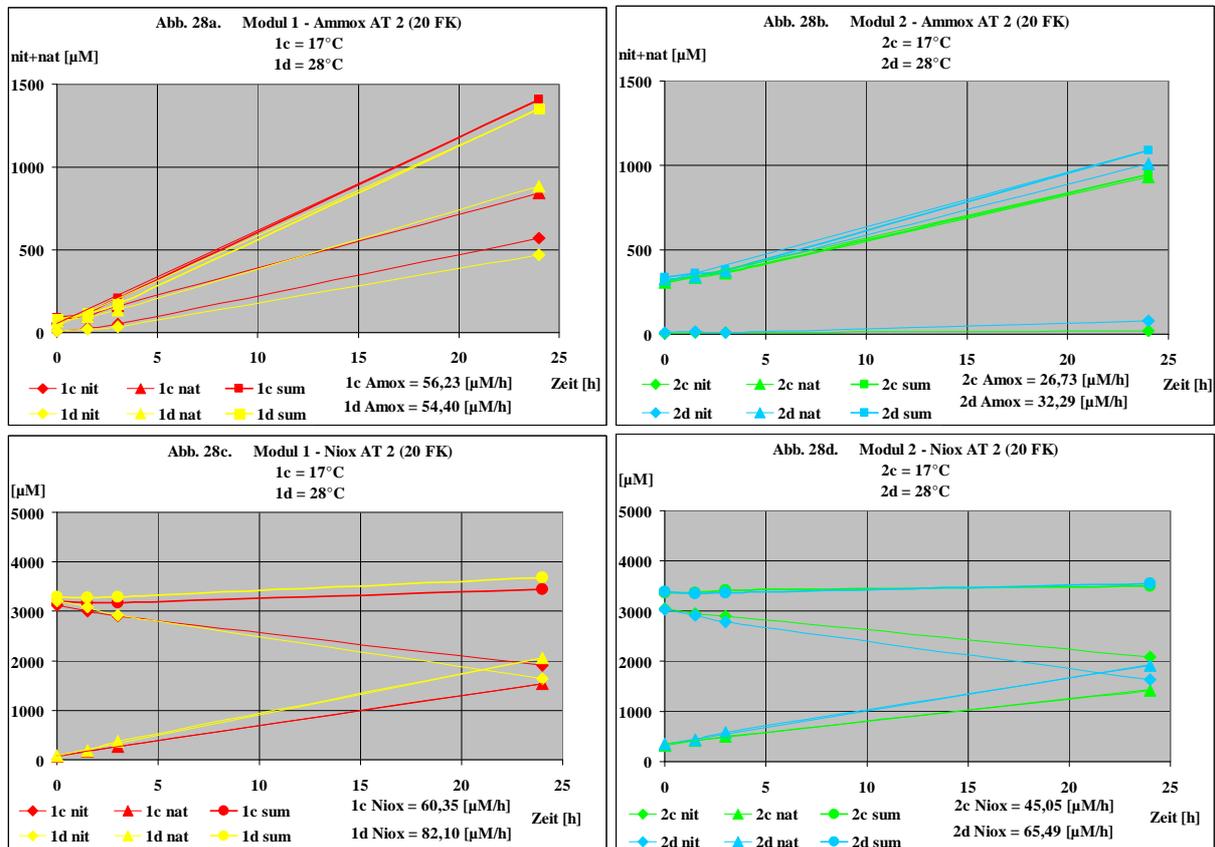


Abb. 28: Umsatzraten der Ammoniak (a und b) und Nitrit oxidierenden Bakterien (c und d) aus Modul 1 (a und c) und Modul 2 (b und d) in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur.

Wie in Test 1 zeigten die Nitrifikanten aus Modul 1 höhere Aktivitäten als die aus Modul 2, wobei die Aktivitäten der Nitritoxidanten nach der langen Lagerung nur etwas höher waren als die der Ammoniakoxidanten. Bei den AOB zeigten sich nur geringe Unterschiede zwischen 17 und 28°C, während die Inkubation der NOB bei 28°C zu deutlich höheren Umsätzen führte als die bei 17°C. Im Allgemeinen waren die Abbauraten in diesem Test durch das reduzierte Volumen im Vergleich zu Test 1 erhöht.

Eine Vergleichbarkeit der Ergebnisse läßt sich durch Normieren des Umsatzes pro eingesetzten Füllkörper erzielen.

Test 3:

Da die Parameter für den Aktivitätstest nun feststanden, wurde der Versuch mit frischen Füllkörpern aus der Anlage wiederholt, die vor dem Test nur 1 Woche bei 4°C gelagert worden sind. Der Versuch wurde bei 17°C mit 3 mM als Substrat angesetzt. Als weiterer Einflussfaktor wurde hier untersucht, ob das bisher benutzte mineralische Medium oder das Wasser aus dem Biofilter für die Nitrifikanten besser geeignet ist. Um die Begleitflora abzutöten, wurde das Biofilterwasser in einem Ansatz sterilisiert. Wie Test 1 und 2 gezeigt haben, kann die Aktivität der AOB durch die Produktbildung (Summe Nitrit und Nitrat) in hoher Auflösung dargestellt werden. Neben Nitrit muss auch Nitrat gemessen und berücksichtigt werden, da zumindest ein Teil des gebildeten Nitrits durch die NOB weiter oxidiert wird. Auf die Bestimmung von Ammonium wurde desweiteren bis auf Einzelfälle (Test 15) verzichtet.

Es konnten folgende Aktivitäten bestimmt werden:

	FK vom 02.08.06 Test am 08.08.06	Aktivität ($\mu\text{M}/\text{h} \times \text{Ansatz}$)	
		Modul 1	Modul 2
AOB	Medium	136	97
AOB	Biofilterwasser unsteril	107	120
AOB	Biofilterwasser steril	108	96
NOB	Medium	377	335
NOB	Biofilterwasser unsteril	313	189
NOB	Biofilterwasser steril	281	215

Da es sich um frische Proben handelte, waren die Aktivitäten insgesamt sehr hoch. Es konnte reproduziert werden, dass sowohl die AOB als auch die NOB aus Modul 1 aktiver sind als die aus Modul 2. Wie in Versuch 1, zeigten die NOB eine dreimal höhere Abbaurate als die AOB. Bei beiden Stufen der Nitrifikation konnte ein negativer Einfluss des Biofilterwassers beobachtet werden, da die Aktivitäten in der Regel etwas geringer waren als im mineralischen Medium.

Der Vergleich mit den Werten aus Test 2 zeigt, dass nach einer 10-wöchigen Lagerung der Füllkörper noch 41 % (Modul 1) bzw. 28 % (Modul 2) der Aktivität der AOB und 13 % (Modul 1) bzw. 16 % (Modul 2) der Aktivität der NOB erhalten geblieben sind. Das bedeutet, dass die NOB auf Hungerphasen empfindlicher reagieren als AOB.

Test 4:

In diesem Ansatz erfolgte der Vergleich verschiedener Sauerstoffkonzentrationen, die in stehenden Ansätzen bzw. durch unterschiedliche Schüttelgeschwindigkeiten hervorgerufen wurden. Die Parameter aus Test 2 und 3 (50 mL, 20 Füllkörper, 3 mM, 17°C) wurden beibehalten. Die Proben sind 2 Wochen bei 4°C aufbewahrt worden (FK vom 02.08.06, Test am 15.08.06).

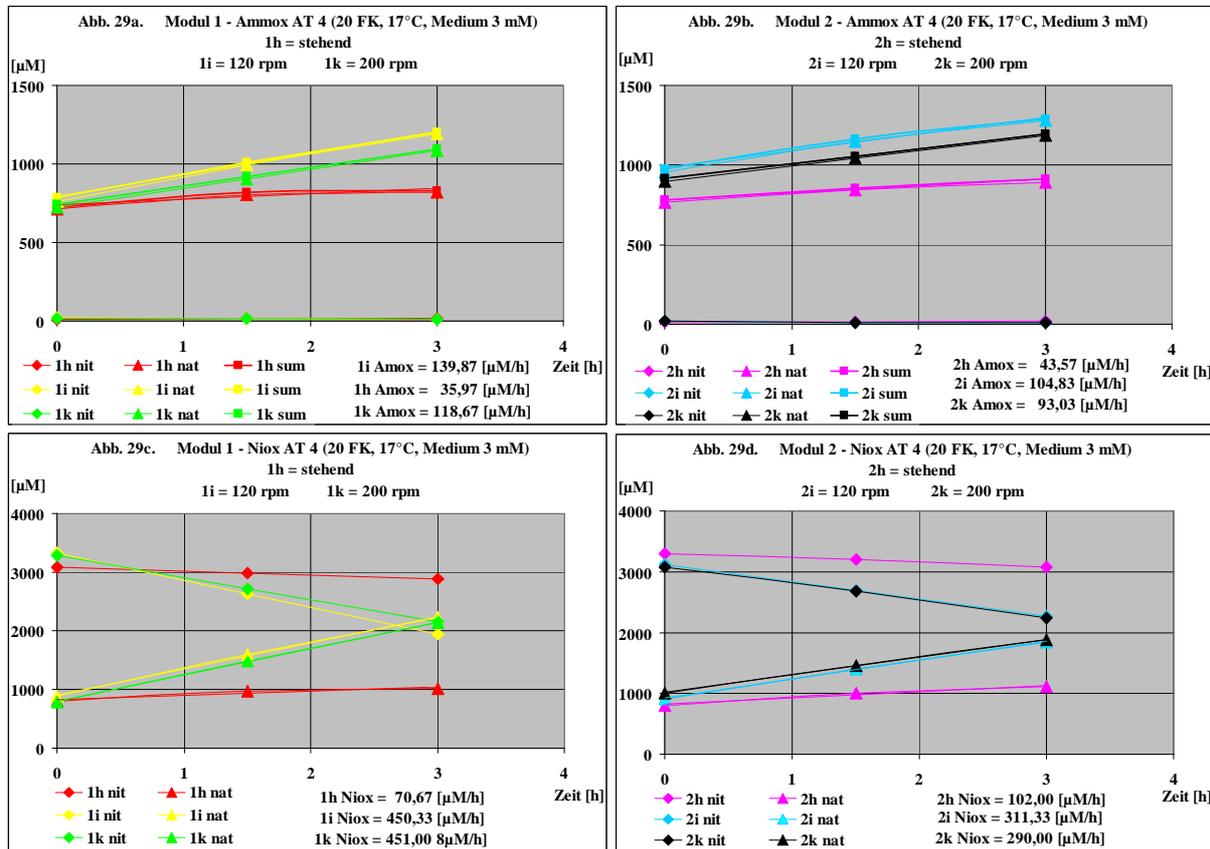


Abb. 29: Umsatzraten der Ammoniak (a und b) und Nitrit oxidierenden Bakterien (c und d) aus Modul 1 (a und c) und Modul 2 (b und d) in Abhängigkeit von der Schüttelgeschwindigkeit.

In stehenden Ansätzen waren beide Stufen der Nitrifikation gehemmt. Die beste Aktivität fand sich bei einer Einstellung von 120 rpm, wobei die bei 200 rpm bei den AOB geringfügig niedriger und bei den NOB gleich hoch waren. In stehenden Ansätzen war die Aktivität der NOB doppelt und in geschüttelten dreimal so hoch wie die der AOB.

Test 5:

In Anlehnung an die Bedingungen in der Anlage wurde die Substratkonzentration für die Nitrifikanten auf 0,5 mM gesenkt. Dementsprechend sollte eine Menge von 10 Füllkörpern pro Kolben für eine messbare Aktivität ausreichen. Die Proben wurden am 7.9.2006 aus dem Biofilter in Büsum entnommen und am 8.9.2006 erfolgte die Aktivitätsbestimmung in Hamburg. Um die optimale Schüttelgeschwindigkeit genauer zu bestimmen als im Vorversuch (Test 4), wurde der Versuch mit kleineren Schritten zwischen 125 und 175 rpm wiederholt. Die anderen Parameter (50 mL, 17°C) bli eben konstant.

Es wurden folgende Werte erzielt:

	FK vom 08.09.06 Test am 08.09.06	Aktivität ($\mu\text{M} / \text{h} \times \text{Ansatz}$)	
	Ansatz	Modul 1	Modul 2
AOB	125 rpm	70	73
AOB	150 rpm	87	105
AOB	175 rpm	79	93
NOB	125 rpm	190	176
NOB	150 rpm	173	222
NOB	175 rpm	202	223

Im Vergleich zu den vorherigen Versuchen waren die Aktivitäten ungefähr halb so hoch. Dies steht mit der Halbierung der Füllkörpereinwaage im Einklang (10 statt 20). Erneut zeigten die NOB eine weitaus höhere Umsatzrate als die AOB, diesmal handelte es sich um einen Faktor von 2-3. Mit Erhöhung der Schüttelgeschwindigkeit stieg auch die Aktivität an, wobei das Optimum bei den AOB 150 rpm und bei den NOB 150-175 rpm betrug. Die NOB können demnach mehr Sauerstoff vertragen als die AOB, was durch die dichtgepackten Mikrokolonien erklärt werden könnte. Bei diesem Versuch wurde der Substratverbrauch bzw. die Produktbildung nur über einen Zeitraum von 1,5 Stunden berücksichtigt, da das Substrat danach bereits verbraucht war.

Im Gegensatz zu den vorherigen Versuchen waren die Aktivitäten der AOB und der NOB in diesem Versuch in Modul 1 nicht höher als in Modul 2. Es müsste geklärt werden, ob diese Beobachtung mit der wechselnden Besatzdichte der beiden Module zusammenhängt.

Test 6:

Test 3 zeigte, dass hemmende Substanzen im Biofilterwasser die Aktivität der nitrifizierenden Bakterien beeinträchtigen. Dabei könnte es sich um Nitrat handeln, welches als Endprodukt der Nitrifikation angehäuft wird. Deshalb wurde getrennten Ansätzen 5 bzw. 10 mM Nitrat hinzugefügt - Konzentrationen, die auch in der Ecomares Anlage relevant sind. Der Versuch wurde mit 10 Füllkörpern in 50 mL (0,5 mM) bei 17°C und 170 rpm durchgeführt. Die Proben waren 10 Tage alt (FK vom 08.09.06, Test am 18.09.06).

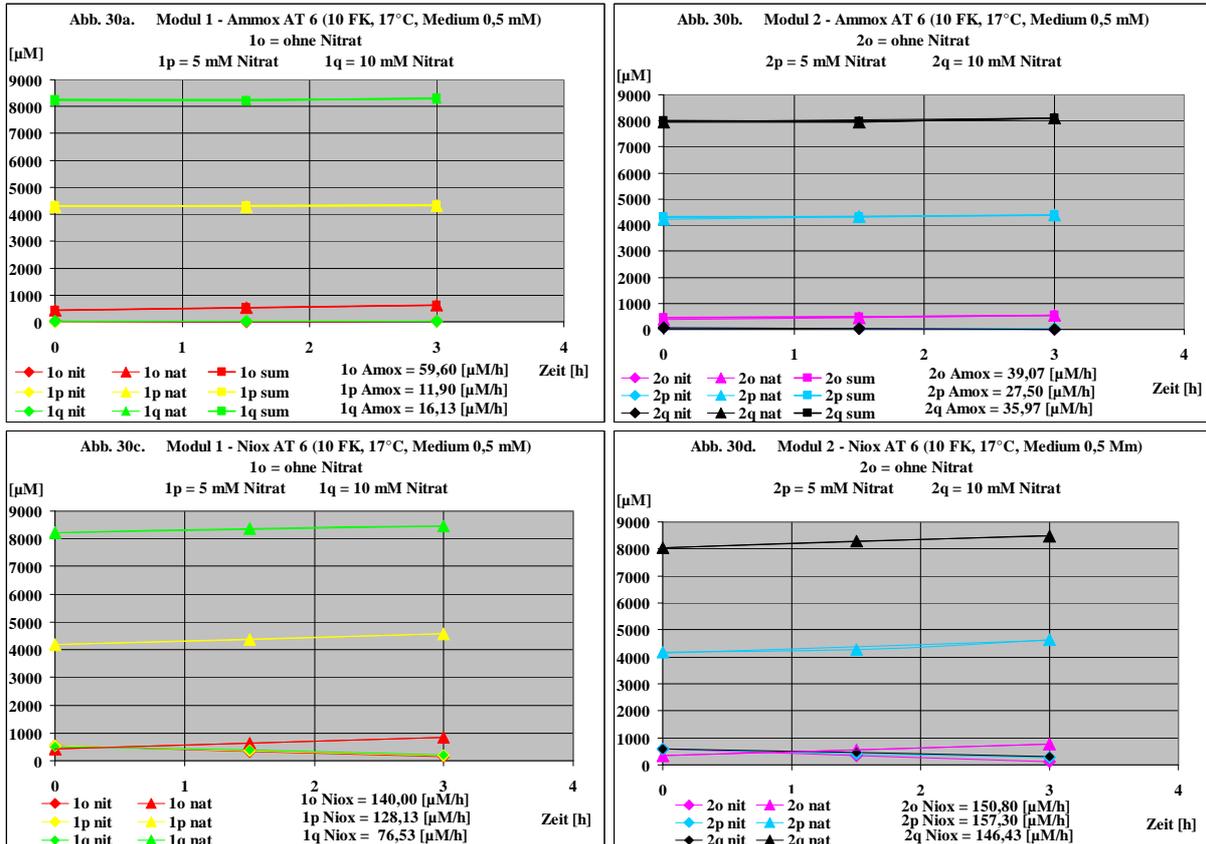


Abb. 30: Umsatzraten der Ammoniak (a und b) und Nitrit oxidierenden Bakterien (c und d) aus Modul 1 (a und c) und Modul 2 (b und d) in Abhängigkeit von der eingesetzten Nitratkonzentration.

Die Auswertung zeigte, dass hohe Nitratkonzentrationen nicht nur die AOB sondern auch die NOB hemmen. Dies war am deutlichsten bei den AOB aus Modul 1 zu sehen, wo die Umsatzrate schon in Anwesenheit von 5 mM Nitrat von 60 µM/h auf 12 µM/h abfiel. Die NOB reagierten auf Nitrat weniger sensibel, denn eine Hemmung in Modul 1 trat erst bei 10 mM auf (50 % Reduktion). Die Zellen aus Modul 2 reagierten generell weniger empfindlich auf die Nitratgaben, was in weiteren Versuchen überprüft werden müsste. Möglicherweise spielt die Nitratthemmung bei ohnehin durch längeres Hungern inaktivierten NOB keine Rolle mehr.

Test 7:

Um eindeutig zu klären, ob die höhere Aktivität der NOB eventuell auf eine ungleiche Verteilung der AOB und NOB auf den Füllkörpern zurückzuführen ist, wurden dieselben Füllkörper für beide Versuche benutzt. Es erfolgte a) eine gleichzeitige Gabe beider Substrate oder b) es wurde erst Nitrit und nach dessen Verbrauch Ammonium zugegeben. Die Füllkörper wurden am 08.09.06 aus dem Biofilter entnommen und am 25.09.06 untersucht.

In jeweils 2 Parallelen wurde bestätigt, dass die Umsatzraten der NOB (143-207 $\mu\text{M}/\text{h}$ für Modul 1 und 106 – 246 $\mu\text{M}/\text{h}$ für Modul2) wesentlich höher waren als die der AOB (31–56 $\mu\text{M}/\text{h}$ für Modul 1 und 20–101 $\mu\text{M}/\text{h}$ für Modul2).

Test 8:

Da die vorherigen Versuche in Abhängigkeit der angelegten Parameter große Schwankungen aufwiesen, sollten 3 parallele Ansätze die Genauigkeit der Methode bestimmen. Die Bedingungen waren: 50 mL, 17°C, 170 rpm, 1 mM Substrat, 10 Füllkörper pro Kolben. Die Proben waren 3 Tage alt.

	FK vom 06.10.06 Test am 09.10.06	Aktivität ($\mu\text{M} / \text{h} \times \text{Ansatz}$)	
	Ansatz	Modul 1	Modul 2
AOB	A	68	108
AOB	B	66	84
AOB	C	66	63
NOB	A	250	222
NOB	B	192	221
NOB	C	173	225

Daraus wurden folgende Mittelwerte berechnet:

Ammoniakoxidanten	Modul 1	66,7 +/- 1,6 $\mu\text{M} / \text{h}$
	Modul 2	84,9 +/- 23,0 $\mu\text{M} / \text{h}$
Nitritoxidanten	Modul 1	204,9 +/- 44,8 $\mu\text{M} / \text{h}$
	Modul 2	211,1 +/- 36,9 $\mu\text{M} / \text{h}$

Daraus folgt, dass die Aktivitätsmessungen gut zu reproduzieren sind. Die Zellen aus Modul 2 waren etwas aktiver als die aus Modul 1, wie es schon bei Test 5 der Fall war.

Test 9:

Nachdem hohe Konzentrationen an Nitrat hemmend wirkten, sollten auch die beiden Substrate Ammonium und Nitrit in hohen Mengen (3 bis 10 mM) eingesetzt werden. Ansonsten wurden die Bedingungen aus Test 8 beibehalten. Die Füllkörper sind für 4 Tage gelagert worden und somit sind die Ergebnisse aus Test 8 mit einer Substratkonzentration von 1 mM auch für diesen Ansatz zu berücksichtigen.

Aus den gemessenen Werten ist keine Hemmung durch hohe Konzentrationen an Ammonium oder Nitrit ersichtlich. Die Werte liegen alle im Rahmen der üblichen Schwankungsbreite (Test 8). Der Aktivitätsanstieg in Modul 2 konnte reproduziert werden.

	FK vom 06.10.06 Test am 10.10.06	Aktivität ($\mu\text{M} / \text{h} \times \text{Ansatz}$)	
	Ansatz	Modul 1	Modul 2
AOB	3 mM	43	71
AOB	5 mM	49	52
AOB	10 mM	42	65
NOB	3 mM	225	187
NOB	5 mM	191	248
NOB	10 mM	182	198

Test 10: Füllkörper aus Strande

Im 10. Aktivitätstest wurden Füllkörper des Typs F2 der Garnelenzuchtanlage in Strande bei Kiel untersucht, um einen Vergleich hinsichtlich Temperatur und Tierbesatz zu haben. Die Biofilter in Strande laufen bei einer höheren Betriebstemperatur von 26°C (Büsum 17°C) und der Salzgehalt des Ostseewassers ist niedriger als der in der Nordsee. In Anlehnung an Test 2 wurden die Versuche bei 17°C und bei 28°C durchgeführt. Die Proben wurden direkt am Tag nach der Entnahme in 3 Parallelen untersucht. Die Versuchsparameter entsprechen Test 9.

	FK vom 23.10.06 Test am 24.10.06	Aktivität ($\mu\text{M} / \text{h} \times \text{Ansatz}$)	
	Ansatz	26°C	17°C
AOB	A	8,8	7,4
AOB	B	8,8	10,1
AOB	C	15,4	7,3
NOB	A	50,4	33,0
NOB	B	50,2	31,4
NOB	C	42,8	22,9

Es zeigte sich, dass die Nitrifikanten in Strande gut an eine Temperatur von 26°C angepasst sind, wobei die Aktivitäten im Vergleich zu Büsum sehr gering ausfielen. Der Ecomares-Anlage entsprechend waren aber die NOB auch hier wesentlich - um den Faktor 4 - aktiver als die AOB.

Test 12:

Hinsichtlich der Materialeigenschaften neuer Kunststoffe sollten nun mögliche hemmende Einflüsse der Füllkörper auf Nitrifikanten analysiert werden. Es standen fabrikneue weiße (F1) und schwarze Füllkörper (recyceltes PE, F2) zur Verfügung. Es wurden je 10 bewachsene Füllkörper aus Büsum (1 Tag alte Proben) in Kolben inkubiert, zu denen jeweils 10 neue weiße bzw. schwarze Füllkörper gegeben wurden. Kontrollansätze ohne neue Füllkörper dienten als Referenz. Versuchsparameter siehe Test 9.

	FK vom 09.11.06 Test am 10.11.06	Aktivität ($\mu\text{M} / \text{h} \times \text{Ansatz}$)	
	Ansatz	Modul 1	Modul 2
AOB	ohne	95	149
AOB	F1 weiß	90	128
AOB	F2 schwarz	76	120
NOB	ohne	187	287
NOB	F1 weiß	171	286
NOB	F2 schwarz	214	263

Es konnte kein negativer Einfluss der neuen Kunststoffe auf die Aktivität der AOB und der NOB beobachtet werden. Die Werte lagen alle im Schwankungsbereich und die Aktivitäten waren durchweg hoch. Wie auch bei den vorherigen Versuchen konnte die erhöhte Umsatzrate in Modul 2 bestätigt werden.

Test 13:

Um den Zeitraum zu verlängern, in dem die Nitrifikanten mit den neuen Kunststoffen in Kontakt stehen, wurden Ansätze wie in Test 12 mit 10 bewachsenen und 10 neuen Füllkörpern befüllt, jetzt aber 4 Tage lang inkubiert, bevor der Versuch durch die Substratgabe gestartet wurde.

	FK vom 09.11.06 Test am 10.11.06	Aktivität ($\mu\text{M} / \text{h} \times \text{Ansatz}$)	
	Ansatz	Modul 1	Modul 2
AOB	ohne	73	146
AOB	F1 weiß	61	160
AOB	F2 schwarz	87	161
NOB	ohne	232	298
NOB	F1 weiß	254	317
NOB	F2 schwarz	216	372

Es ließen sich wiederum keine negativen Effekte der weißen oder schwarzen Füllkörper auf die Aktivität der Nitrifikanten aufzeigen. Daraus wurde gefolgert, dass die Zellen im Biofilm geschützt sind und ein möglicher Kontakt mit chemischen Substanzen erst nach einem langen Zeitraum eintritt.

Daher wurde ein Langzeit-Hemmversuch entwickelt, der nicht mit Biofilmzellen, sondern mit abgelösten Zellen von Nitrifikanten durchgeführt wird (siehe unten).

Im Folgenden sind die Ergebnisse der einzelnen Testansätze für die Ecomares-Anlage in Büsum stichpunktartig dargestellt.

Zusammenfassende Ergebnisse der Aktivitätstests:

- Nitrifizierende Bakterien aus dem Biofilter von Modul 1 waren von Mai bis September 2006 aktiver als die aus Modul 2
- ab Oktober 2006 steigerten die Ammoniak und Nitrit oxidierenden Bakterien aus Modul 2 im Vergleich zu Modul 1 ihre Umsatzraten
- Nitrit oxidierende Bakterien zeigten generell eine 3-4mal höhere Aktivität als Ammoniak oxidierende Bakterien

Im Mai 2006 war Modul 1 überwiegend mit jungen Fischen besetzt, die eine hohe Stoffwechselaktivität zeigten. In Modul 2 lebten zu diesem Zeitpunkt wenige ältere Fische.

Um die unterschiedliche Einwaage an Füllkörpern bei den verschiedenen Versuchen zu berücksichtigen, wurde die Aktivität auf einen einzelnen Füllkörper umgerechnet.

Aktivität pro Füllkörper (nmol/h x Körper):

	M1	M2
AOB	153-433	124-525
NOB	430-1128	473-1117

3.7 Hemmversuche mit neuem HDPE-Material

Test 14: Geschüttelter Ansatz

Verschiedene Biofiltermaterialien sollten auf eine mögliche Hemmwirkung gegenüber nitrifizierenden Bakterien untersucht werden. Da im Kurzeittest keine relevanten Unterschiede messbar waren (Aktivitätstest 13), wurden Wachstumsversuche mit 3 Kunststoffgranulaten durchgeführt. Es handelte sich um das schwarze, recycelte Polyethylen, welches momentan als Ausgangsbasis für die Füllkörper eingesetzt wird (G2), die entsprechende Rohware (BS) in weiß (G1) sowie ein weißes Granulat, das eine Trinkwasser-Zulassung (TWZ) besitzt (G3).

Die Probenahme erfolgte am 23.11.06, der Test wurde am 27.11.06 gestartet. Um die Zellen der Ammoniak- und Nitritoxidenten aus dem schützenden Biofilm herauszulösen, wurden die bewachsenen Füllkörper mit sterilen Glaskugeln (Durchmesser 1 mm) übers Wochenende geschüttelt. Diese Zellsuspension wurde als Inokulum für jeweils 60 g Granulat in 150 mL Medium eingesetzt, um den Einfluss chemischer Mittel, die aus dem Kunststoff herausgelöst werden könnten, in einem Langzeittest nachzuweisen. Daher wurden relativ hohe Substratkonzentrationen eingesetzt (10 mM NH_4Cl für die Ammoniakoxidanten bzw. 5 mM NaNO_2 für die Nitritoxidanten), um die einzelnen Effekte zu strecken. Dabei wurde berücksichtigt, dass Nitritoxidanten im Allgemeinen sensibler auf hohe Substratkonzentrationen reagieren. Der Ansatz mit den beiden weißen Granulaten erfolgte sowohl mit Zellen aus Modul 1 als auch Modul 2. Zur Kontrolle diente ein Kolben, in den kein Granulat gefüllt wurde.

Innerhalb einer Woche war in keinem Ansatz Substratabnahme nachweisbar. Es lag die Vermutung nahe, daß die Zellen durch zu langes Schütteln mit den Glaskugeln zerrieben worden waren. Aus diesem Grund wurden die Kulturen ein weiteres Mal mit Zellen angeimpft, die nur kurz (1 Stunde lang) mit Glaskugeln herausgeschüttelt wurden.

Da die Ammoniakoxidanten durch die hohe Substratkonzentration zusätzlich gehemmt waren, dauerte es bei diesem Ansatz sehr lange, bis überhaupt Wachstum (anhand der Summe Nitrit und Nitrat) messbar war (Abb 31a). Bei der Kontrolle startete die Nitritbildung nach ca. 7 Tagen, und binnen 9 Tagen wurde die gesamte Substratvorlage von 10 mM Ammoniumchlorid oxidiert. Bei allen eingesetzten Granulaten zeigte sich eine starke Hemmung der Ammoniakoxidation, die im Ansatz mit dem schwarzen recycelten PE (G2) am geringsten war (Zellen aus Modul 1). Sie startete hier nach 16 Tagen und war nach 39 Tagen ab Versuchsbeginn abgeschlossen. Die beiden Ansätze mit weißem Granulat (G1) in Modul verliefen relativ synchron mit einem Beginn der Ammoniakoxidation am Tag 32, die am Tag 52 ab Versuchsbeginn abgeschlossen war. Dabei zeigte sich eine leichte Verschiebung im Ansatz des TWZ-Granulates (G3). Eine weitere Verzögerung war bei Zellen aus Modul 2 zu beobachten, die mit weißem Standard PE (G1) inkubiert wurden. Hier war die erste Nitritbildung nach 42 Tagen messbar. Bis Tag 25 war im Ansatz der Zellen aus Modul 2 mit weißem TWZ-Granulat (G3) gar keine Nitrifikation feststellbar (Abb. 31a Auszug). Erst danach begann eine sehr langsame Nitritbildung.

Bei den Nitritoxidenten (Abb. 31b) waren die Unterschiede der einzelnen Ansätze durch die geringere Substratkonzentration im Vergleich zu den Ammoniakoxidanten (5 statt 10 mM) weniger stark ausgeprägt. Wie zu erwarten, war die Nitritoxidation in der Kontrolle am schnellsten (nach ca. 19 Tagen) abgeschlossen. Dabei zeigt sich das langsamere Wachstum der Nitritoxidenten im Vergleich zu den Ammoniakoxidanten, da diese die doppelte Menge an Substrat in 16 Tagen verbraucht hatten. Fast zeitgleich zur Kontrolle wurde das Nitrit in Anwesenheit des schwarzen Granulates (G2) oxidiert. Alle 4 Ansätze mit weißem Granulat waren verzögert, wobei bei Modul 1 das TWZ-Granulat (G3) und bei Modul 2 das Standard-Granulat (G1) besser geeignet zu sein schien. Der Ansatz mit weißem Standardmaterial (G1) und Zellen aus Modul 1 war unerwarteterweise so stark gehemmt, dass auch nach 67 Tagen erst 2 mM Nitrit oxidiert worden waren. Dieser Versuch sollte mit häufigeren Messpunkten während der eigentlichen Nitritoxidationsphase wiederholt werden.

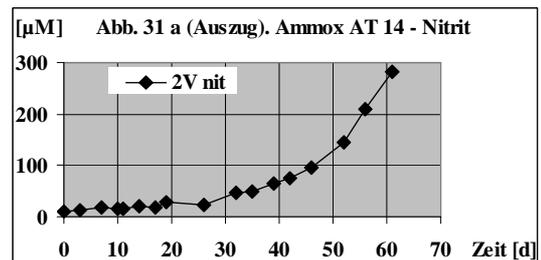
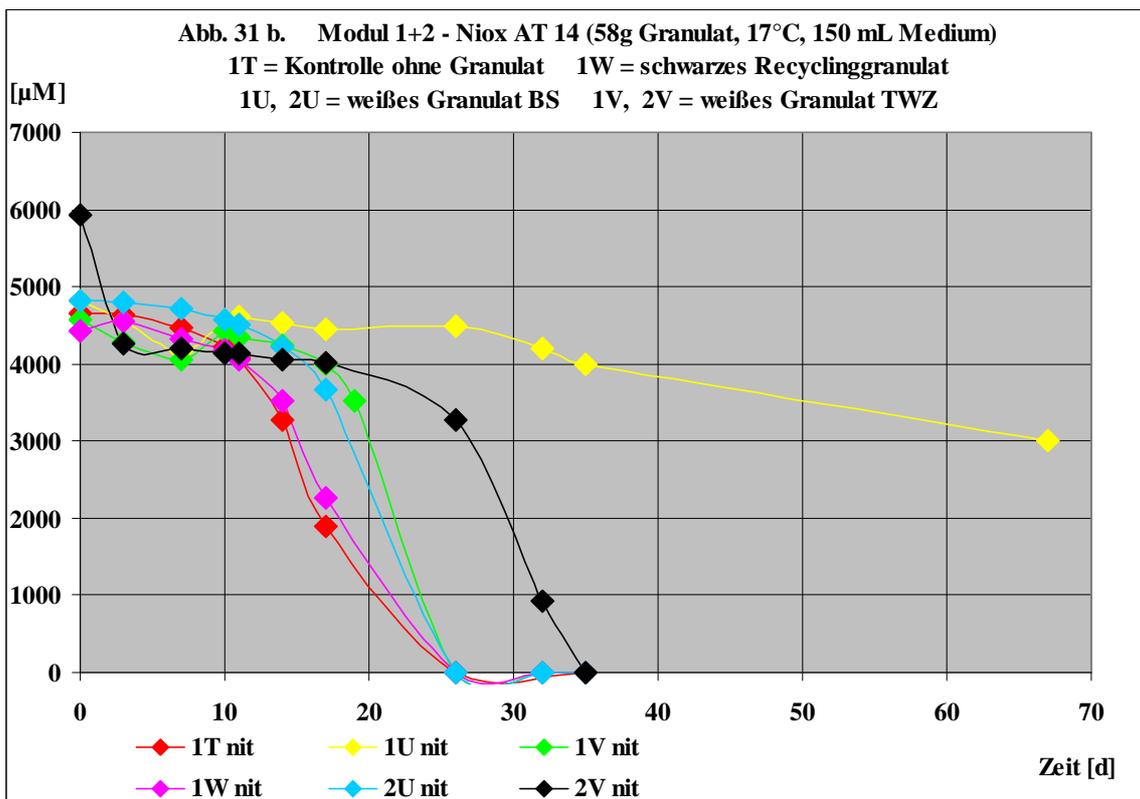
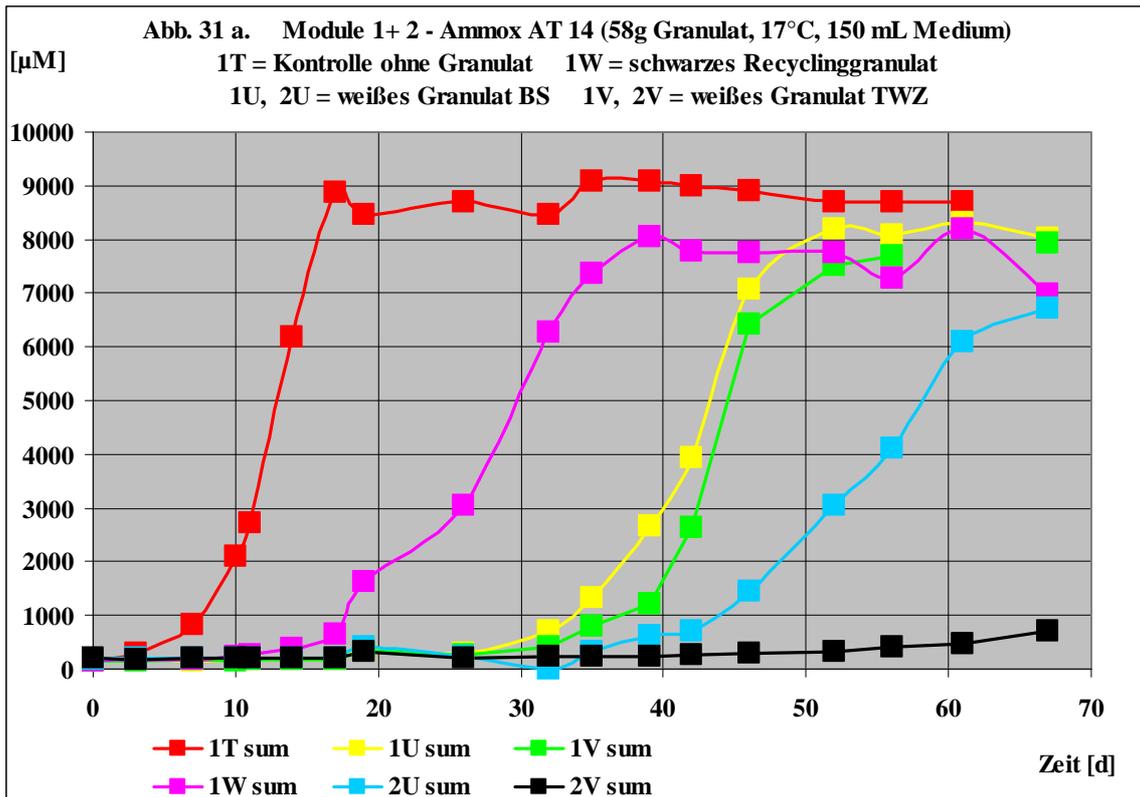


Abb. 31: Wachstum von Ammoniak (a) und Nitrit oxidierenden Bakterien (b) aus den Modulen 1 und 2 in Anwesenheit verschiedener Kunststoffgranulate.

Test 15: Stehender Ansatz

Parallel zu Versuch 14 wurde in einem stehenden Ansatz eine mögliche Hemmwirkung der verschiedenen Granulate getestet, da bekannt ist, dass Nitrifikanten zu Beginn des Wachstums durch eine zu starke Sauerstoffversorgung beeinträchtigt werden. Dies gilt jedoch nicht für hohe Anreicherungen von Ammoniak- und Nitritoxidanten in einem Biofilm (z.B. auf den bewachsenen Füllkörpern). Es wurden jeweils 40 g Granulat in 100 ml Medium eingewogen. Die Proben stammen vom 23.11.06 und der Test begann am 08.12.06.

Im Gegensatz zum geschüttelten Versuch war die Sauerstoffversorgung durch die hohe Einwaage an Granulat weiter erschwert, so dass in einigen Ansätzen eine Denitrifikation beobachtet werden konnte, obwohl der Versuch in mineralischem Medium durchgeführt worden ist. Organische Bestandteile, aus denen Elektronen auf Nitrit oder Nitrat übertragen werden konnten, müssten demnach aus dem abgelösten Biofilmmaterial oder aus den Granulaten selbst stammen. Da aufgrund dieser Stickstoffverluste die Ammoniakoxidation nur unzureichend über die Summe aus Nitrit und Nitrat wiedergegeben werden konnte (Abb. 32b), erfolgte hier zusätzlich eine Messung der Ammoniumkonzentration (Abb. 32a). Durch die geringe Substratkonzentration von 1 mM verlief sowohl die erste als auch die zweite Stufe der Nitrifikation in einem relativ kurzen Zeitraum.

Die ungehemmte Ammoniakoxidation im Kontrollansatz war nach ca. 20 Tagen abgeschlossen (Abb. 32a). Fast zeitgleich verliefen die Kurven des weißen Standard-Granulates BS (G1) mit Zellen aus Modul 1 und 2. Leicht gehemmt waren die beiden Ansätze mit weißem TWZ-Granulat (G3). Überraschenderweise zeigte sich bei diesem Versuch eine deutliche Verzögerung im Ansatz des schwarzen Recycling-Materials (G2). Hier war nach ca. 25 Versuchstagen noch knapp die Hälfte an Ammonium vorhanden. Da in dieser Kultur jedoch weder Nitrit noch Nitrat nachgewiesen werden konnte, muss eine starke Denitrifikation stattgefunden haben. Die Hemmung der Ammoniakoxidanten könnte durch die Konkurrenz mit heterotrophen Bakterien um Sauerstoff verursacht worden sein. Diese sind durch den Energiegewinn der Denitrifikation gefördert worden. Während bei Einsatz des weißen Standardmaterials keine deutlichen Stickstoffverluste zu verzeichnen waren, war dies bei G3 durchaus der Fall, nachdem anfangs die Nitrifikation überwog. Nach 19 Tagen war kein Produkt der Ammoniakoxidation mehr messbar.

Im stehenden Ansatz mit 1 mM als Substrat verlief die Nitritoxidation in Anwesenheit des weißen Standardmaterials (G1) ungehemmt (Abb. 33a). Die Nitratbildungskurven (Abb. 33b) zeigen, dass die Zellen aus Modul 2 etwas schneller wuchsen als die in der Kontrolle und die aus Modul 1 etwas langsamer. Die Nitratbildung war bei beiden Ansätzen verzögert, da hier nach einer anfänglichen Nitritoxidation Denitrifikation einsetzte. Nach Ende des Versuches waren nur noch geringe Mengen an Nitrat nachweisbar. Im Fall des schwarzen Granulates (G2) wurde sogar das Nitrit von Anfang an reduziert, da sich gar kein Nitrat im Kolben wiederfand.

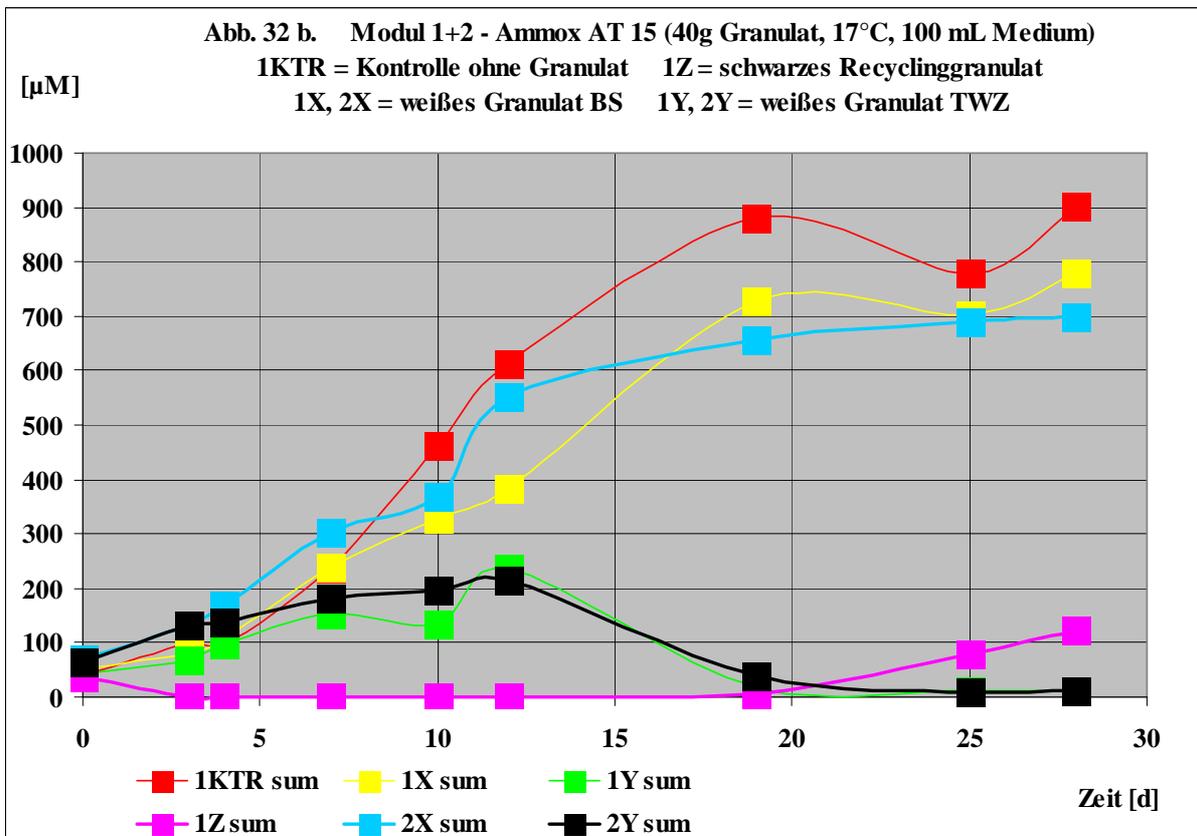
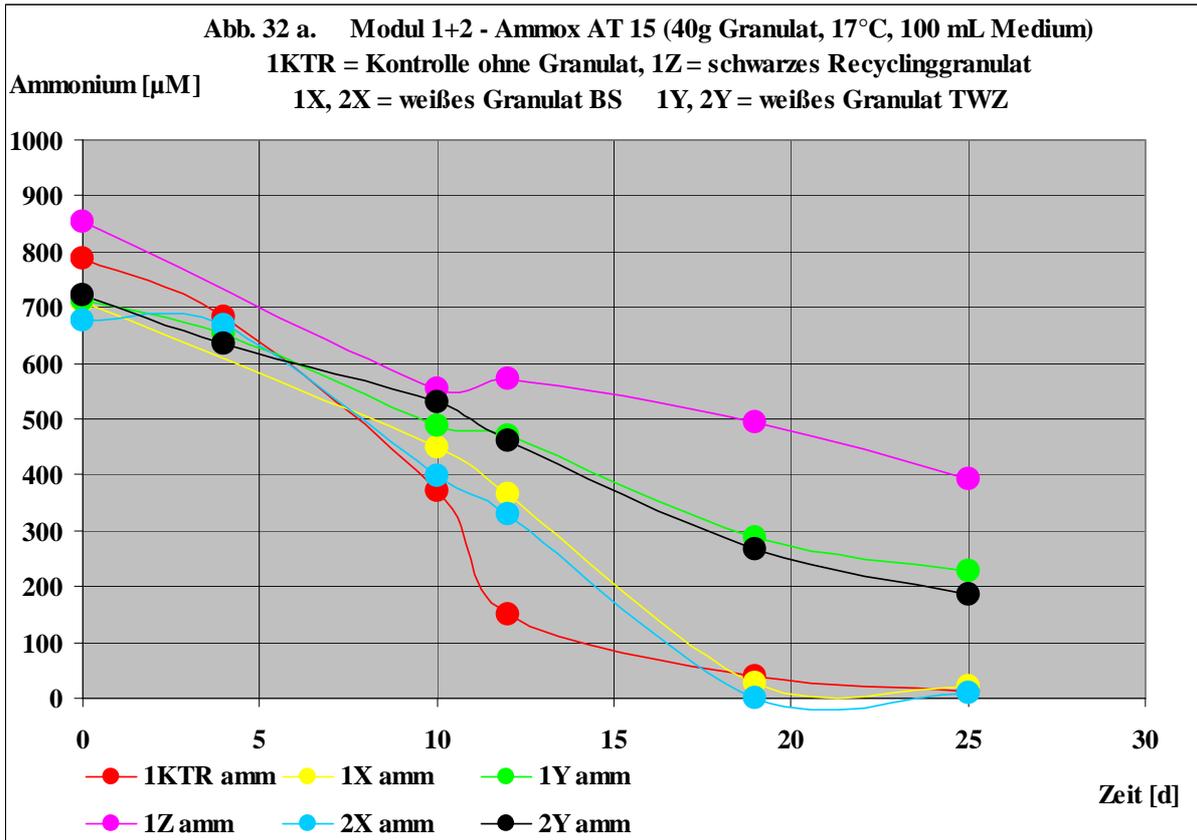


Abb. 32: Wachstum der Ammoniak oxidierenden Bakterien aus Modul 1 und Modul 2 in Anwesenheit verschiedener Kunststoffgranulate, gemessen als Ammoniumabnahme (a) bzw. als Summe von Nitrit und Nitrat (b).

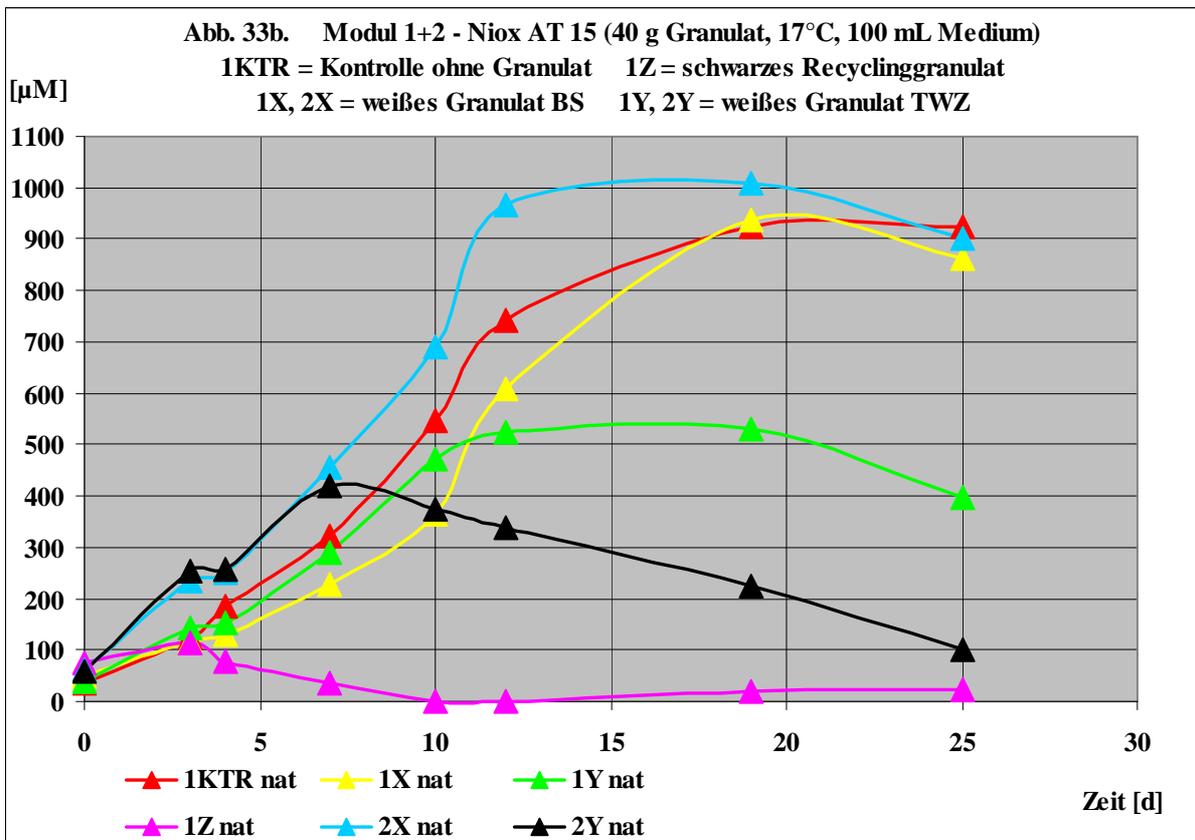
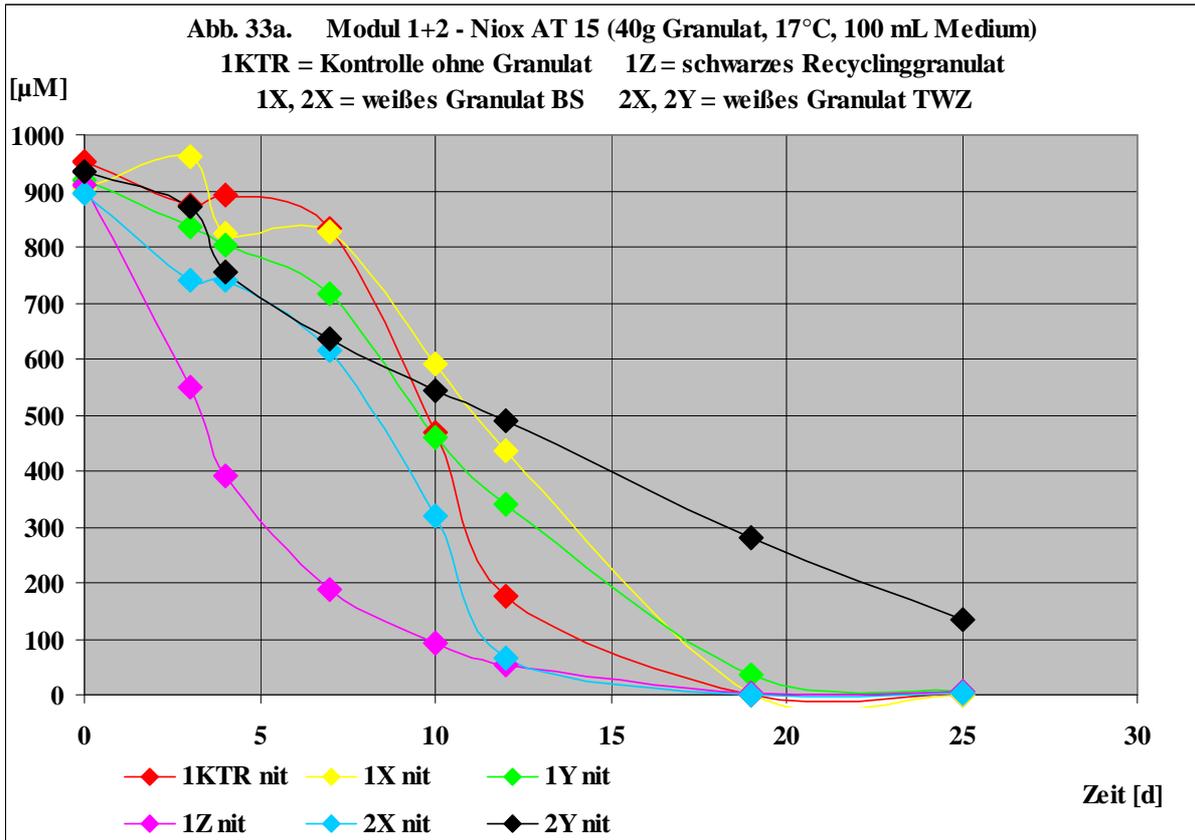


Abb. 33: Wachstum der Nitrit oxidierenden Bakterien aus Modul 1 und Modul 2 in Anwesenheit verschiedener Kunststoffgranulate, gemessen als Nitritabnahme (a) bzw. Nitratzunahme (b).

4 Messung der löslichen Stickstoffverbindungen in der Anlage Büsum (19.10.06)

Die Bestimmung der Stickstoffverbindungen Ammonium, Nitrit und Nitrat im Kreislaufwasser der Fischzuchtanlage ist von großer Bedeutung für das Verständnis der Prozessabläufe sowie für die Erkennung der Möglichkeiten zur Einflußnahme auf die relevanten Parameter für die Optimierung der Effizienz der Gesamtanlage bzw. von wichtigen Teilschritten in der Prozessführung – hier insbesondere die Nitrifikation. Die Nitrifikation im Biofilter ist einer der wichtigsten Prozesse zur Aufrechterhaltung einer für Fische zumindest erträglichen Wasserqualität. Die im System auftretenden Exkretionen (Ausscheidungen) der Fische und die ggf. zurückbleibenden, unverbrauchten Futterreste führen in kurzer Zeit zur Bildung von toxischen Stickstoffverbindungen, deren Akkumulation daher vermieden werden muß.

Es wurde eine Probenahmekampagne über einen 24-Stundenzyklus geplant mit dem Ziel, Zusammenhänge zwischen den Nitrifikationsparametern, dem Fütterungszyklus und eventuell mit dem derzeitigen Fischbesatz aufzuklären. Die Probenahme wurde von Punkt zu Punkt mit einer Zeitverschiebung von jeweils ca. 1 Minute durchgeführt, wobei die Reihenfolge der Einzelpunkte auf den Begehungsplan und nicht auf den logischen Prozessablauf abgestimmt war. Die zeitliche Aufeinanderfolge der Probenahmen wurde ebenfalls in Absprache mit den effektiven Fütterungszyklen korreliert.

Die Beprobungskampagne wurde am 19.10.2006 kurz vor der Nachmittags-Fütterung um 15.30 Uhr begonnen und über 24 Stunden bis vor die entsprechende Nachmittags-Fütterung vom 20.10.2006 fortgeführt. In Absprache mit Herrn Griese wurden in der Anlage insgesamt 24 Probenahmestellen festgelegt, die für die jeweiligen Module 1 und 2 vergleichbare Prozessphasen darstellen. Die Probenahmepunkte sind in den Datentabellen enthalten, bzw. sind in den graphischen Darstellungen der Ergebnisse einzusehen. Die Zeitintervalle zwischen den Beprobungen wurden aufgrund der Sachkenntnis von Herrn Griese in Abstimmung mit der technischen Machbarkeit festgelegt. Der Zeitverlauf ist den Datentabellen bzw. den Graphiken zu entnehmen. Die Beschreibung der Probenahmestellen und die Zuordnung der Proben sind in Tabelle 7 dargestellt, die Meßergebnisse für Ammonium, Nitrit und Nitrat in den Tabellen 8 – 10 im Anhang. Die Zusammenhänge zwischen den Nitrifikationsparametern und dem Fütterungszyklus ist für die beiden Module jeweils getrennt in den Abbildungen 34 - 35 einzusehen.

Zur Übersichtlichkeit wurden Meßwerte von verfahrenstechnisch vergleichbaren Beprobungspunkten mit unterschiedlichen Symbolen gleicher bzw. ähnlicher Farbe dargestellt. Die Beprobungspunkte wurden in zwei Gruppen wie folgt eingeteilt: Zuflüsse in die Fischbecken (hellblau und dunkelblau), Abflüsse aus den Fischbecken (rot und braun). Für diese beiden Gruppen wurden modulweise die arithmetischen Mittelwerte gebildet und in den Abbildungen 36 und 37 dargestellt. Die Fütterungszeitpunkte sind in diesen Graphiken mit großen Symbolen dargestellt.

Zwischen den beiden Modulen besteht der Unterschied darin, dass Modul 1 zu diesem Zeitpunkt einen wesentlich höheren Fischbesatz hatte als Modul 2. Im Einklang damit steht logischerweise der Befund, dass bei Modul 1 eine höhere Ammonium-Belastung mit Werten zwischen 14-37 μM Ammonium vorliegt als bei Modul 2 mit nur 9-18 μM . Diese Zahlenangaben stellen die maximale Spannweite zwischen eingehenden und abgehenden Wässern (bezogen auf die Fischbecken) dar. Diese Spannweite variiert im Tagesverlauf in Abhängigkeit vom Fütterungszyklus.

Aufgrund der Mittelwerte für Ammonium (siehe Abb. 36 und 37) betragen die Abbauleistungen im Biofilter des Moduls 1 maximal 18 μM pro Durchlauf und in Modul 2 nicht mehr als 8 μM pro Durchlauf. Dies ist hauptsächlich zu den Halbzeiten zwischen zwei Fütterungen der Fall.

Tabelle 7:

Nummerierung und Beschreibung der Probenstellen und Reihenfolge in der graphischen Darstellung der Ergebnisse (Zwecks Erleichterung und Übersichtlichkeit der Darstellung für Modul 2 wurden „Frischwasser“ als Kopie eingefügt sowie ein „dummy“ ohne Bedeutung).

Probenahme-Nr.	Modul	Probenstelle	Beschreibung	Anmerkung	Reihen-Nr. in Graphik	Name in Graphik
1	1	Becken 10	Abfluß	große Fische	11	Abfl. 1B10 gF
2	1	Becken 8	Abfluß	mittlere Fische	10	Abfl. 1B8 mF
3	1	Becken 7	Abfluß	kleine Fische	9	Abfl. 1B7 kF
4	1	Meereswasser	aus Abschäumer	Ozoniert	1	Frischwasser
5	1	Pumpensumpf		vor O ₂ -Anreicherung	5	Pumpensumpf 1
6	1	Sedimenter	Abfluß	Ozoniert	4	Abfl. Sedimenter 1 (O ₃)
7	1	Biofilter	Abfluß		2	Abfl. Biofilter 1
8	1	Abfluß-Sammler		vor Trommelfilter	12	Abfluss-Sammler 1
9	1	Biofilter	Zufluß	nach Trommelfilter	13	Zufl. Biofilter 1
10	2	Sedimenter	Abfluß		4	Abfl. Sedimenter 2
11	2	Biofilter	Abfluß		2	Abfl. Biofilter 2
12	2	Becken 6	Zufluß		6	Zufl. 2B6
13	1	Becken 7	Zufluß	kleine Fische	6	Zufl. 1B7 kF
14	2	Becken 7	Zufluß		7	Zufl. 2B7
15	2	Becken 8	Zufluß		8	Zufl. 2B8
16	1	Becken 8	Zufluß	mittlere Fische	7	Zufl. 1B8 mF
17	1	Becken 10	Zufluß	große Fische	8	Zufl. 1B10 gF
18	2	Becken 8	Abfluß		11	Abfl. 2B8
19	2	Becken 7	Abfluß		10	Abfl. 2B7
20	2	Becken 6	Abfluß		9	Abfl. 2B6
21	2	Abfluß-Sammler		vor Trommelfilter	12	Abfluss-Sammler 2
22	2	Biofilter	Zufluß	nach Trommelfilter	13	Zufl. Biofilter 2
23	2	Pumpensumpf		vor O ₂ -Anreicherung	5	Pumpensumpf 2
24	1	Sedimenter	Überlauf		3	Überl. Sedimenter 1
dummy	2	Sedimenter	Überlauf		3	dummy
Kopie	2	Meereswasser	aus Abschäumer	ozoniert	1	Frischwasser

Zwischen den Nitritgehalten der eingehenden und abgehenden Wässern wurden keine nennenswerten Differenzen festgestellt, d.h. die Biofilter wirken dermaßen, dass nur im Ammoniumgehalt der eingehenden und abgehenden Prozesswässer eine Abbauleistung messbar ist. Allerdings ist das Nitrit-Level in Modul 1 mit Werten zwischen 25-43 μM höher als in Modul 2 mit nur 15-30 μM .

Die Nitratgehalte der eingehenden und abgehenden Wässer sind praktisch konstant und in beiden Modulen etwa gleich hoch (ca. 6500 bzw. 6000 μM).

Für die Umrechnung der Konzentrationsangaben von [μM] in [mg/L] müssen die Zahlenwerte für Ammonium durch 55,5, für Nitrit durch 21,7 und für Nitrat durch 16,1 geteilt werden.

Wir empfehlen jedoch zwecks Übersichtlichkeit die Angaben in [μM] zu benutzen, da die stoichiometrischen Umwandlungen Ammonium zu Nitrit bzw. zu Nitrat jeweils 1:1 stattfinden.

Die Konzentrationsangabe in [μM] entspricht eigentlich der umständlicheren Berechnung der in [mg/L] ausgedrückten Konzentrationen von Ammonium-Stickstoff ($\text{NH}_3\text{-N}$), Nitrit-Stickstoff ($\text{NO}_2\text{-N}$) bzw. Nitrat-Stickstoff ($\text{NO}_3\text{-N}$).

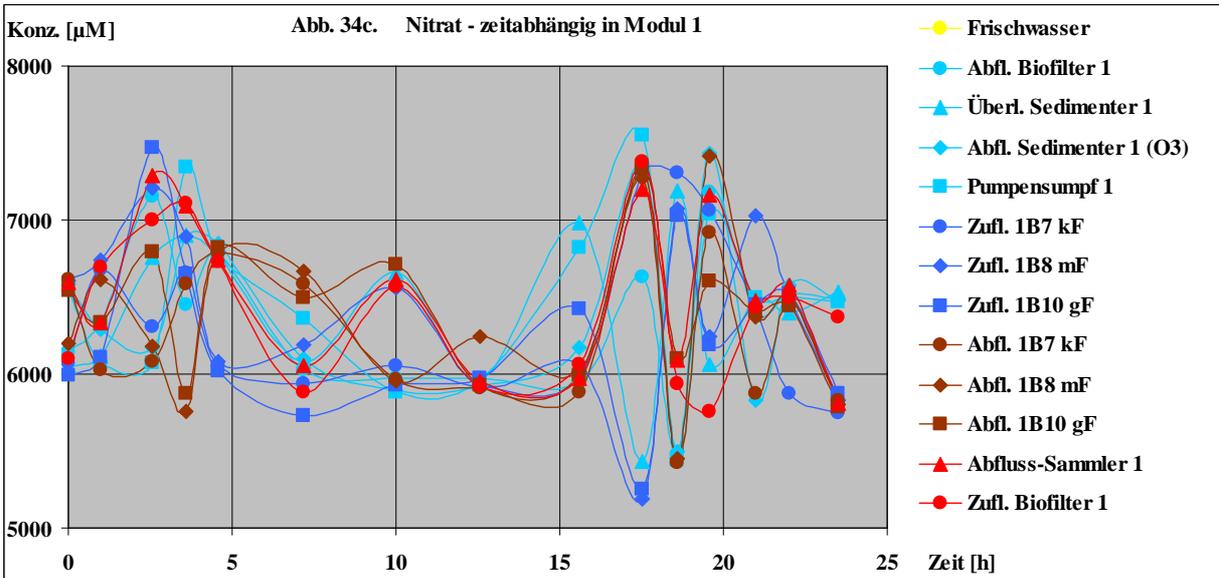
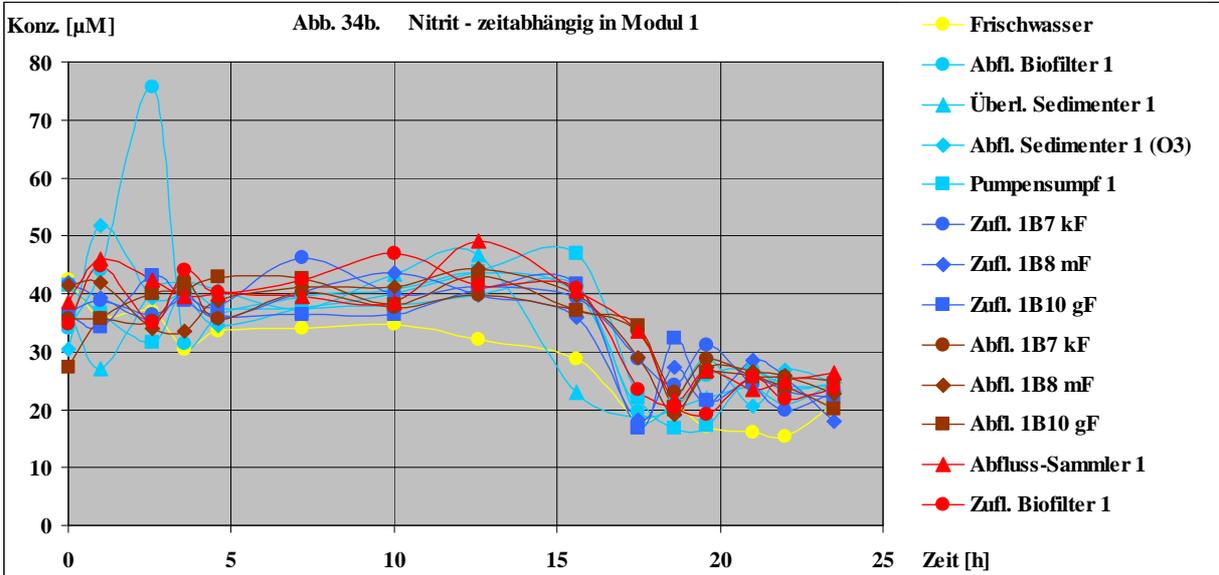
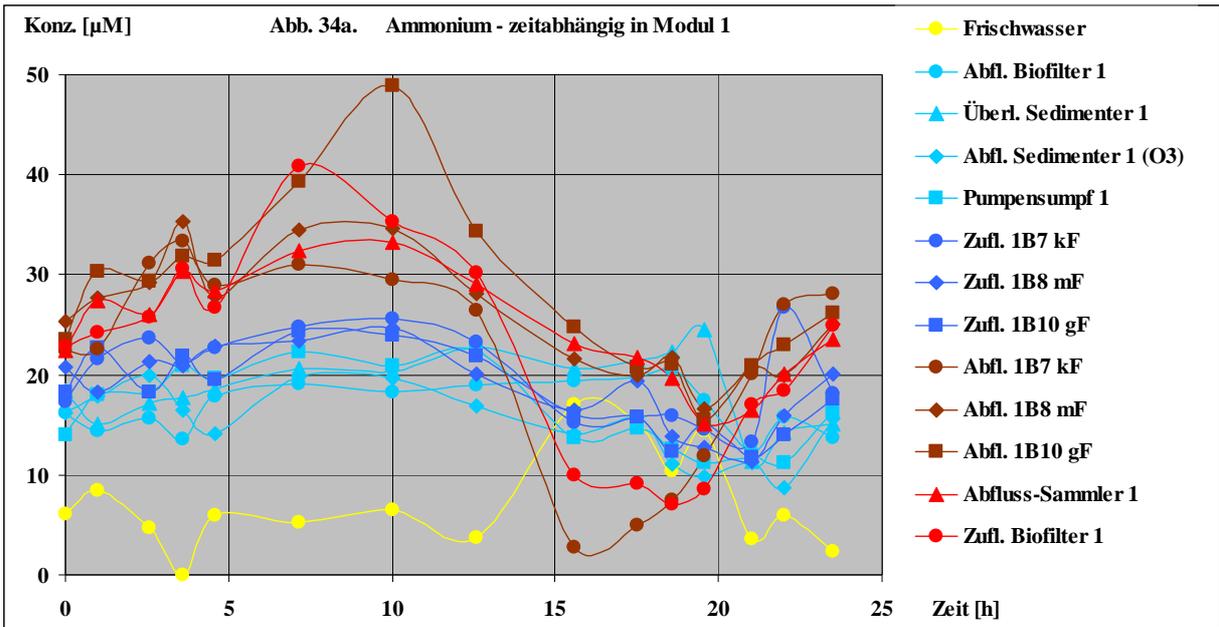


Abb. 34: Modul 1, Messwerte für Ammonium (a), Nitrit (b) und Nitrat (c, Frischwasser siehe in Abb. 36c.)

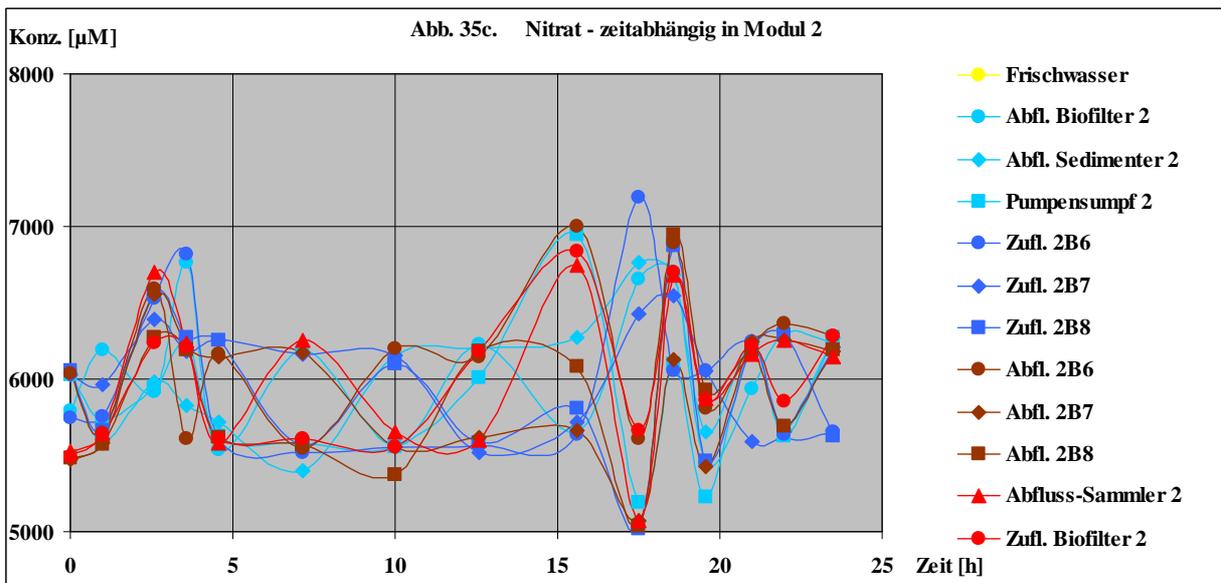
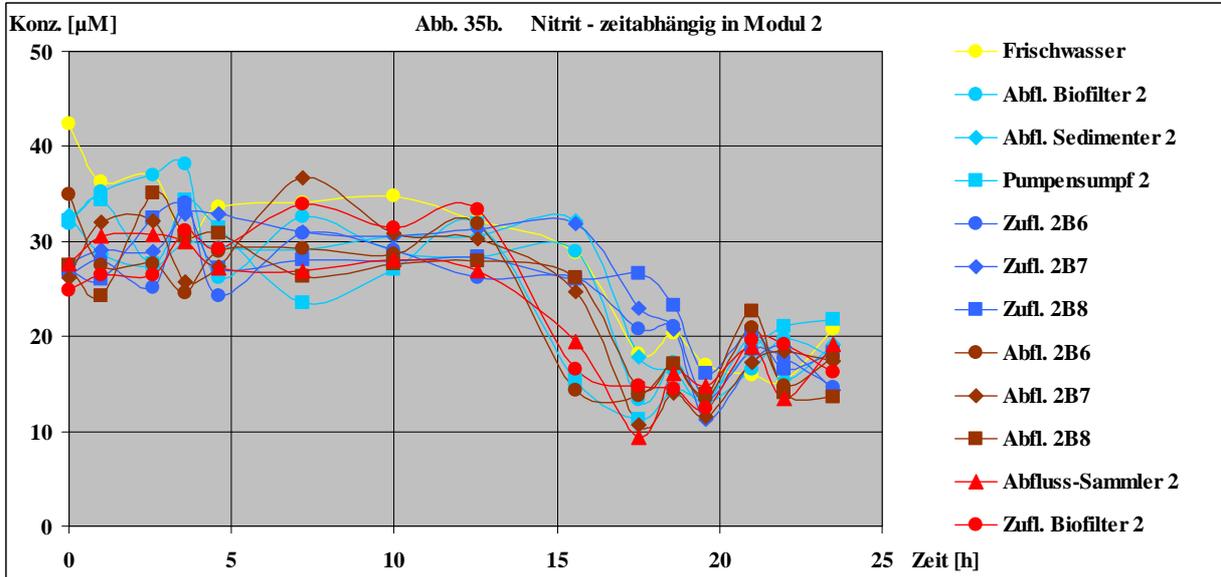
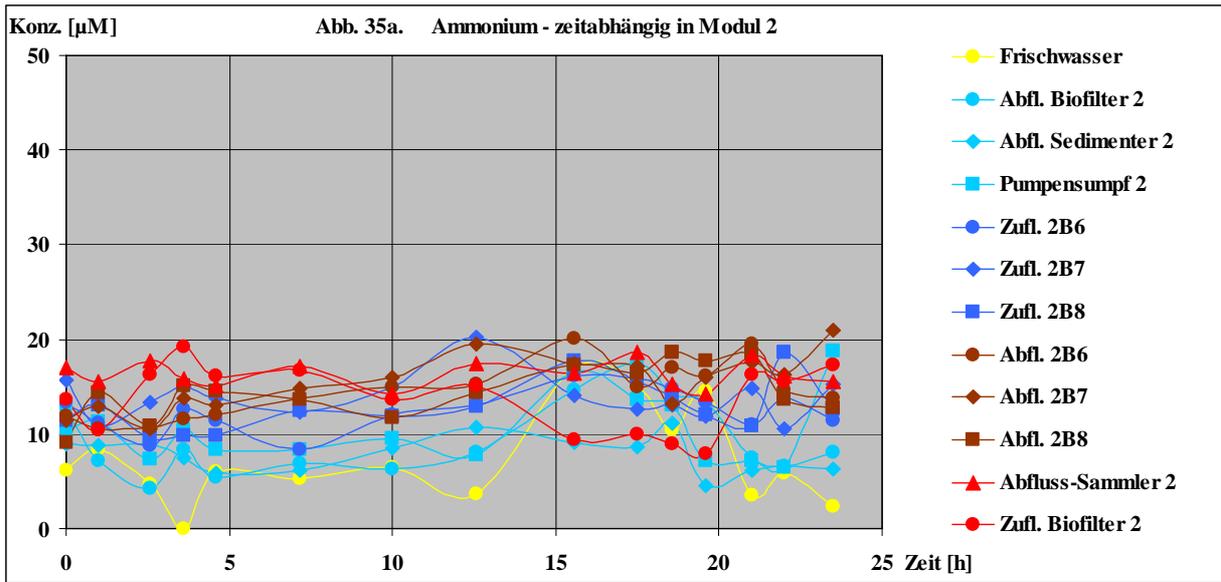


Abb. 35: Modul 2, Messwerte für Ammonium (a), Nitrit (b) und Nitrat (c, Frischwasser siehe in Abb. 37c.).

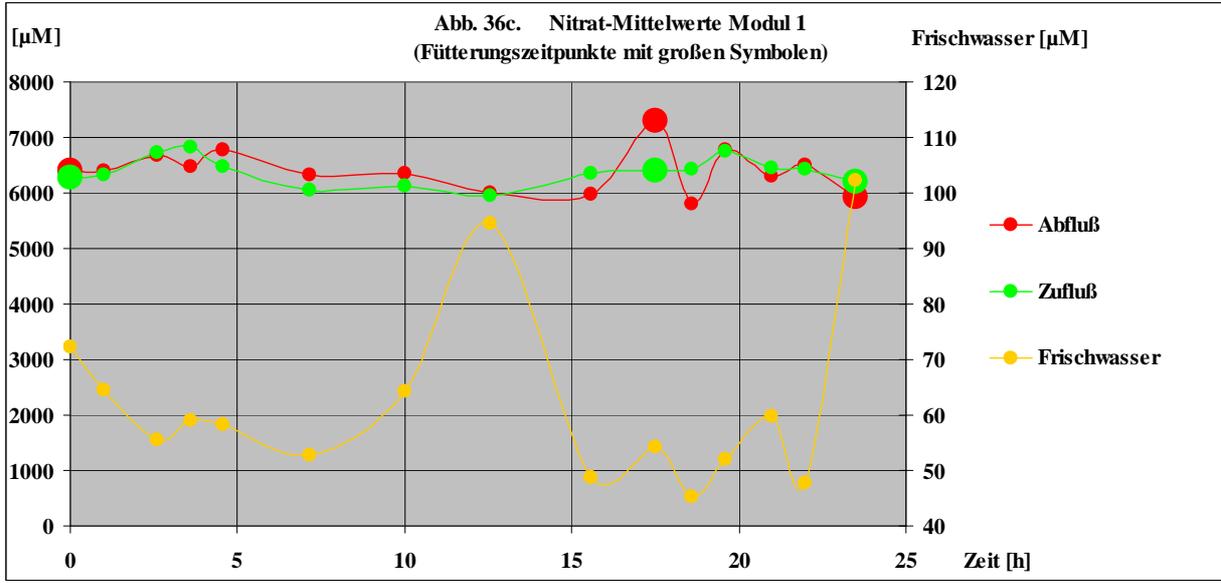
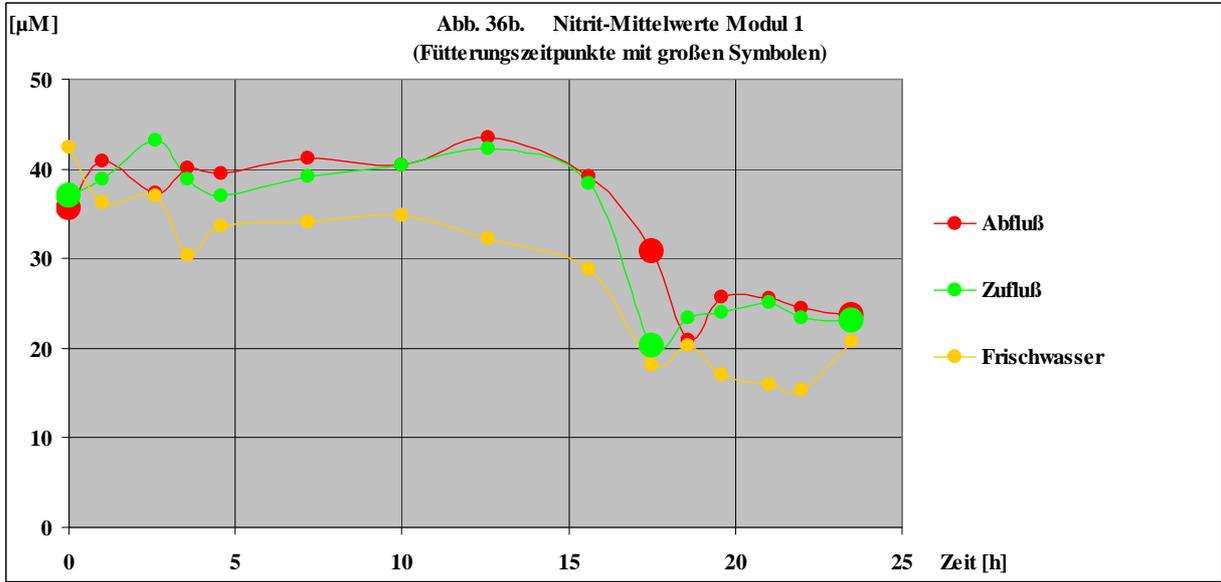
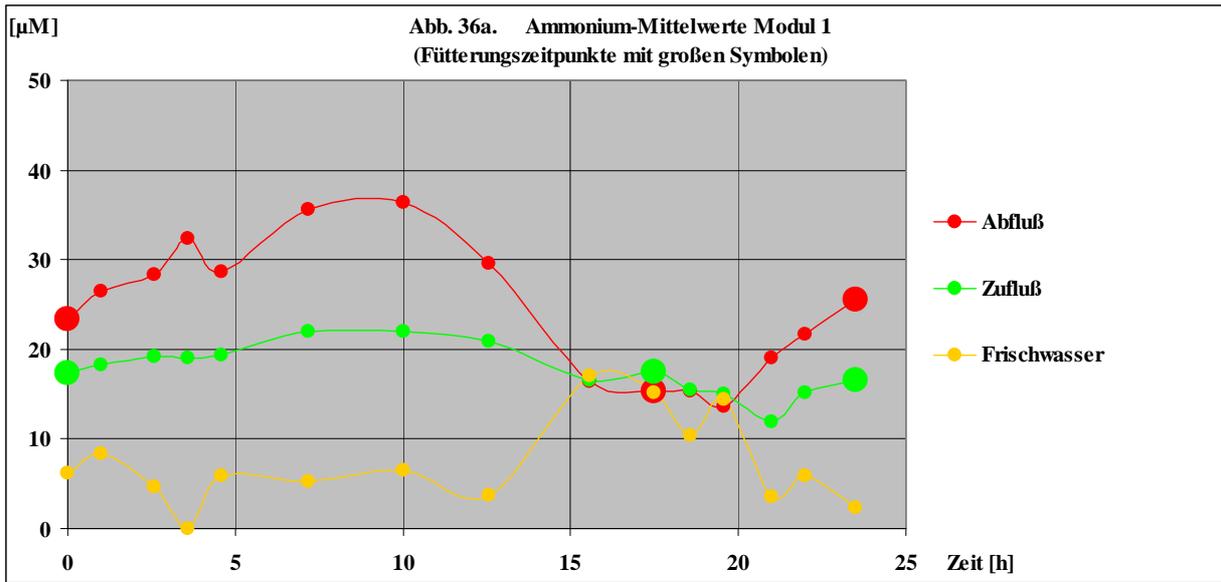


Abb. 36: Modul 1, arithmetische Mittelwerte für Ammonium (a), Nitrit (b) und Nitrat (c).

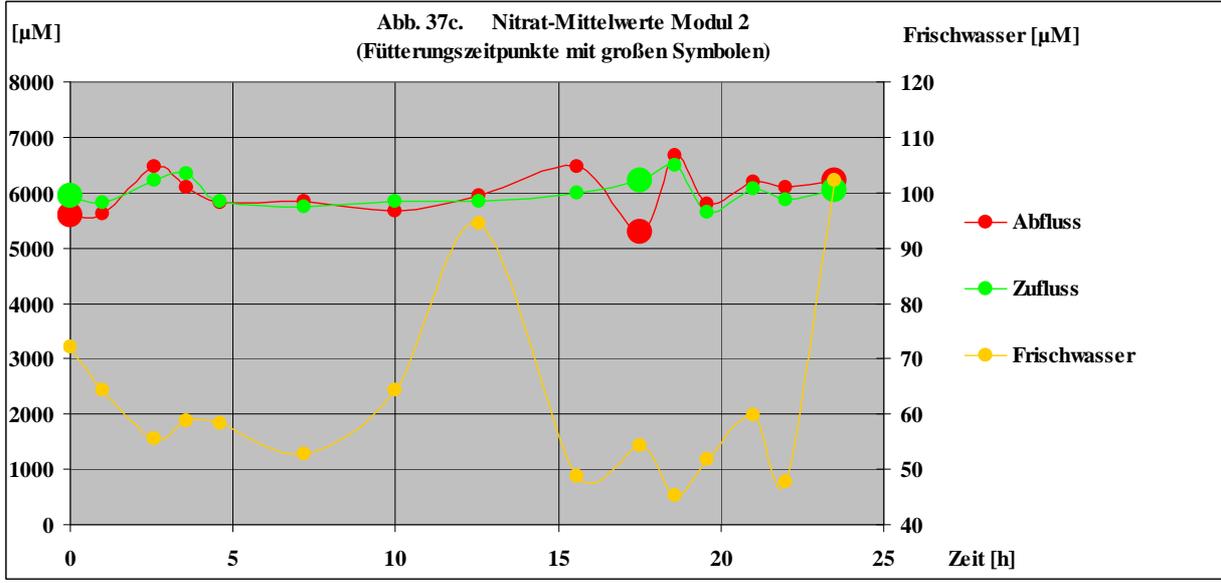
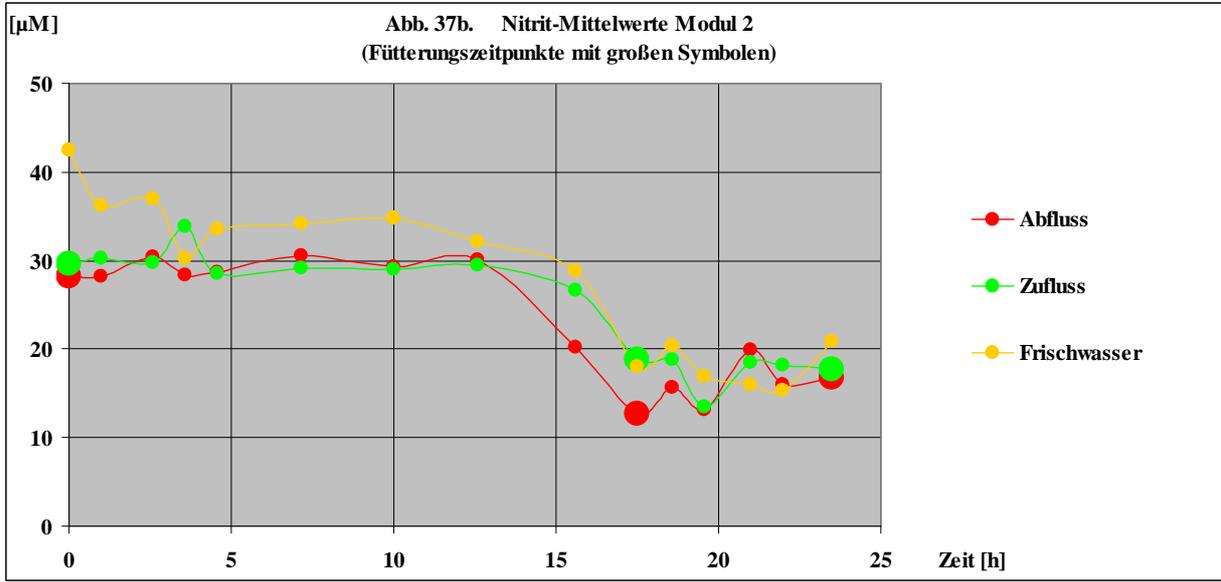
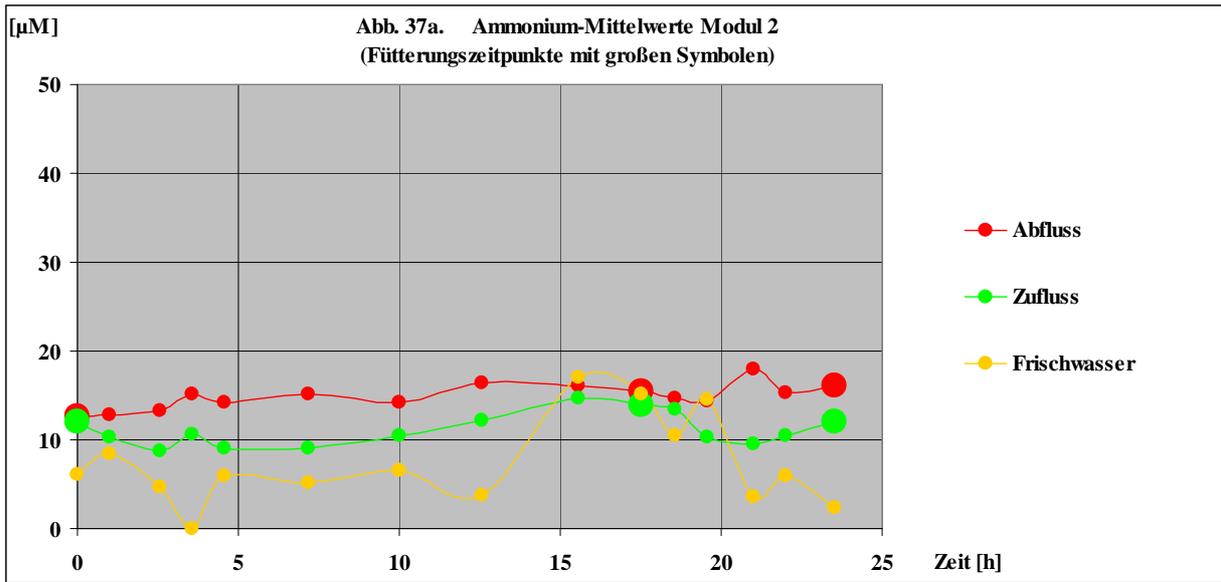


Abb. 37: Modul 2, arithmetische Mittelwerte für Ammonium (a), Nitrit (b) und Nitrat (c).

5 Ergebnisse der Betriebsmessungen am Kreislauf Büsum

Die Abbildungen 38 bis 41 zeigen die Ergebnisse der Untersuchungen der Wasserqualität der Seewasserkreisläufe der Steinbuttfarm in Büsum.

Die beiden Module unterscheiden sich insbesondere durch den besatzbedingten höheren Futtereintrag in Modul 2. Hier lag das Jahresmittel bei 38 kg gegenüber 12,8 kg in Modul 1. Bei Betrachtung der Wasserparameter wird ersichtlich, dass die Konzentrationen von Ammonium in beiden Modulen vergleichbar waren, im Mittel 0,5 mg/L. Die Nitritkonzentrationen lagen in den letzten Monaten des Jahres 2005 bis in den Sommer 2006 trotz geringerer Fütterung in Modul 1 höher als in Modul 2.

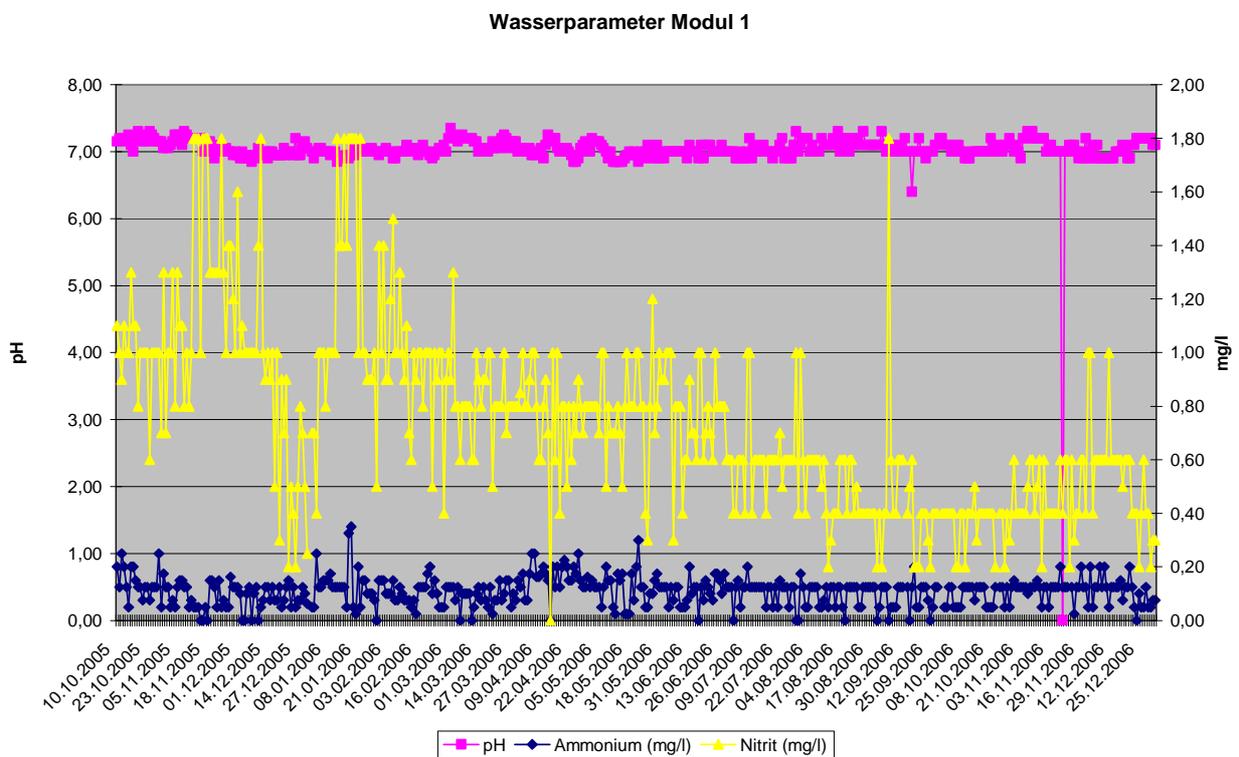


Abb. 38: Wasserparameter der Steinbuttfarm Büsum, Modul 1

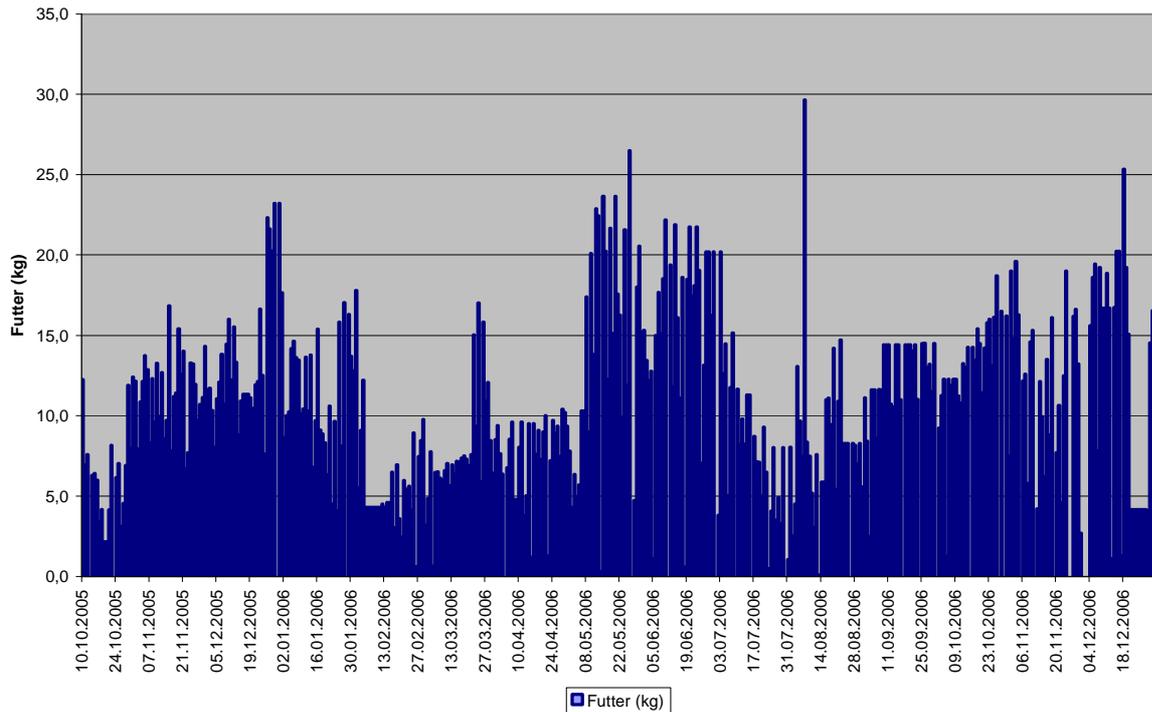


Abb. 39: Tägliche Futtermengen zur Fütterung des Steinbuttbesatzes – Modul1

Wasserparameter Modul 2

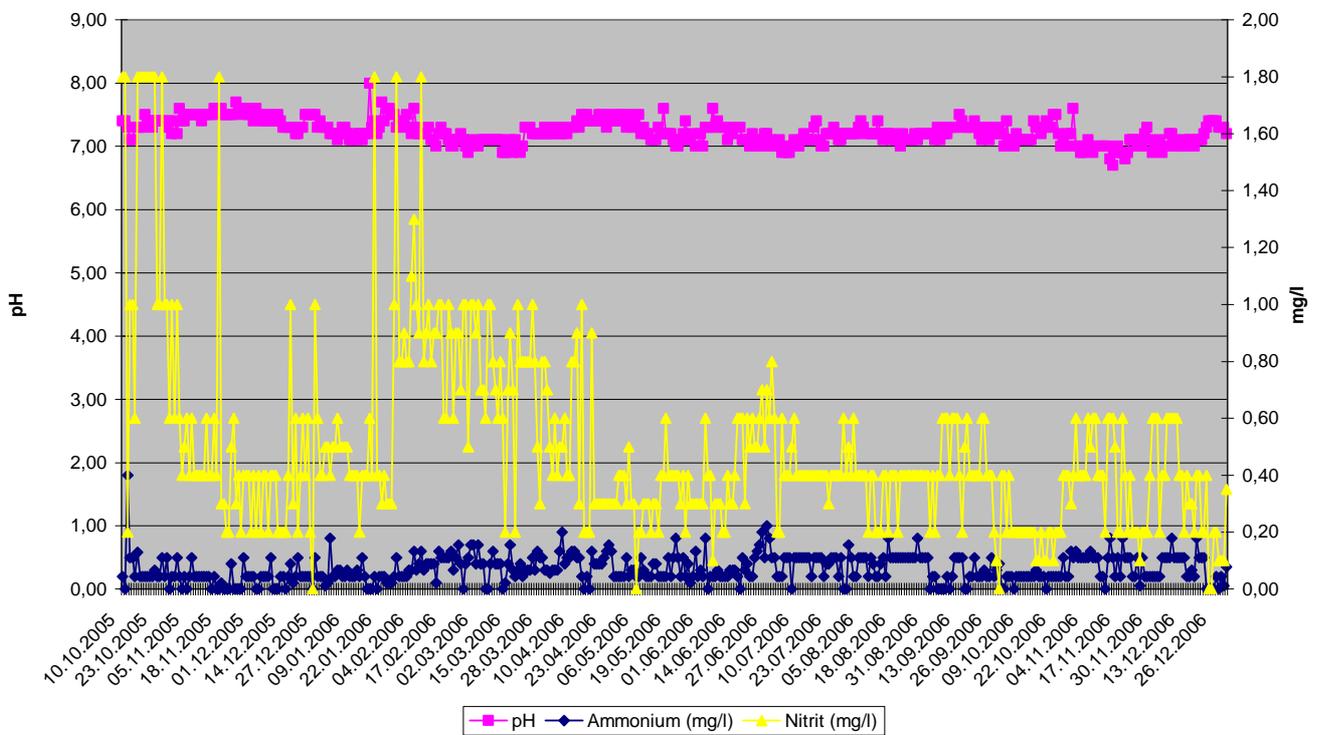


Abb. 40: Wasserparameter der Steinbuttfarm Büsum, Modul 2

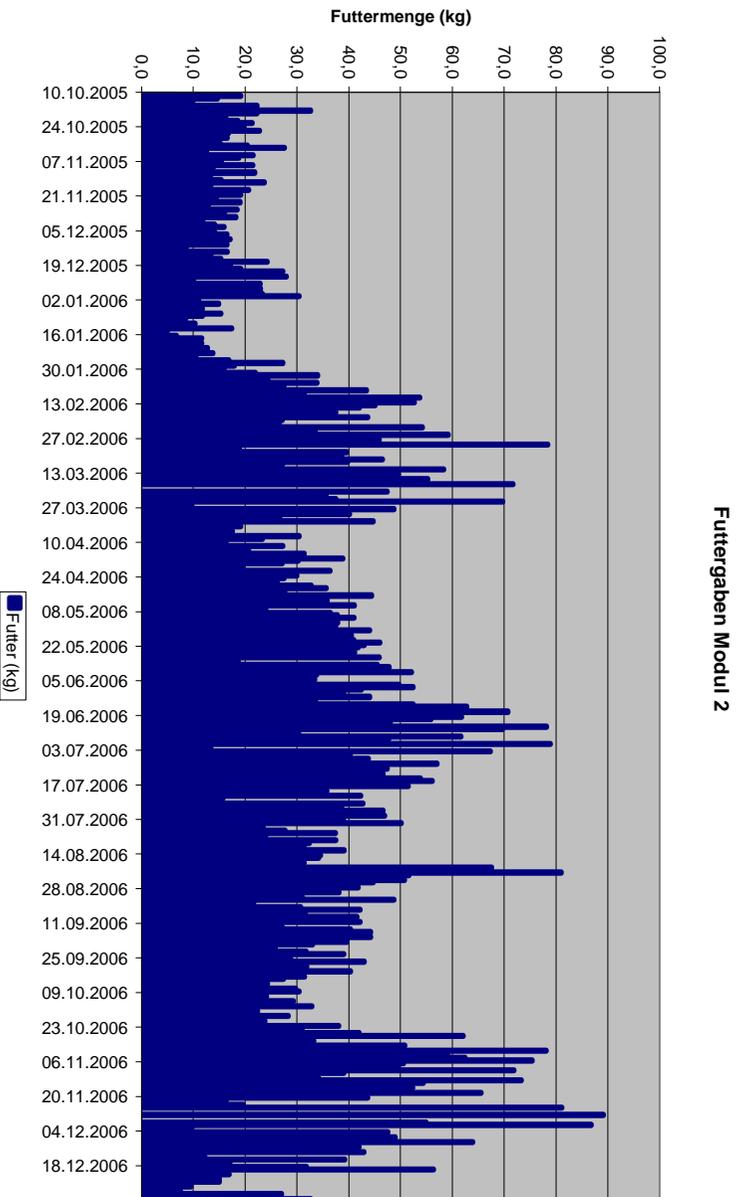


Abb. 41: Tägliche Futtermengen zur Fütterung des Steinbuttbesatzes – Modul2

6 Ergebnisse Vergleichstests Biocarrier/Füllkörper

6.1 Ergebnisse der Pilotversuche zur Erstbesiedlung

In den folgenden Grafiken sind die Ergebnisse der Startphase der Biofilter und der Aufbau der Nitrifikationsfähigkeit der verschiedenen Füllkörpermaterialien dargestellt. Die Biofilter wurden gemeinsam mit Ammoniumchlorid „gefüttert“, d.h. die Konzentrationen waren in allen Biofiltern gleich. Die Fischbecken waren in diesem Zeitraum noch nicht besetzt. Am 10.10.2006 wurden die Beutel mit dem Inokulum entfernt.

Die Grafiken zeigen die unterschiedliche Entwicklung der Abbaufähigkeit für Ammonium und Nitrit nach der Zudosierung von Ammoniumchlorid als Stickstoffquelle. Während die mikrobielle Aktivität auf den Füllkörpern der Typen E1 und E3 in den Biofiltern 1/6 und 3/8 so hoch war, dass die N-Gaben ohne wesentliche Änderung in den NH_4^+ und NO_2^- Konzentrationen abgebaut wurden, zeigten die übrigen Biocarrier ein anderes Bild: bei den Granulaten E2 und E5 etwas abgeschwächt auch bei E4 führten die Zugaben zu einem Aufschaukeln der Ammoniumkonzentrationen. Insbesondere nach Zugabe von 2x3 mg Ammoniumchlorid innerhalb von 3 Tagen stiegen die Werte auf $> 3 \text{ mg NH}_4/\text{L}$ ($166 \mu\text{M}$) und der Abbau benötigte ca. 8 Tage, um wieder die Grundwerte von $< 0,5 \text{ mg NH}_4/\text{L}$ ($28 \mu\text{M}$) zu erreichen.

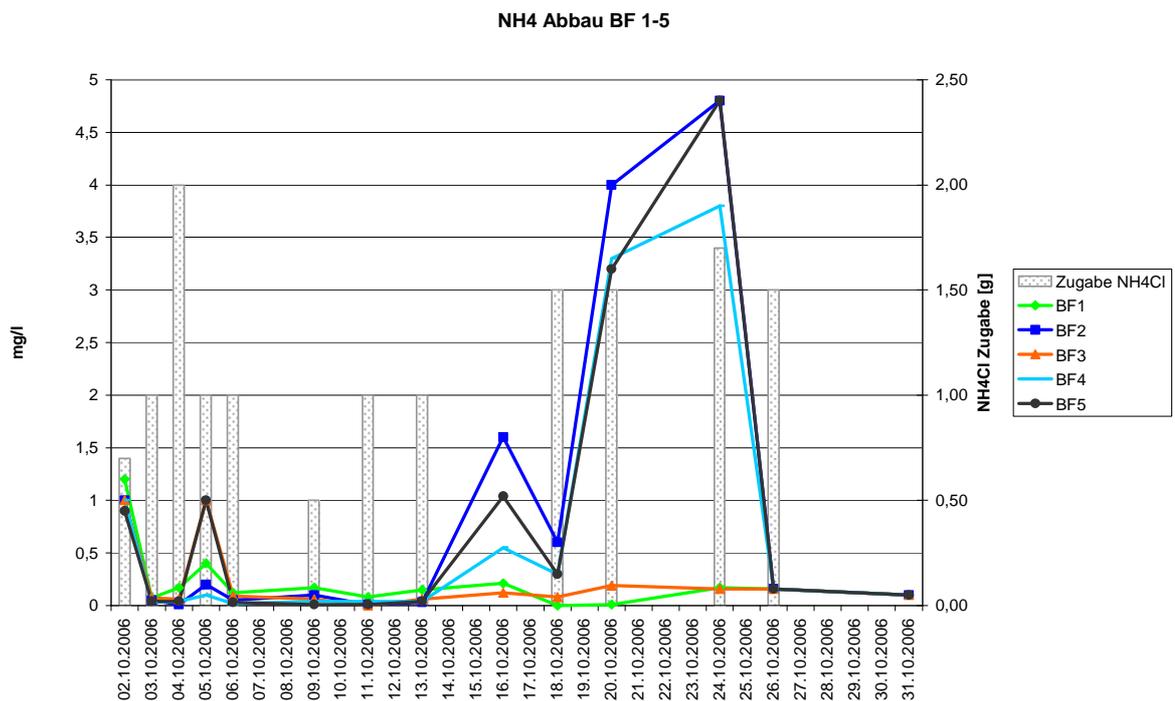


Abb. 42: NH₄-Abbau während der Startphase Biofilter 1 bis 5
 BF 1 = 2H weiss / BF 2 = Curler / BF 3 = 2H schwarz / BF 4 = 2H Helix /
 BF 5 = Kaldnes

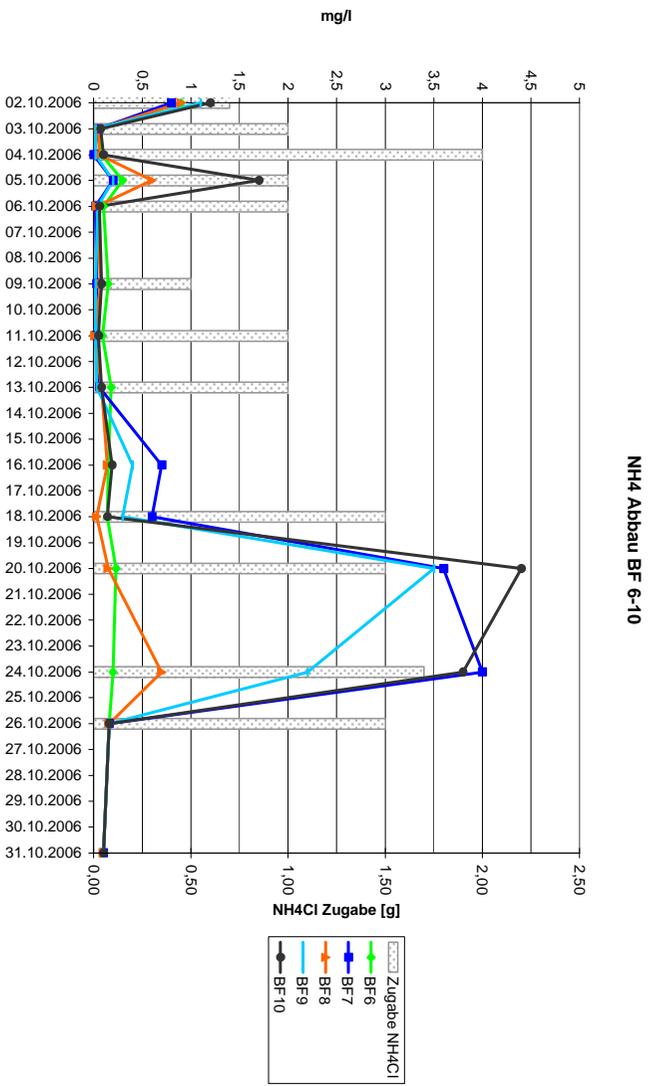


Abb. 43: NH4 Abbau während der Startphase: Biofilter 6 bis 10
 BF 6 = 2H weiss / BF 7 = Curler / BF 8 = 2H schwarz / BF 9 = 2H Helix /
 BF 10 = Kaldnes

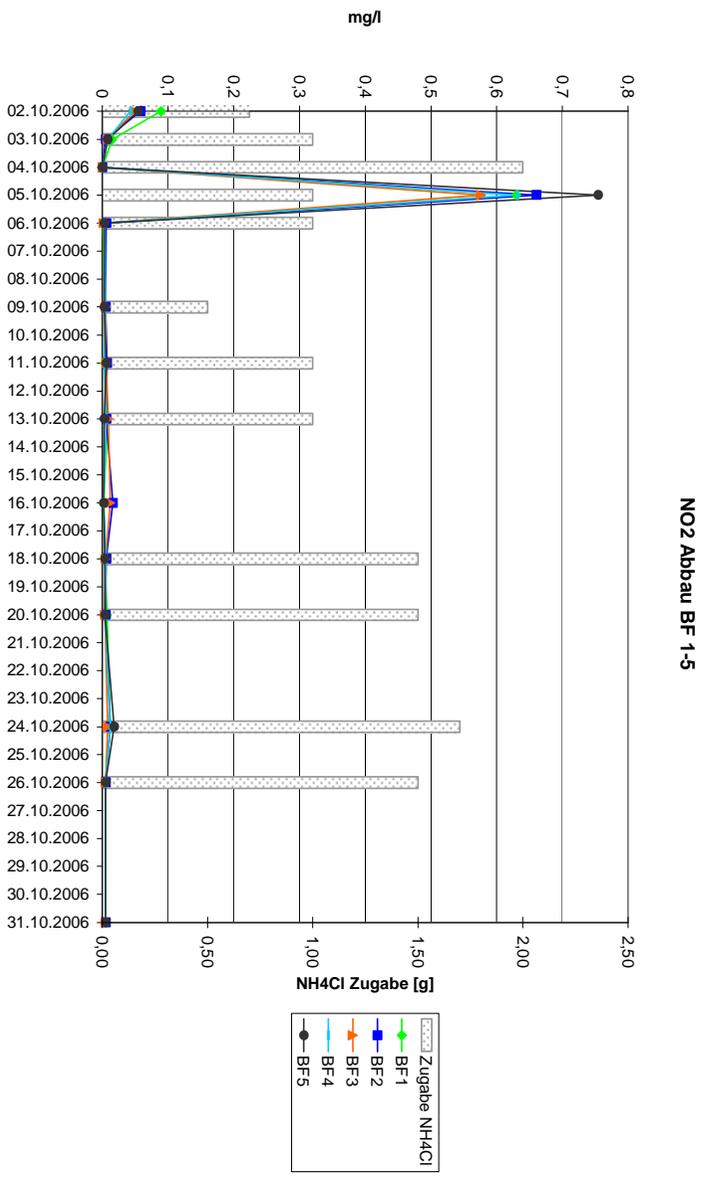


Abb. 44: NO₂⁻ Abbau während der Startphase. Biofilter 1 bis 5
 BF 1 = 2H weiss / BF 2 = Curler / BF 3 = 2H schwarz / BF 4 = 2H Helix /
 BF 5 = Kaldnes

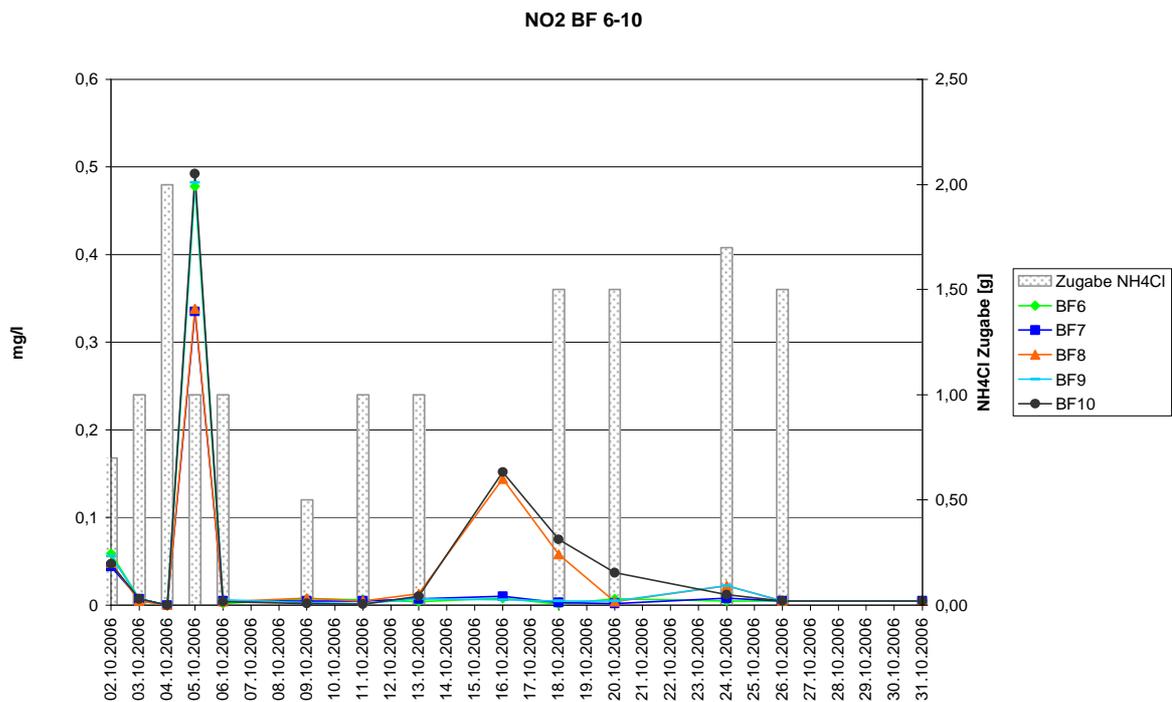


Abb. 45: NO₂⁻ Abbau während der Startphase. Biofilter 6 bis 10
 BF 6 = 2H weiss / BF 7 = Curler / BF 8 = 2H schwarz / BF 9 = 2H Helix /
 BF 10 = Kaldness

6.2 Ergebnisse der „Belastungsversuche“ unterschiedlicher Biocarrier

Im weiteren Verlauf der Vergleiche unterschiedlicher marktgängiger Biofilter-Füllkörper wurden die Abbaukapazitäten einzelner Füllkörper untersucht. Zusätzlich zu der Belastung aus den Fischbecken wurde zu den Biofilter eine definierte Menge Ammoniumchlorid zugegeben und die Konzentrationen von Ammonium und Nitrit in Abständen von 2 Stunden gemessen.

Für die grafische Darstellung wurde für jedes getestete Material je 1 Biofilter ausgewählt. Für den Abbau von Ammonium zu Nitrit zeigen sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Biocarriern. Eher weist in dieser Versuchsphase das Material E4 die höchste Nitrifikationsfähigkeit auf, obwohl es in der Anfangsphase weniger schnell die Leistungen erreichte.

Ein differenzierteres Bild zeigt sich beim Abbau des Nitrit zu Nitrat. Bei beiden Zugabekonzentrationen baute das „klassische“ Material E3 die zugegebenen N-Mengen weniger gut ab als die übrigen Füllkörper. Der Biocarrier E4 baut auch das Nitrit schneller ab als die übrigen untersuchten Füllkörper.

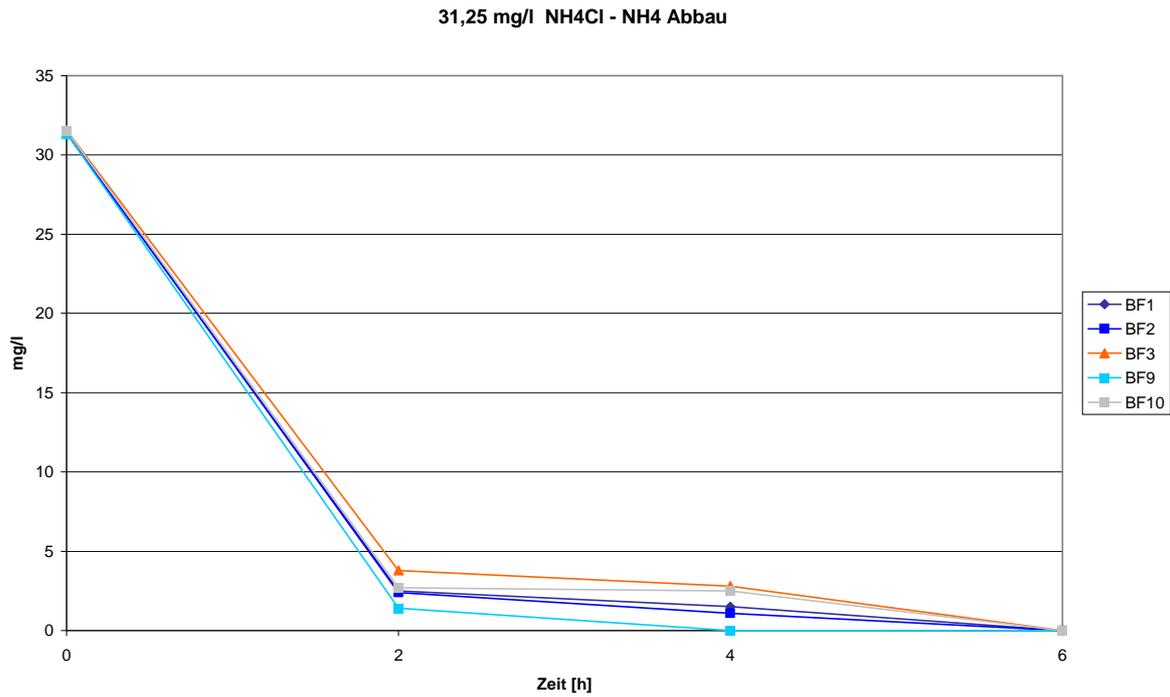


Abb. 46: NH₄ Abbau nach Belastung mit 5g NH₄Cl.
 BF 1 = 2H weiss / BF 2 = Curler / BF 3 = 2H schwarz / BF 9 = 2H Helix /
 BF 10 = Kaldness

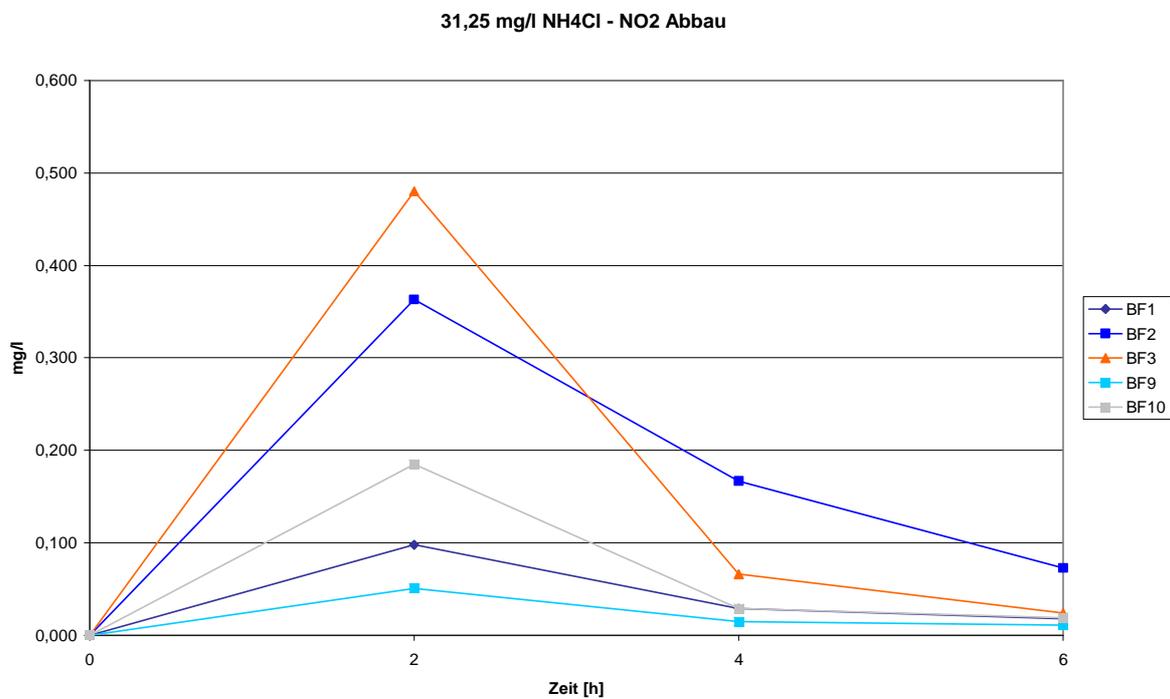


Abb. 47: NO₂⁻ Abbau nach Belastung mit 5g NH₄Cl.
 BF 1 = 2H weiss / BF 2 = Curler / BF 3 = 2H schwarz / BF 9 = 2H Helix /
 BF 10 = Kaldness

62,5 mg/l NH₄Cl - NH₄ Abbau

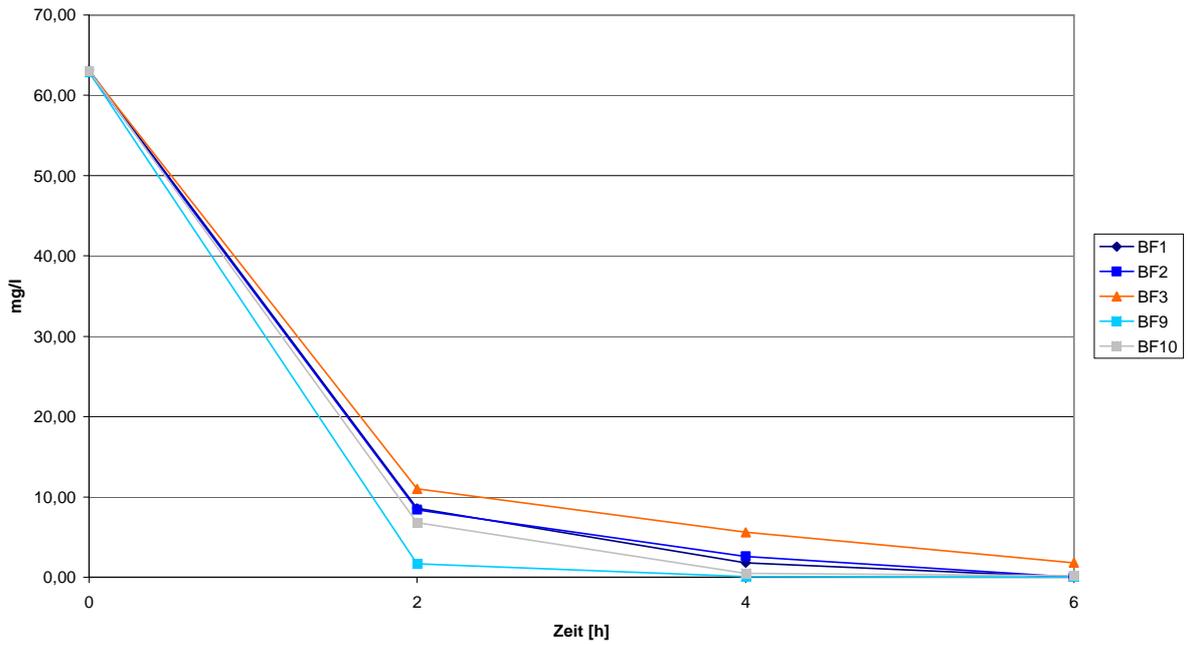


Abb. 48.: NH₄ Abbau nach Belastung mit 10g NH₄Cl
 BF 1 = 2H weiss / BF 2 = Curler / BF 3 = 2H schwarz / BF 9 = 2H Helix /
 BF 10 = Kaldness

62,5 mg/l NH₄Cl - NO₂ Abbau

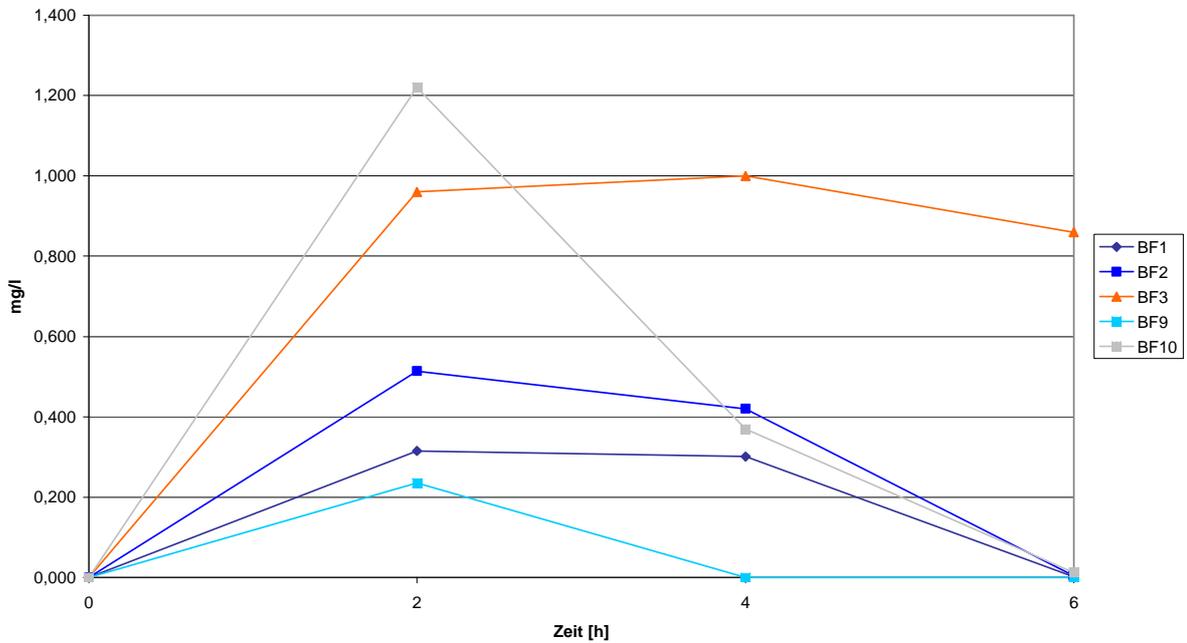


Abb. 49.: NO₂⁻ Abbau nach Belastung mit 10g NH₄Cl
 BF 1 = 2H weiss / BF 2 = Curler / BF 3 = 2H schwarz / BF 9 = 2H Helix /
 BF 10 = Kaldness

7 Diskussion

In zahlreichen Beprobungen der Biofilter aus der Ecomares-Anlage in Büsum wurden umfangreiche chemische und mikrobiologische Untersuchungen durchgeführt, um sich ein Bild vom Nitrifikationsprozess machen zu können. Dazu gehörten nicht nur die Quantifizierung und Identifizierung der dominierenden Ammoniak- und Nitritoxidanten, sondern auch die Kultivierung dieser Organismen für weiterführende physiologische Untersuchungen.

7.1 Quantifizierung und Kultivierung

Mit der MPN-Quantifizierungsmethode konnten pro Füllkörper 10^5 Zellen von Ammoniak und 10^5 Zellen von Nitrit oxidierenden Bakterien nachgewiesen werden. Dabei muss beachtet werden, dass die absoluten Zellzahlen um den Faktor 100-1000 zu niedrig sein können, da die Nitrifikanten in Mikrokolonien existieren und diese als einzelne Zellen gezählt werden, wenn sie nicht vereinzelt werden können. Das Schütteln mit Glaskugeln erwies sich jedoch als sehr hilfreich, da besonders die Nitritoxidanten vereinzelt werden konnten, ohne dass die Zellen abgetötet worden wären.

Die Resultate der Kultivierungsansätze zeigen, dass entweder terrestrische und halophile Nitrifikanten zusammen in den Biofiltern vorkommen oder dass die Ammoniak- und Nitritoxidanten nur halotolerant und nicht halophil sind. Hinsichtlich der Substrattoleranz lässt sich sagen, dass die Organismen an hohe Ammonium- und Nitritkonzentrationen angepasst sind, da marine Nitrifikanten in der Regel sehr sensibel auf erhöhte Substratmengen reagieren.

7.2 Identifizierung

Unsere elektronenmikroskopischen Abbildungen zeigten den Aufbau eines jungen sowie eines gealterten nitrifizierenden Biofilms aus Mikrokolonien von Ammoniak- und Nitritoxidanten. Der junge Biofilm wies eine ungefähre Dicke von 30 μm auf und bestand zum Großteil aus nitrifizierenden Bakterien. Eine vergleichende Quantifizierung der heterotrophen Bakterien auf den Füllkörpern am 22.05.2006 ergab folgende Zellzahlen (Kolonie bildende Einheiten auf Festmedien): In Modul 1 waren $6,0 \times 10^3$ Zellen/Füllkörper und in Modul 2 $1,6 \times 10^3$ Zellen/Füllkörper nachweisbar. Diese Zahlen bestätigen die Dominanz der Nitrifikanten im Biofilm der Füllkörper aus der Ecomares-Anlage in Büsum. Allerdings muss dabei berücksichtigt werden, dass alle verwendeten Medien jeweils nur einen Ausschnitt der bakteriellen Population widerspiegeln.

Mittels der charakteristischen Ultrastruktur konnte *Nitrospira* als der Hauptvertreter der Biofilmzellen ausgemacht werden. Dieses Ergebnis wurde in immunologischen Western-Blot Analysen bestätigt. Vertreter von *Nitrobacter* machten einen verschwindend geringen Anteil der Biomasse aus. Daneben kamen verschiedene Typen von *Nitrosomonas* vor. Einen geringeren Anteil der Ammoniakoxidanten repräsentierte die Gattung *Nitrosococcus*.

Bereits 1976 wurden nitrifizierende Bakterien in einer Aquakulturanlage anhand der Ultrastruktur als *Nitrosomonas* und *Nitrosococcus* identifiziert (Johnson und Sieburth, 1976). Vertreter von *Nitrobacter* konnten zwar angereichert, aber nicht im Biofilm selbst nachgewiesen werden. Nitritoxidanten der Gattung *Nitrospira* (Watson et al., 1986) waren zu diesem Zeitpunkt noch nicht bekannt.

Die Dominanz von nitrifizierenden Bakterien konnte in vergleichbaren Untersuchungen in einem Tricklingfilter bestätigt werden, dessen Biofilm Lydmark et al. (2006) mittels FISH an Dünnschnitten untersucht haben. Die Autoren konnten zeigen, dass die Biomasse zu 50 – 99% aus Nitrifikanten bestand, wobei wie bei unseren Untersuchungen mehrere Arten von *Nitrosomonas*, aber nur eine Art von *Nitrospira* gefärbt wurde. Auch bei relativ dicken

Biofilmen bis 200 µm sollte die Versorgung mit gelöstem Sauerstoff gewährleistet sein, wie Messungen mit Sauerstoffelektroden gezeigt haben (Schramm et al., 1999). Ein weiterer Faktor, der die Struktur und die Aktivität von nitrifizierenden Biofilmen beeinflusst, ist die Substratfracht (Wijeyekoon et al., 2004), denn hier wurde bei hohen Ammoniumkonzentrationen die Nitrifikation zugunsten von heterotrophen Bakterien unterdrückt. Die Entwicklung eines nitrifizierenden Biofilms auf PVC als Trägermaterial ist von Thörn et al. (1996) mikroskopisch dokumentiert worden. Nach 20 Tagen waren die Zellen „irreversibel“ angeheftet.

In einem gealterten Biofilm aus der Ecomares-Anlage wurden intakte Mikrokolonien von *Nitrospira* angetroffen. Dies steht im Einklang mit der Beobachtung, dass sich die Nitrifikanten im Biofilter auch nach „Hungerperioden“, in denen kaum Fische in den Becken waren (Modul 2 bis Oktober 2006), ohne weitere Einflussnahme von außen wieder reaktivieren konnten. Aktivitätstests mit gealterten Biofilmproben belegten, dass besonders die Ammoniakoxidanten auch nach 10 Wochen ohne Fütterung noch eine beachtliche Restaktivität aufwiesen.

Es wurde übereinstimmend von mehreren Autoren gefunden, dass in Aquakulturen eine vielfältige Population von Ammoniakoxidanten vorkommt, während bei den Nitritoxidanten fast ausschließlich *Nitrospira* nachgewiesen werden konnte. Der Vorteil einer großen Diversität an Vertretern einer Stoffwechselgruppe liegt darin, dass Störungen der Anlagenparameter besser toleriert werden können.

Um die Nitrifikanten weiter zu differenzieren, wurden molekularbiologische Techniken eingesetzt. Zunächst dienten fluoreszierende Gensonden dazu, das Vorkommen bestimmter Gruppen zu bestätigen bzw. auszuschließen. Als Hauptvertreter der Nitritoxidanten wurde erneut *Nitrospira* gefunden und das Vorkommen von *Nitrosomonas* bestätigt. Darüber hinaus gab es Hinweise auf die Existenz von *Nitrosococcus* im Biofilm.

Nach dieser groben Identifizierung konnten spezifische Primer gezielt benutzt werden, um die vorhandenen Arten der Ammoniak und Nitritoxidanten auf 16S rRNA Ebene zu identifizieren und mit bekannten Arten zu vergleichen. Ein Ammoniakoxidant im nitrifizierenden Biofilm konnte *Nitrosomonas cryotolerans* zugeordnet werden. Dieser Stamm ist aus einer Bucht in Alaska isoliert worden (Jones et al., 1988). Die Zellen sind 2-4 µm lang und obligat halophil (0,5 – 4,5 % Salinität). Es konnte eine Anpassung an niedrige Temperaturen beobachtet werden, die auch in Hinblick auf die Ecomares-Betriebstemperatur von 18°C interessant ist. Allerdings liegt das Temperaturoptimum von *Nm. cryotolerans* bei 22 – 30°C, d.h. in einem Bereich, der typisch für die meisten Nitrifikanten ist. Die Generationszeit wurde mit 12-16 h bestimmt.

Daneben konnte in einer Ammoniak oxidierenden Kultur eine neue Linie von *Nitrosomonas* angereichert werden. Der Stamm ist nahe verwandt mit dem Isolat Nm 143 aus einem marinen Estuar in der Dominikanischen Republik (Purckhold et al., 2003). Dieser Organismus ist weit verbreitet in marinen Lebensräumen wie verschmutzten bzw. anoxischen Sedimenten (Satoh et al., 2007). Er wurde bislang aber nicht im offenen Ozean angetroffen. Die benötigte Salinität ist größer als 1,0 % und es kann eine Sauerstoff-Sättigung bis zu 40 % toleriert werden.

In einer Populationsanalyse der nitrifizierenden Bakterien im Filtermaterial einer marinen Aquakulturanlage in Japan wurde ebenfalls mittels molekularbiologischer Methoden gefunden, dass verschiedene Vertreter von *Nitrosomonas* nebeneinander vorkommen. In diesem Fall handelte es sich um nahe Verwandte von *Nm. aestuarii* und, wie in der Ecomares-Anlage, um Verwandte des *Nitrosomonas*-Isolates Nm 143 (Itoi et al., 2006). Darüber hinaus bildeten 2 Klone einen separaten Cluster in der Gattung *Nitrosomonas*, aus dem bislang keine kultivierten Stämme vorliegen. Nitrit oxidierende Bakterien, die hier - wie in unserer Arbeit -, als *Nitrospira* identifiziert wurden, machten im Biofilm dieser Anlage, in der Kiesel als Filtermaterial eingesetzt wurden, 8,0 % bis 9,8 % der Bakterien aus (Sugita et

al., 2005). Der Anteil der Ammoniakoxidanten betrug dagegen nur maximal 3 % (Itoi et al., 2006).

Bei den Nitritoxidanten in der Ecomares-Anlage konnte eine bislang unbekannte Art von *Nitrospira* identifiziert werden. Der nächste Verwandte ist *Nitrospira marina*, der 1986 von Watson et al. beschrieben worden ist. Sein Wachstum ist mixotroph besser als autotroph, es tritt aber eine Hemmung durch hohe Organikkonzentration (1,5 g/L) ein. Benötigt werden 70 – 100 % Seewasser, wobei der von uns kultivierte Stamm auch in terrestrischem Medium wachsen kann. Die optimale Anzuchtstemperatur liegt bei 20 – 30°C. Generell wachsen Vertreter der Gattung *Nitrospira* sehr langsam und sind an niedrige Nitritkonzentrationen angepasst. Für *Ns. marina* wurde ab 6 mM Nitrit eine Hemmung beobachtet und die Generationszeit beträgt autotroph 90 h und mixotroph 23 h (Watson et al., 1986). Der Stamm aus Büsum scheint dagegen auch sehr hohe Substratkonzentrationen bis 10 mM ohne Aktivitätseinbußen zu tolerieren, was im Einklang mit den hohen Belastungen an Nitrit in der Marikulturanlage im Vergleich zum offenen Ozean steht.

7.3 Aktivitätsbestimmungen

Es ist im Rahmen des Projektes gelungen, einen Kurzzeittest zu entwickeln, der die Aktivitäten der Nitrifikanten getrennt nach Ammoniakoxidation und Nitritoxidation quantifizieren kann. Die potentielle Aktivität wird nach dem Substratverbrauch bzw. der spezifischen Produktbildung ermittelt. Mit Hilfe dieses Testverfahrens können einzelne Betriebsparameter optimiert werden. So konnte gezeigt werden, dass die Nitrifikanten an die jeweilige Betriebstemperatur angepasst sind, was sowohl für Büsum (18°C) als auch für Strande (26°C) zutrifft. Da auch der Salzgehalt in Strande von dem in Büsum abweicht, bleibt zu prüfen, ob dort eine andere Population von Ammoniak und Nitrit oxidierenden Bakterien vorherrscht.

Alternativ wurde die Aktivität der Nitrifikation mittels Mikrokalorimetrie überprüft. Wie erste Versuche gezeigt haben, steigt die Wärmetönung an, sobald mineralische Nährlösung für Ammoniak- oder Nitritoxidanten auf bewachsene Füllkörper gegeben wird. Allerdings können überlagerte Prozesse (sofortige Weiteroxidation von Nitrit zu Nitrat) von der Primärreaktion (Ammoniakoxidation) als solche weder erkannt noch entsprechend in der Berechnung der Ammoniakoxidationsaktivität berücksichtigt werden. Da die HPLC-Messungen aber auch mit Salzwasser gut reproduzierbar sind, wenn die Lösungen vorher 1:5 verdünnt werden, haben wir uns für diese genauere Methode entschieden.

7.4 Materialtestverfahren

Die Vorversuche zur Anheftung von nitrifizierenden Bakterien zeigten, dass in mineralischem Medium in Anwesenheit von neuen Füllkörpern aus verschiedenen Materialien sowohl Ammoniak- als auch Nitritoxidanten wachsen können. Ziel ist es, nach einer bestimmten Zeit einen Kurzzeitaktivitätstest durchzuführen, um geeignete Aufwuchsmedien zu vergleichen. Damit ist die Grundlage für weiterreichende Besiedlungsversuche gegeben. Allerdings sollte darauf geachtet werden, dass die Substratkonzentration im Ammoniakoxidantenmedium gering gehalten wird, da die Nitritoxidanten sonst längerfristig durch die hohe Konzentration an gebildetem Nitrit gehemmt werden. Alternativ könnte der Versuch mit Nitrit gestartet werden, da die 2. Stufe der Nitrifikation empfindlicher ist als die erste. Auch könnte im Durchfluss gearbeitet werden, in dem die Kunststoffträger in eine Säule gepackt werden.

Anhand der Langzeitversuche mit verschiedenen Kunststoffgranulaten konnte gezeigt werden, dass die Nitrifikation in Anwesenheit von fabrikneuen Kunststoffmaterialien gehemmt wird. Dabei hatte das schwarze Granulat aus recyceltem PE den geringsten Einfluss. Es scheint jedoch Bestandteile zu enthalten, die das Wachstum von heterotrophen Begleitorganismen fördern, da hier in stehenden Kulturen die Denitrifikation am stärksten war. Diesem Material wird nach Herstellerangaben 3% Ruß zugesetzt. Der Vergleich der

beiden weißen Granulate machte deutlich, dass die Vermutung, ein Material mit einer Trinkwasserempfehlung hätte keine hemmende Wirkung, nicht bestätigt werden konnte. Möglicherweise kommt hier der verstärkte Einsatz von Stabilisatoren oder Antioxidantien zum Tragen. Weitere Leaching-Versuche mit verschiedenen Materialien sind notwendig, um die Ergebnisse abzusichern. Die Versuche sollten mit verschiedenen Substratkonzentrationen (5 mM für die AOB und 10 mM für die NOB) geschüttelt wiederholt werden, um zu sehen, ob sich die Ergebnisse reproduzieren lassen. Obwohl die Versuche mit gewaschenem Granulat durchgeführt worden sind, muss durch Langzeitversuche und zyklische Versuche geklärt werden, wie lange die hemmende Wirkung anhält. Da unsere Ansätze im Batch-Verfahren erfolgten, sollten ergänzende Versuche im Feldversuch in der Anlage Strande durchgeführt werden. Darüber hinaus sollten die Hemmversuche im Labor mit nitrifizierenden Kulturen aus Strande wiederholt werden, um eine allgemeine Aussage treffen zu können.

7.5 Feldversuch in Strande

Im Rahmen der Diplomarbeit von Stefanie Beth wurden Versuche zur Abbaukapazität verschiedener Füllkörper in der Versuchsstation Strande durchgeführt, wobei Biocarrier diverser Größe und Materialien verglichen wurden. Es wurde sowohl Rohware als auch recyceltes HDPE bzw. PP eingesetzt. In diesem praxisnahen Test zeigten sich deutliche Unterschiede in Hinblick auf eine Erstbesiedlung mit Nitrifikanten und in Hinblick auf die Abbauleistung von Ammonium und Nitrit in einem späteren Belastungstest. Ziel dieser Untersuchungen ist es, die Ergebnisse aus den Laborversuchen in Hamburg auf die MariFarm in Strande zu übertragen. Als Ausgangspunkt sollen zunächst Füllkörper aus Rohware mit Trinkwasserzulassung getestet werden, dessen Granulat sich im Langzeit-Hemmversuch negativ auf das Wachstum der Ammoniak und Nitrit oxidierenden Bakterien ausgewirkt hat.

7.6 Toxizität von Metallen auf die Nitrifikation

Da bekannt ist, dass Kunststoffe verschiedene Metalle als Katalysatoren enthalten können, wurden Literaturrecherchen durchgeführt, um kritische Stoffe in Zukunft auszugrenzen. Einige Metalle wie Kupfer sind in geringen Konzentrationen (0,03 mg/L) förderlich für das Wachstum von Nitrifikanten, da sie als Spurenelement benötigt werden. In höheren Konzentrationen tritt dagegen ein hemmender Effekt auf (Loveless und Painter, 1968). Dies gilt für Kupfer (ab 0,05 mg/L), Zink (ab 0,08 mg/L) und Cobalt (ab 0,08 mg/L). Weitere negative Einwirkungen auf die Nitrifikation durch Nickel (0,25 mg/L), Cadmium und drei- bzw. sechswertiges Chrom (1 mg/L) wurden von Painter (1988) zusammengefasst. Aktuelle Arbeiten belegen, dass Nitrifikanten im Belebtschlamm sensibler auf Kupfer, Zink und Nickel reagieren als heterotrophe Bakterien (Principi et al., 2006). Dabei sind suspendierte Zellen von Ammoniak- oder Nitritoxidanten in Reinkultur empfindlicher als Biofilmzellen oder Belebtschlamm selbst (Artiga et al., 2003). Die Hemmung der Nitrifikation in Reaktorversuchen durch Chrom (VI) bzw. Kupfer, Zink, Nickel und Cadmium wurde von Beg et al. (1998) bzw. Hu et al. (2004) demonstriert.

Da Nitrifikanten sehr empfindlich auf äußere Einflüsse reagieren, eignen sie sich gut für Toxizitätstests für Abwasser, kontaminiertes Grundwasser, Chemikalien (Arvin et al., 1994) oder neue Materialien in der Fischzucht (Horowitz et al., 2001).

7.7 Hemmende Wirkung von Inhaltsstoffen auf biofilmbildende Bakterien

Wie oben bereits erwähnt, enthalten Polymere eine Fülle von Stoffen, die während des bestimmungsgemäßen Betriebs kontinuierlich an die Oberfläche abgegeben werden können.

Da eine Reihe von Katalysatorrückständen und auch Antioxidantien austreten können, wurde die Arbeits-Hypothese aufgestellt, dass diese an der Hemmung der Besiedlung durch Nitrifikanten beteiligt sein könnten. Zudem wurde davon ausgegangen, dass Polymere mit einer Empfehlung für den Kontakt mit Trinkwasser weniger und eine begrenzte Anzahl von Additiven enthalten als solche für andere Einsätze. Die Ergebnisse der Untersuchungen zeigen aber, dass die Polymere mit einer Trinkwasserempfehlung nicht schneller besiedelt wurden. Ob dieser Effekt durch austretende Additive hervorgerufen wurde oder durch andere Faktoren der Oberflächenbeschaffenheit, kann bisher nicht eindeutig beantwortet werden. Hierzu wären chemische Analysen des Umgebungswassers vonnöten. Da im Gegensatz zur Rohware recyceltes Material deutlich schneller besiedelt wurde, liegt die Vermutung nahe, dass bakterizide oder bakteriostatische Stoffe in geringerem Maße an die Oberfläche gelangten, sei es durch vorherige Auslaugung oder Ausgasung im Recyclingprozess. Die zugrunde liegenden Faktoren könnten auch in diesem Falle durch eine chemische Analytik des Umgebungswassers abgeklärt werden. Bisher ist festzustellen, dass die Arbeitshypothese eines Einsatzes von Polymeren mit Trinkwasserempfehlung nicht tauglich ist. Auf der anderen Seite kann recycelte Ware in ihrer Zusammensetzung stark schwanken, so dass für die Zukunft ein einfacher mikrobiologischer Test zu entwickeln wäre, der Aussagen über die Besiedlungsfähigkeit des angebotenen Materials erlaubt.

7.8 Chemische Analyse

In einem 24-Stunden-Zyklus wurde der Verlauf der Konzentrationen an Ammonium, Nitrit und Nitrat in Modul 1 und 2 der Ecomares-Anlage in Büsum beobachtet. Deutlich erkennbar ist die Zunahme an Ammonium in den Fischbecken und der Abbau im Biofilter. Dabei ist durch den höheren Besatz sowohl die Belastung durch die Fische als auch der Abbau durch die Nitrifikanten in Modul 1 höher als in Modul 2. Generell kann der Fütterungszyklus hauptsächlich mit der Variation der Ammoniumgehalte korreliert werden, wobei es möglicherweise auch einen Tag- und Nachteinfluss gibt.

Die Nitritkonzentration schwankt im Tagesgang zwischen 0,7 und 2,0 mg/L (15 und 44 μM) und weist keine großen Differenzen zwischen Frischwasser, Zulauf und Ablauf auf.

Der Nitratgehalt ist in beiden Modulen mit 6000 bis 6500 μM im Mittel durchweg hoch. Hier stellt sich die Frage, ob es dadurch zur Beeinträchtigung der Nitrifikation in den Biofiltern kommen kann. Hinweise auf eine Endproduktthemmung ergaben sich im Aktivitätstest sowohl für die Ammoniak als auch für die Nitrit oxidierenden Bakterien.

Weiterführende Interpretationen und eventuelle Anpassungen der allgemeinen Verfahrenstechnik würden jedoch weitere Messperioden ggf. auch über einen längeren Zeitraum erfordern, die jedoch nur in einer weiteren Projektphase bearbeitet werden können. Um zu verdeutlichen, dass niedrige Konzentrationen an Ammonium, Nitrit und Nitrat aber auch in Hinblick auf die Nitrifikation von Bedeutung sind, sind im Folgenden einige Angaben aus der Literatur zusammengestellt.

7.9 Hemmung von Nitrifikanten durch Ammonium und Nitrit

Ein Vergleich von Literaturwerten für die Hemmung der Nitritoxidation durch freies Ammoniak ist bei Philips et al. (2002) zu finden. Ein Effekt soll bereits bei einer Konzentration von 0,02 mg NH_3/L (1,2 μM) einsetzen und bei 0,12 mg/L (7,1 μM) 90 % erreichen. Die Toleranzgrenzen für das Ammoniumion sind wesentlich höher. Als niedrigster Wert sind 13 mg NH_4^+/L (722 μM) für eine 95%ige Hemmung der Nitritoxidation angegeben.

Während terrestrische Ammoniakoxidanten relativ unsensibel auf hohe Nitritkonzentrationen reagieren, liegen derartige Untersuchungen für marine Arten nicht vor. Loveless und Painter (1968) fanden, dass ein Abwasserisolat von *Nitrosomonas* erst in Anwesenheit von 2,5 g Nitrit pro Liter gehemmt wurde. Bazin et al. (1982) zeigen in einer Zusammenfassung verschiedener Arbeiten, dass bei *Nitrosomonas* ab 500 mg Nitrit/L bereits eine verlängerte

Anlaufphase auftrat, diese aber vom pH-Wert des Mediums abhängig war. In neueren Arbeiten wird erwähnt, dass die Ammoniakoxidation bei Konzentrationen von 42-70 mg Nitrit pro Liter (913-1521 μM) zu 50 % gehemmt wird (zusammengefasst von Philips et al., 2002).

Zellen von *Nitrobacter* sollen ab einer Konzentration von 130 mg Nitrit/L (2826 μM) verzögert wachsen, wobei das Ausmaß der Hemmung vom physiologischen Zustand der Zellen abhing (Aleem und Alexander, 1960).

7.10 Hemmung von Nitrifikanten durch Nitrat

In älteren Arbeiten wurde untersucht, ob infolge der Nitrifikation eine Endprodukthemmung durch Nitrat vorkommt. Diese Studien sind auch heute noch aktuell, da besonders durch die Kreislaufführung des Wassers in Aquakulturanlagen eine Aufkonzentrierung von Nitrat stattfinden kann. Dies konnten wir im Rahmen des geförderten Projekts für die Ecomares-Anlage in Büsum zeigen. Dagegen liegen die Konzentrationen an Ammonium und Nitrit in der untersuchten Marikulturanlage in der Regel unterhalb der Grenze, die hemmend wirkt.

In einer Veröffentlichung von Aleem und Alexander (1960) wurde beschrieben, dass ab 1-2 g Nitrat/L (16000-32000 μM) eine verlängerte Lag-Phase bei *Nitrobacter* hervorgerufen wird und bei 5 g/L (81000 μM) gar keine Nitritoxidation mehr stattfindet. Allerdings ist die Beeinträchtigung von aktiven Kulturen geringer, sie wird aber durch intensive Belüftung verstärkt (Gould und Lees, 1960). Bei einem Sauerstoffpartialdruck von 10 %, wie er im Biofilter der Ecomares-Anlage in Büsum eingestellt ist, reduzieren 33 mM Nitrat die Nitritoxidation von *Nitrobacter* um 66 % (Butt und Lees, 1960). Dabei scheint zunächst die Kohlenstoffassimilation gestört zu werden, bevor die Nitritoxidation verringert wird (Schön, 1965).

Da es keine aktuelle Literatur zu dem Thema gibt, sollten weitere Untersuchungen zur Hemmung von marinen Ammoniak- und Nitritoxidanten durch Nitrat durchgeführt werden. Dafür bieten sich die Anreicherungskulturen aus den Anlagen in Büsum und Strande an. Die bisherigen Experimente wurden an Zellen von *Nitrobacter* durchgeführt, die aber, wie unsere und andere Arbeiten gezeigt haben, in Marikulturanlagen keine Bedeutung haben.

Die einzigen Informationen zur Nitrathemmung bei *Nitrospira* lieferten Ehrich et al. (1995). Die Autoren fanden, dass *Ns. moscoviensis* ab einer Konzentration von 75 mM Nitrat (6,4 g/L) beeinträchtigt wird. Diese hohe Toleranz scheint aber nur für stoffwechselphysiologisch aktive Zellen gültig zu sein. Weiterhin liegen keine Angaben über marine Arten dieser Gattung vor.

Zu überdenken wäre der Einbau einer Denitrifikationsstufe, um möglicherweise hemmendes Nitrat zu entfernen. Auch ohne den Zusatz weiterer organischer Bestandteile sollte zumindest teilweise die Reduktion von Nitrit und Nitrat möglich sein, da die Kunststoffe selbst noch Reste an organischen Bestandteilen aufweisen und weitere bei der Zersetzung des Biofilmmaterials frei werden können. Dazu ist es aber notwendig, die Belüftung stellen- bzw. zeitweise auszuschalten. Es bleibt zu klären, wie lange eine Auswaschung von Polymeren aus den Kunststoffen erfolgt. Ansonsten müssten die Denitrifikanten mit einer externen Kohlenstoffquelle versorgt werden. Versuche zur Denitrifikation in einer Aalfarm, wobei Polymere gleichzeitig als Medium zur Anheftung dienten, sind von Boley et al. (2000) beschrieben worden.

8 Vorschläge für die zweite Projektphase

- Untersuchung des Einflusses von Nitrat auf Nitrifikanten in Laboransätzen.
- Nitrathemmversuche mit Anreicherungskulturen aus der Anlage Büsum und Strande.
- Hemmversuche durch Kunststoffe an Anreicherungskulturen aus Büsum und Strande und Reinkulturen, Überprüfung im Pilotmaßstab.
- Untersuchung käuflicher und modifizierter Füllkörper auf eine mögliche Hemmung der nitrifizierenden Bakterien durch darin enthaltene chemische Zusätze.
- Vergleich der Stickstoff-Abbaukapazität verschiedener Biofilter-Füllkörper im Kurzzeitaktivitätstest und in der Versuchsstation Strande .
- Entwicklung eines neuartigen Produkttyps mit optimaler Anheftung und Wachstum der Nitrifikanten, ausreichender Materialbeständigkeit sowie verringerter Öko- und Humantoxizität.
- Die Entwicklung einer prozessnahen Einrichtung für die Bestimmung der Aktivität der Biofilter.
- Untersuchungen zur Anheftung nitrifizierender Bakterien auf verschiedenen Trägermaterialien und Visualisierung am AFM.
- Beimischungen förderlicher Substanzen (z.B. Bentonit), um die Anheftung nitrifizierender Bakterien zu beschleunigen.
- Die Durchführung weiterer Messkampagnen zur Erweiterung des Datenbestandes als Grundlage einer weiteren Prozessoptimierung.
- Messung und Optimierung der Betriebsparameter auf die Abbauleistung (Durchflussrate, Verweilzeit, Füllkörperdichte, Belüftungsintensität, Sauerstoffgehalt).
- Verifizierung der Pilotergebnisse in der Ecomares-Steinbutt-Produktionsanlage in Büsum in großtechnischem Maßstab.
- Entwicklung und Einsatz eines Denitrifikationsmoduls als Prozesserweiterung in einer Pilotanlage.

9 Anhang

Tabelle 8: Ammoniumgehalt der Proben in [μM] mit Angabe des Zeitpunktes der Probenahme (die Angabe „Zeit [h]“ ist eine Dezimalzahl) sowie Anmerkungen zur Fütterung (rote Markierung bedeutet „vor der Fütterung“)

Modul 1		Uhrzeit	15.30	16.30	17.35	18.35	19.35	22.40	01.30	04.05	07.05	09.00	10.05	11.08	12.30	13.30	15.00	
Reihen-Nr.	Proben-	Reihe	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
in Graphik	Nr.	Zeit [h]	0,00	1,00	2,58	3,58	4,58	7,17	10,00	12,58	15,58	17,50	18,58	19,58	21,00	22,00	23,50	
	1	4	Frischwasser	6,1	8,4	4,7	0,0	6,0	5,2	6,5	3,7	17,0	15,2	10,4	14,5	3,6	5,9	2,4
	2	7	Abfl. Biofilter 1	16,2	14,3	15,6	13,6	17,8	19,1	18,3	19,0	19,3	19,8	20,4	17,4	12,3	15,7	13,6
	3	24	Überl. Sedimenter 1	18,4	15,1	17,2	17,7	18,6	20,6	20,4	22,7	20,6	21,5	22,4	24,6	11,4	14,2	15,1
	4	6	Abfl. Sedimenter 1 (O3)	16,2	17,8	19,9	16,5	14,1	19,8	19,7	16,9	14,1	15,8	11,1	9,8	11,2	8,8	15,7
	5	5	Pumpensumpf 1	14,1	18,1	18,2	21,0	19,6	22,3	20,9	22,4	13,7	14,6	12,5	11,2	11,8	11,2	16,3
	6	13	Zufl. 1B7 kF	17,4	21,7	23,7	21,2	22,7	24,8	25,6	23,3	15,2	15,8	15,9	14,5	13,3	26,7	18,1
	7	16	Zufl. 1B8 mF	20,8	18,2	21,4	20,9	22,9	23,4	24,7	20,1	16,5	19,3	13,8	12,8	11,3	16,0	20,1
	8	17	Zufl. 1B10 gF	18,3	22,7	18,3	21,8	19,6	24,3	23,9	21,9	16,1	15,8	12,4	15,1	11,7	14,1	17,5
	9	3	Abfl. 1B7 kF	22,4	22,6	31,2	33,4	28,9	31,0	29,5	26,4	2,8	5,0	7,4	12,0	20,1	27,1	28,1
	10	2	Abfl. 1B8 mF	25,3	27,7	29,3	35,3	27,9	34,4	34,6	28,1	21,6	20,0	21,7	16,7	20,8	19,9	25,0
	11	1	Abfl. 1B10 gF	23,6	30,4	29,4	31,8	31,4	39,4	48,9	34,4	24,8	20,7	21,0	15,5	20,9	23,0	26,1
	12	8	Abfluss-Sammler 1	22,4	27,4	26,0	30,3	28,4	32,4	33,2	29,1	23,1	21,7	19,7	15,1	16,4	20,1	23,6
	13	9	Zufl. Biofilter 1	22,8	24,2	25,7	30,6	26,7	40,9	35,4	30,2	10,0	9,2	7,1	8,6	17,0	18,4	24,9
Modul 2																		
	1	4	Frischwasser	6,1	8,4	4,7	0,0	6,0	5,2	6,5	3,7	17,0	15,2	10,4	14,5	3,6	5,9	2,4
	2	11	Abfl. Biofilter 2	12,8	7,1	4,3	8,4	5,4	6,9	6,4	8,1	14,7	17,4	14,2	13,4	7,5	6,6	8,0
	3	dummy	Überl. Sedimenter 2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	10	Abfl. Sedimenter 2	8,9	8,8	8,9	7,5	5,9	6,1	8,5	10,7	9,0	8,6	11,2	4,5	6,1	6,6	6,4
	5	23	Pumpensumpf 2	10,2	11,2	7,4	10,4	8,3	8,4	9,5	7,8	16,5	13,7	13,1	7,2	7,2	6,4	18,7
	6	12	Zufl. 2B6	13,4	11,2	8,8	12,5	11,5	8,3	12,1	13,1	16,2	15,8	14,8	13,3	11,0	13,8	11,4
	7	14	Zufl. 2B7	15,6	10,9	13,3	14,9	13,8	12,4	14,9	20,3	14,0	12,6	13,1	11,9	14,9	10,6	15,3
	8	15	Zufl. 2B8	11,5	13,1	9,5	9,8	9,9	12,4	11,8	12,8	17,8	15,6	13,9	12,0	10,8	18,7	12,7
	9	20	Abfl. 2B6	11,8	10,5	10,7	11,6	12,0	13,7	15,0	15,2	20,0	14,9	17,1	16,1	19,4	14,7	13,7
	10	19	Abfl. 2B7	11,4	12,9	10,6	13,8	13,1	14,8	16,0	19,4	17,4	17,2	13,2	16,0	17,6	16,3	21,0
	11	18	Abfl. 2B8	9,2	14,4	10,9	15,1	14,6	13,7	11,8	14,4	17,3	16,5	18,7	17,8	18,4	13,6	12,8
	12	21	Abfluss-Sammler 2	17,0	15,5	17,8	15,8	15,1	17,1	14,3	17,5	16,5	18,6	15,2	14,3	18,3	16,1	15,5
	13	22	Zufl. Biofilter 2	13,7	10,4	16,3	19,2	16,1	16,8	13,7	15,1	9,4	10,0	8,9	8,0	16,2	15,6	17,3

Tabelle 9: Nitritgehalt der Proben in [µM] mit Angabe des Zeitpunktes der Probenahme (die Angabe „Zeit [h]“ ist eine Dezimalzahl) sowie Anmerkungen zur Fütterung (rote Markierung bedeutet „vor der Fütterung“)

Modul 1		Uhrzeit	15.30	16.30	17.35	18.35	19.35	22.40	01.30	04.05	07.05	09.00	10.05	11.08	12.30	13.30	15.00	
Reihen-Nr.	Proben-	Reihe	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
in Graphik	Nr.	Zeit [h]	0,00	1,00	2,58	3,58	4,58	7,17	10,00	12,58	15,58	17,50	18,58	19,58	21,00	22,00	23,50	
	1	4	Frischwasser	42,4	36,2	37,0	30,3	33,6	34,1	34,8	32,2	28,8	18,1	20,3	17,0	16,0	15,4	20,8
	2	7	Abfl. Biofilter 1	33,9	44,1	75,7	31,3	36,5	39,5	40,8	43,7	40,3	19,7	20,4	25,8	27,1	24,1	24,3
	3	24	Überl. Sedimenter 1	37,6	27,0	40,4	41,8	40,7	37,3	43,4	46,7	22,9	18,6	20,2	22,1	23,8	20,9	24,4
	4	6	Abfl. Sedimenter 1 (O3)	30,5	51,8	39,4	39,7	34,6	37,3	38,2	39,7	41,5	18,6	21,6	29,0	20,7	26,9	24,7
	5	5	Pumpensumpf 1	41,4	36,7	31,7	40,9	37,5	37,6	40,1	43,9	47,0	22,0	16,8	17,2	26,1	23,5	24,5
	6	13	Zufl. 1B7 kF	37,0	38,8	36,5	39,3	37,8	46,2	40,0	41,1	39,2	28,7	24,3	31,1	24,1	19,9	23,1
	7	16	Zufl. 1B8 mF	42,0	39,3	35,5	40,3	35,7	40,2	43,6	39,7	36,0	18,1	27,4	21,1	28,4	25,5	18,0
	8	17	Zufl. 1B10 gF	36,4	34,2	43,0	38,7	36,2	36,5	36,4	40,8	41,6	16,7	32,4	21,5	25,5	23,3	22,1
	9	3	Abfl. 1B7 kF	35,8	35,6	35,1	42,3	35,8	40,3	37,7	39,7	37,2	33,5	22,9	28,8	25,9	25,7	25,0
	10	2	Abfl. 1B8 mF	41,4	41,9	34,1	33,6	38,8	41,2	41,1	44,2	39,8	29,0	19,1	27,3	26,7	25,8	22,8
	11	1	Abfl. 1B10 gF	27,3	35,8	39,9	40,6	42,9	42,6	38,0	43,1	37,1	34,5	20,3	26,3	25,6	24,0	20,2
	12	8	Abfluss-Sammler 1	38,6	45,9	42,4	39,6	39,9	39,6	38,6	49,2	40,5	33,5	21,8	26,8	23,5	24,8	26,3
	13	9	Zufl. Biofilter 1	34,8	44,8	34,9	44,1	40,2	42,3	46,9	41,5	40,9	23,4	20,3	19,2	25,7	21,8	23,8
Modul 2																		
	1	4	Frischwasser	42,4	36,2	37,0	30,3	33,6	34,1	34,8	32,2	28,8	18,1	20,3	17,0	16,0	15,4	20,8
	2	11	Abfl. Biofilter 2	31,9	35,3	37,0	38,1	26,1	32,6	29,0	28,4	28,9	13,3	17,3	13,2	16,5	19,7	17,9
	3	dummy	Überl. Sedimenter 2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	10	Abfl. Sedimenter 2	32,7	28,6	27,3	30,0	29,4	29,1	30,6	30,6	32,1	17,8	16,3	13,2	20,0	15,5	19,2
	5	23	Pumpensumpf 2	32,2	34,3	27,6	34,3	31,5	23,5	27,0	31,8	15,4	11,2	14,4	13,8	18,5	21,0	21,8
	6	12	Zufl. 2B6	26,4	28,1	25,1	34,0	24,2	30,8	29,1	26,2	26,1	20,7	21,1	13,5	18,5	17,7	14,6
	7	14	Zufl. 2B7	27,7	29,1	29,0	32,9	32,9	31,0	30,5	31,3	31,8	22,9	20,7	11,3	17,2	18,9	14,4
	8	15	Zufl. 2B8	27,1	26,0	32,4	33,8	27,2	28,0	27,9	28,3	26,0	26,6	23,3	16,1	20,4	16,5	18,3
	9	20	Abfl. 2B6	35,0	27,5	27,6	24,5	29,0	29,3	28,7	31,8	14,4	13,8	16,9	13,5	20,9	14,7	17,9
	10	19	Abfl. 2B7	26,2	32,0	32,1	25,8	27,4	36,7	30,9	30,3	24,7	10,7	14,0	11,6	17,2	18,4	17,4
	11	18	Abfl. 2B8	27,5	24,2	35,1	30,6	30,8	26,3	27,6	27,9	26,1	14,5	17,1	13,9	22,6	14,1	13,6
	12	21	Abfluss-Sammler 2	27,6	30,5	30,7	30,0	27,2	26,9	28,0	26,9	19,4	9,4	16,1	14,7	18,9	13,5	19,1
	13	22	Zufl. Biofilter 2	24,9	26,5	26,5	31,1	29,3	33,9	31,4	33,4	16,5	14,8	14,5	12,4	19,6	19,1	16,2

Tabelle 10: Nitratgehalt der Proben in [μM] mit Angabe des Zeitpunktes der Probenahme (die Angabe „Zeit [h]“ ist eine Dezimalzahl) sowie Anmerkungen zur Fütterung (rote Markierung bedeutet „vor der Fütterung“)

Modul 1		Uhrzeit	15.30	16.30	17.35	18.35	19.35	22.40	01.30	04.05	07.05	09.00	10.05	11.08	12.30	13.30	15.00	
Reihen-Nr.	Proben-	Reihe	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	
in Graphik	Nr.	Zeit [h]	0,00	1,00	2,58	3,58	4,58	7,17	10,00	12,58	15,58	17,50	18,58	19,58	21,00	22,00	23,50	
	1	4	Frischwasser	72	64	56	59	58	53	64	94	49	54	45	52	60	48	102
	2	7	Abfl. Biofilter 1	6147	6336	7156	6448	6779	6028	5972	5976	5942	6630	5474	7179	6392	6521	6484
	3	24	Überl. Sedimenter 1	6054	6121	6757	6904	6772	6085	6662	5963	6978	5434	7185	6064	6487	6396	6532
	4	6	Abfl. Sedimenter 1 (O3)	6586	6284	6168	6896	6846	6103	5888	5916	6174	7360	5499	7432	5825	6574	6477
	5	5	Pumpensumpf 1	6553	6082	6070	7338	6784	6359	5879	5967	6821	7546	5439	7032	6496	6509	6468
	6	13	Zufl. 1B7 kF	6074	6676	6310	6662	6051	5933	6054	5918	5980	7307	7303	7065	6433	5870	5752
	7	16	Zufl. 1B8 mF	6605	6739	7205	6889	6084	6186	6560	5925	6060	5191	7069	6241	7025	6499	5827
	8	17	Zufl. 1B10 gF	5991	6110	7465	6648	6018	5729	5929	5972	6423	5250	7028	6188	6448	6524	5875
	9	3	Abfl. 1B7 kF	6610	6030	6084	6583	6786	6585	5967	5914	5886	7332	5421	6919	5877	6468	5828
	10	2	Abfl. 1B8 mF	6194	6615	6183	5761	6784	6668	5951	6242	6016	7270	5450	7412	6369	6518	5806
	11	1	Abfl. 1B10 gF	6541	6332	6795	5878	6816	6491	6710	5931	5992	7337	6101	6600	6401	6439	5787
	12	8	Abfluss-Sammler 1	6593	6331	7288	7092	6742	6058	6614	5958	5969	7195	6087	7159	6473	6579	5815
	13	9	Zufl. Biofilter 1	6102	6697	6999	7105	6732	5883	6564	5923	6059	7376	5934	5760	6432	6492	6366
Modul 2																		
	1	4	Frischwasser	72	64	56	59	58	53	64	94	49	54	45	52	60	48	102
	2	11	Abfl. Biofilter 2	5790	6191	5915	6767	5539	6190	5564	6231	5659	6659	6703	5459	5937	6298	6239
	3	dummy	Überl. Sedimenter 2															
	4	10	Abfl. Sedimenter 2	6040	5588	5978	5823	5716	5402	6152	6204	6273	6763	6685	5658	6225	5677	6274
	5	23	Pumpensumpf 2	6025	5738	5943	6237	5625	5578	5555	6011	6948	5191	6097	5223	6206	5624	6269
	6	12	Zufl. 2B6	5750	5756	6523	6815	5611	5521	5558	5564	5634	7193	6057	6059	6242	5635	5653
	7	14	Zufl. 2B7	6029	5960	6389	6182	6254	6160	6153	5515	5714	6424	6541	6052	5587	5652	6212
	8	15	Zufl. 2B8	6056	5667	6565	6275	6258	5567	6103	5581	5807	5015	6871	5466	6200	6290	5630
	9	20	Abfl. 2B6	6036	5645	6594	5612	6165	5544	6204	6146	6998	5610	6887	5809	6226	6366	6281
	10	19	Abfl. 2B7	5471	5584	6551	6207	6148	6170	5552	5619	5665	5069	6123	5431	6247	6252	6182
	11	18	Abfl. 2B8	5482	5570	6274	6190	5622	5572	5370	6182	6084	5036	6947	5928	6164	5688	6187
	12	21	Abfluss-Sammler 2	5525	5644	6699	6236	5583	6257	5651	5599	6748	5075	6683	5872	6164	6251	6143
	13	22	Zufl. Biofilter 2	5492	5637	6239	6206	5609	5612	5555	6181	6832	5660	6696	5865	6222	5858	6281

10 Literatur

- Aamand, J., Ahl, T., Spieck, E.** (1996). Monoclonal antibodies recognizing nitrite oxidoreductase of *Nitrobacter hamburgensis*, *N. winogradskyi*, and *N. vulgaris*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2352-2355.
- Alawi, M.** (2003) Beispiele für die Anwendung der Denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) bei der Differenzierung von lithoautotrophen, Nitrit oxidierenden Bakterien. Diplomarbeit, Universität Hamburg.
- Aleem, M.I.H., Alexander, M.** (1960) Nutrition and physiology of *Nitrobacter agilis*. *Appl. Microbiol.* **8**: 80-84.
- Alexander, M.** (1982) Most probable number method for microbial populations. In Miller RH, Keeney DR (eds.). *Methods of soil analysis properties*, 2nd Ed., pp. 815-820. Am Soc Agron, Madison, WI.
- Artiga, P., Oyanedel, V., Garrido, J.M., Mendez, R.** (2003) A novel titrimetric method for monitoring toxicity on nitrifying biofilms. *Water Science & Technology* **47 (5)** pp 205–209.
- Arvin, E., Dyreborg, S., Menck, C., Olsen, J.** (1994) A mini-nitrification test for toxicity screening, minntox. *Water Research* **28 (9)**:2029-2031
- Ballinger, S.J., Head, I.M., Curtis, T.P., Godley, A.R.** (2002) The effect of C/N ratio on ammonia oxidising bacteria community structure in a laboratory nitrification-denitrification reactor. *Water Sci Technol.* **46**: 543-550.
- Bartosch, S., Wolgast, I., Spieck, E., Bock, E.,** (1999) Identification of nitrite-oxidizing bacteria with monoclonal antibodies recognizing the nitrite oxidoreductase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4126-4133.
- Bartosch, S., Hartwig, C., Spieck, E., Bock, E.** (2002) Immunological detection of *Nitrospira*-like bacteria in various soils. *Microbiol. Ecol.* **43**: 26-33.
- Bazin, M.J., Cox, D.J., Scott, R.I.** (1982) Nitrification in a column reactor: Limitations, transient behaviour and effect of growth on a solid substrate. *Soil Biology and Biochemistry*, Volume **14 (5)**: 477-487
- Beg, S.A., Hassan, M.M., Chaudhry, M.A.S.** (1998) Chromium(VI) inhibition in multisubstrate carbon oxidation and nitrification process in an upflow packed bed biofilm reactor. *Biochemical Engineering Journal*, **1 (2)**: 143-152 .
- Bock, E., Koops, H.-P.** (1992) The genus *Nitrobacter* and related genera, In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.-H., (Eds.) *The Prokaryotes* , 2nd Ed., Vol. **3**, pp. 2302-2309. Springer-Verlag, New York.
- Boley, A., Müller, W.-R., Haider, G.** (2000) Biodegradable polymers as solid substrates and biofilm carrier for denitrification in recirculated aquaculture systems. *Aquacult. eng.* **22**: 75-85.
- Bower, C.E., Turner, D.T.** (1984). Evaluation of two commercial nitrification accelerators in closed seawater culture systems. *Aquaculture* **41 (2)**: 155-159.
- Brocca, D., Arvin, E., Mosbæk, H.** (2002) Identification of organic compounds migrating from polyethylene pipelines into drinking water. *Water Research* **36 (15)**: 3675-3680.
- Burrell, P.C., Phalen, C.M., Hovanec, T.A.** (2001) Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5791-5800.
- Butt, W.D., Lees, H.** (1960). The biochemistry of the nitrifying organisms. *Biochem. J.* **76**: 423-427.

- Carmignani, G.M., Bennett, J.P.** (1977) Rapid start-up of a biological filter in a closed aquaculture system. *Aquaculture* **11**: 85-88.
- Corbin, J.L.** (1984) Liquid chromatographic-fluorescence determination of ammonia from nitrigenase reactions: A 2-min assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 1027-1030.
- Cox, D.J., Bazin, M.J., Gull, K.** (1980) Distribution of bacteria in a continuous-flow nitrification column. *Soil Biology and Biochemistry* **12 (3)**: 241-246
- Daims, H., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H., Schleifer, K.-H., Wagner, M.** (2001) In situ characterization of *Nitrospira*-like nitrite-oxidizing bacteria active in wastewater treatment plants. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 5273-5284.
- Degrange, V., Bardin, R.** (1995) Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **6**: 2093-2098.
- Diab, S., Shilo, M.** (1988) Effect of adhesion to particles on the survival and activity of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter* sp. *Arch. Microbiol.* **150**: 387-393.
- Ehrich, S., Behrens, D., Lebedeva, E., Ludwig, W., Bock, E.** (1995) A new obligately chemolithoautotrophic, nitrite-oxidizing bacterium, *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *Arch. Microbiol.* **164**: 16-23.
- FAO** (2002) State of world fisheries and aquaculture. FAO fisheries department, food and agriculture organization of the United Nations, Rome, Italy, **150** pp.
- Fdz-Polanco, F., Méndez, E., Urueña, M.A., Villaverde, S., Garcia, P.A.** (2000) Spatial distribution of heterotrophs and nitrifiers in a submerged biofilter for nitrification. *Wat. Res.* **34**: 4081-4089.
- Franco-Rivera, A., Paniagua-Michel, J., Zamora-Castro, J.** (2007) Characterization and performance of constructed nitrifying biofilms during nitrogen bioremediation of a wastewater effluent. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, DOI 10.1007/s10295-006-0196-y.
- Furumai, H., Rittmann, B.E.** (1992) Advanced modelling of mixed populations of heterotrophs and nitrifiers considering the formation and exchange of soluble microbial products. *Water Sci Technol.* **26**: 493-502.
- Gadkari, D.** (1990) Nitrification in the presence of soil particles, sand, alginate beads and agar strands. *Soil Biol. Biochem.* **22**: 17-21.
- Gould, G.W., Lees, H.** (1960) The isolation and culture of the nitrifying organisms. Part 1. *Nitrobacter*. *Can. J. Microbiol.* **6**: 399-407.
- Goreau, T.J., Kaplan, W.A., Wofsy, S.C., McElroy, M.B., Valois, F.W., Watson, S.W.** (1980) Production of NO₂⁻ and N₂O by nitrifying bacteria at reduced concentrations of oxygen. *Appl. Environ. Microbiol.* **40**: 526-532.
- Goulas, A.E., Riganakos, K.A., Badeka, A., Kontominas, M.G.** (2002) effect of ionizing radiation on the physicochemical and mechanical properties of commercial monolayer flexible plastics packaging materials. *Food Add. Contam.* **19 (12)**: 1190-1199.
- Grommen, R., Van Hauteghem, I., Van Wambeke, M., Verstraete, W.** (2002) An improving nitrifying enrichment to remove ammonium and nitrite from freshwater aquaria systems. *Aquaculture* **211**: 115-124.
- Grommen, R., Dauw, L., Verstraete, W.** (2005) Elevated salinity selects for a less diverse ammonia-oxidizing population in aquarium biofilters. *FEMS Microbiol. Ecol.* **52**: 1-11.
- Grossa, A., Nemirovskya, A., Zilbergb, D., Khaimova, A., Brenner, A., Snird, E., Ronena, Z., Nejidata, A.** (2003) Soil nitrifying enrichments as biofilter starters in intense recirculating saline water aquaculture. *Aquaculture* **223 (1-4)**: 51-62.

- Handy, R.D., Poxton, M.G.** (1993) Nitrogen pollution in mariculture – Toxicity and excretion of nitrogenous compounds by marine fish. *Rev Fish Biol Fisheries* **3**: 205-241.
- Horowitz, A., Samocha, T.M., Gandy, R.L., Horowitz, S.** (2001) Toxicity tests to assess the effect of a synthetic tank liner on shrimp survival and nitrification in a recirculating superintensive production system. *Aquacult. Eng.* **24 (2)**: 91-105.
- Hovanec, T.A., DeLong, E.F.** (1996) Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2888-2896.
- Hovanec, T.A., Taylor, L.T., Blakis, A., DeLong, E.F.** (1998) *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 258-264.
- Hu Z., Chandran, K., Grasso, D. Smets, B.F.** (2004) Comparison of nitrification inhibition by metals in batch and continuous flow reactors *Water Research* **38 (18)**: 3949-3959.
- Itoi, S., Niki, A., Sugita, H.** (2006) Changes in microbial communities associated with the conditioning of filter material in recirculating aquaculture systems of the pufferfish *Takifugu rubripes*. *Aquaculture* **256**: 287-295.
- Johnson, P.W., Sieburth, J.McN.** (1976) In situ morphology of nitrifying-like bacteria in aquaculture systems. *Appl. Environ. Microbiol.* **31**: 423-432.
- Jones, R.D., Morita, R.Y., Koops, H.-P., Watson, S.W.** (1988). A new marine ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosomonas cryotolerans* sp. nov. *Can. J. Microbiol.* **34**: 1122-1128.
- Keen, G.A., Prosser, J.I.** (1987) Interrelationship between pH and surface growth of *Nitrobacter*. *Soil Biol. Biochem.* **19**: 665-672.
- Kloep, F., Röske, I., Neu, T.R.** (2000) Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor. *Water Research* **34 (1)**: 311-319.
- Krüner, G., Rosenthal, H.** (1983) Efficiency of nitrification in trickling filters using different substrates. *Aquacult. Eng.* **2 (1)**: 49-67.
- Lane, D.J.** (1991) 16S/23S rRNA sequencing Nucleic acid techniques in bacterial systematics. In E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.). Academic Press, Chichester, England, pp 115-175.
- Lebedeva, E.V., Alawi, M., Fiencke, C., Namsaraev, B., Bock, E., Spieck, E.** (2005) Moderately thermophilic nitrifying bacteria from a hot spring of the Baikal rift zone. *FEMS Microbiol. Ecol.* **54**: 297-306.
- Lekang, O.-I., Kleppe, H.** (2000) Efficiency of nitrification in trickling filters using different filter media. *Aquacult. Eng.* **21 (3)**: 181-199.
- Lewis, W.M., Morris, D.P.** (1986) Toxicity of nitrite to fish: A review. *Transactions of the American Fisheries Society* **115**: 183-195.
- Ling, J., Chen, S.** (2005) Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters. *Aquacult. Eng.* **33 (2)**: 150-162.
- Loveless, J.E., Painter, H.A.** (1968). The influence of metal ion concentrations and pH value on the growth of a *Nitrosomonas* strain isolated from activated sludge. *J. Gen. Microbiol.* **52**: 1-14.
- Loyo-Rosales, J.E., Rosales-Rivera, G.C., Lynch, A.M., Rice, C.P., Torrents, A.** (2004) Migration of nonylphenol from plastic containers to water and a milk surrogate. *J. Agric. Food Chem.* **52 (7)**: 2016-20.
- Lydmark, P., Lind, M., Sörensson, F., Hermansson, M.** (2006) Vertical distribution of nitrifying populations in bacterial biofilms from a full-scale nitrifying trickling filter. *Environmental Microbiology* **8 (11)**: 2036-2049.

- Manthe, D.P., Malone, R.F., Kumar, S.** (1984) Limiting factors associated with nitrification in closed blue crab shedding systems. *Aquacult Eng.* **3**: 119-140.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H.** (1992) Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* **15**: 593-600.
- Matsumura, M., Yamamoto, T., Wang, P., Shinabe, K., Yasuda, K.** (1997) Rapid nitrification with immobilized cell using macro-porous cellulose carrier. *Water Research* **31** (5): 1027-1034.
- McCaig, A.E., C. J. Phillips, J.R. Stephen, G.A. Kowalchuk, S. M. Harvey, R.A. Herbert, M. Embley, J.I. Prosser** (1999) Nitrogen cycling and community structure of Proteobacterial β -subgroup ammonia-oxidizing bacteria within polluted marine fish farm sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 213-220.
- Meincke, M., Bock, E., Kastrau, D., Kroneck P.M.H.** (1992) Nitrite oxidoreductase from *Nitrobacter hamburgensis*: redox centers and their catalytic role. *Arch. Microbiol.* **158**: 127-131.
- Mobarry, B.K., Wagner, M., Urbain, V., Rittmann, B.E., Stahl, D.A.** (1996) Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl Environ Microbiol* **62**: 2156-2162.
- Muyzer, G., Brinkhoff, T., Nübel, U., Santegoeds, C., Schäfer, H., Wawer, C.** (1998) Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) in microbial ecology. *Mol. Microbial. Ecol. Manual* 3.4.4, pp 1-27.
- Nijhof, M., Bovendeur, J.** (1990) Fixed film nitrification characteristics in sea-water recirculation fish culture systems. *Aquaculture* **87** (2): 133-143.
- Okabe, S., Oozawa, Y., Hirata, K., Watanabe, Y.** (1996) Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms and reactor performance at various C:N ratios. *Water Res.* **30**: 1563-1572.
- Okabe, S., Naitoh, H., Satoh, H., Watanabe, Y.** (2002) Structure and function of nitrifying biofilms as determined by molecular techniques and the use of microelectrodes. *Water Sci Technol.* **46**: 233-241.
- Painter, H.A.** (1986) Nitrification in the treatment of sewage and waste-waters. *In: Nitrification*. Prosser, J.I. (Ed.), pp. 185-211. IRL Press Oxford Washington DC.
- Philips, S., Laanbroek, H.J., Verstraete, W.** (2002) Origin, causes, and effects of increased nitrite concentrations in aquatic environments. *Rev. Environ. Sci Biotechnol.* **1**: 115-141.
- Piedrahita, R.H.** (2003) Reducing the potential environmental impact of tank aquaculture effluents through intensification and recirculation. *Aquaculture* **226**: 35-44.
- Principi, P., Villa, F., Bernasconi, M., Zanardini, E.** (2006) Metal toxicity in municipal wastewater activated sludge investigated by multivariate analysis and in situ hybridization. *Water Research* **40** (1): 99-106.
- Purkhold, U., Pommerening-Roser, A., Juretschko, S., Schmid, M.C., Koops, H.P., Wagner, M.** (2000) Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and *amoA* sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 5368-5382.
- Purkhold, U., Wagner, M., Timmermann, G., Pommerening-Roser, A., Koops, H.P.** (2003) 16S rRNA and *amoA*-based phylogeny of 12 novel betaproteobacterial ammonia-oxidizing isolates: extension of the dataset and proposal of a new lineage within the nitrosomonads. *Int J Syst Evol Microbiol.* **53**: 1485-1494.

- Rostron, W. M., Stuckey, D.C., Young, A. A.** (2001) Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilisation media. *Water Research*, **35 (5)**: 1169-1178.
- Sadiki, A., Williams, D. Carrier, R., Thomas, B.** (1996) Pilot study on the contamination of drinking water by organotin compounds from PVC materials. *Chemosphere*, **32(12)**: 2389-98.
- Sakano, Y., Kerkhof, L.** (1998) Assessment of changes in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools. *Appl Environ Microbiol.* **64**: 4877-4882.
- Sandu, S.I., Boardman, G.D., Watten, B.J., Brazil, B.L.** (2002) Factors influencing the nitrification efficiency of fluidized bed filter with a plastic bead medium. *Aquacult. Eng.* **26 (1)**: 41-59.
- Satoh, H., Nakamura, Y., Okabe, S.** (2007) Influences of Infaunal Burrows on the Community Structure and Activity of Ammonia-Oxidizing Bacteria in Intertidal Sediments *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1341-1348.
- Schmidt, E.L., Belser, L.W.** (1982) Nitrifying bacteria. In *Methods of soil analysis properties*. Miller, R.H., and Keeney, D.R. (eds). Madison: Am. Soc. Agron., pp. 1027-1042.
- Schön, G.** (1965). Untersuchungen über den Nutzeffekt von *Nitrobacter winogradskyi* Buch. *Arch. Mikrobiol.* **50**: 111-132.
- Schramm, A., DE Beer, D., van den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., Amann, R.** (1999) Microscale distribution of populations and activities of *Nitrosospira* and *Nitrospira* spp. along a microscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by *in situ* hybridization and the use of microsensors. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3690-3696.
- Skjevrak, I., Due, A., Gjerstad, K.O., Herikstad, H.** (2003) Volatile organic components migrating from plastic pipes (HDPE, PEX and PVC) into drinking water. *Water Res.* **37(8)**: 1912-20.
- Skjevrak, I., Lund, V., Ormerod, K., Herikstad, H.** (2005) Volatile organic compounds in natural biofilm in polyethylene pipes supplied with lake water and treated water from the distribution network. *Water Res.* **39 (17)**: 4133-41.
- Spieck, E., Hartwig, C., McCormack, I., Maixner, F., Wagner, M., Lipski, A., Daims, H.** (2006) Selective enrichment and molecular characterization of a previously uncultured *Nitrospira*-like bacterium from activated sludge. *Environ Microbiol.* **8**: 405-415.
- Sugita, H., Nakamura, H., Shimada, T.** (2005) Microbial communities associated with filter materials in recirculating aquaculture systems of freshwater fish. *Aquaculture* **243**: 403-409.
- Tal, Y., Watts, J.E.M., Schreier, S.B., Sower, K.R., Schreier, H.J.** (2003) Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system. *Aquaculture* **215 (1-4)**: 187-202.
- Tanaka, Y., Takahashi, K., Sasao, T., Kirigava, T., Hosoi, S., Nagaoka, N., Kawamura, T., Nakazawa, H.** (2003) Detection of tris(2,4-di-tert-butylphenyl) phosphate (Irgafos 168, antioxidant in plastics) and its oxide in commercial frozen vegetables. *Shokuhin Eiseigaku Zasshi*, **44 (4)**: 181-5.
- Teske, A., Alm, E., Regan, J.M., Toze, S., Rittmann, B.E., Stahl, D. A.** (1994) Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. *J. Bacteriol* **176**: 6623–6630.
- Thörn, M., Mattsson, A., Sörensson, F.** (1996) Biofilm development in a nitrifying trickling filter. *Water Science and Technology* Vol **34** No **1-2** pp 83–89.

Umweltbundesamt (2005) Leitlinie des Umweltbundesamtes zur veränderten Durchführung der KTW-Prüfungen bis zur Gültigkeit des europäischen Akzeptanzsystems für Bauprodukte im Kontakt mit Trinkwasser, 16 Seiten.

Vanparys, B., Heylen, K., Wittebolle, L., Geets, J., Verstraete, W., Boon, N., De Vos, P. A limited diversity of nitrifiers in a commercial nitrifying product is accompanied by a diverse heterotrophic community. Aquaculture, submitted.

Van Rijn, J., Rivera, G. (1990) Aerobic and anaerobic biofiltration in a aquaculture unit – Nitrite accumulation as a result of nitrification and denitrification. Aquacult. Eng. **9 (4)**: 217-234.

Verhagen, F.J., Laanbroek, H.J. (1991) Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. Appl Environ Microbiol. **57**: 3255-3263.

Voytek, M.A., Ward, B.B. (1995) Detection of Ammonia-Oxidizing Bacteria of the Class Proteobacteria in Aquatic Samples with the PCR. Appl. Env.Microbiol. **61**: 1444-1450.

Wanner, O., Gujer, E. (1985) Competition in biofilms. Water Sci Technol. **17**, 27-44.

Wagner, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.-P., Schleifer, K.-H. (1995) In situ identification of ammonia-oxidizing bacteria. Syst. Appl. Microbiol. **18**: 251-264.

Watermann, B.T., Daehne, B., Sievers, S., Dannenberg, R., Overbeke, J.C., Klijnstra, J.W., Heemken, O. (2005) Bioassays and selected chemical analysis of biocid-free antifouling coatings. Chemosphere **60**: 1530-1541.

Watson, S.W., Bock, E., Valois, F.W., Waterbury, J.B., Schlosser, U. (1986) *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. Arch Microbiol **144**: 1-7.

Watson, S.W., Bock, E., Harms, H., Koops, H.-P., Hooper, A.B. (1989) Nitrifying bacteria. In: Staley, J.T., Bryant, M.P., Pfennig, N., and Holt, J.G. (Eds), Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1th Ed., Vol **3**, pp. 1808-1834. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Wijeyekoon, S., Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T. (2004) Effects of substrate loading rate on biofilm structure. Water Research **38 (10)**: 2479-2488.

Welle, F. (2005) Post-consumer contamination in high-density polyethylene (HDPE) milk bottles and the design of a bottle-to-bottle recycling process. Food Addit. Contam. **22 (10)**: 999-1011.

Wiegel, S. (2002) Einfluss der Temperatur auf die Ammoniak oxidierende Population eines Biofilmreaktors und auf Reinkulturen von *Nitrosomonas eutropha*. Dissertation Universität Hamburg.