

2H Kunststoff GmbH, Wettringen

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

Abschlussbericht über ein Entwicklungsprojekt,
gefördert unter dem Az: 23821/02 von der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt

von

Sabine Keuter, Burkhard T. Watermann, Jürgen Schrötz, Myriam Kruse,
Eva Spieck

Hamburg, Oktober 2010

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



AZ	23821/02	Referat	23	Fördersumme	219.020,00 €
----	-----------------	---------	-----------	-------------	---------------------

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

Stichworte Abwasser, Kreislauf

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
24 Monate	27.09.07	31.05.10	2

Zwischenberichte

Bewilligungsempfänger **2H Kunststoff GmbH**
Dieselweg 5

Tel 02557-9390-0
Fax 025579390-49

Projektleitung
Herr Ralf Wolbeck

Bearbeiter

48493 Wettringen

Kooperationspartner

Ecomares, später EAP
GMA Gesellschaft für marine Aquakultur, Büsum
Universität Hamburg, Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie
LimnoMar, Hamburg

Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Bei wachsendem wirtschaftlichem und ökologischem Interesse an Aquakulturen fokussiert sich die angewandte Anlagentechnik zunehmend auf nachhaltige Produktionsverfahren mit integrierter Wasseraufbereitung („Kreislaufanlagen“). Für die verfahrenstechnische Umsetzung eines wesentlichen Prozesses der biologischen Wasseraufbereitung - die bakterielle Nitrifikation (Oxidation der fischtoxischen Stickstoffverbindungen Ammonium und Nitrit zum wesentlich unschädlicheren Nitrat) - fehlen gesicherte Kennzahlen für die Auslegung und den Betrieb, denn besonders in der Startphase eines Biofilters kann es zu der Akkumulation von Ammonium oder Nitrit kommen. Ziel des Projektes ist es, durch verbesserte Zusammensetzung der im **Bewegtbett-Filterverfahren** eingesetzten Trägermaterialien die **Anheftung und die Abbauaktivität der Nitrifikanten** zu fördern.

Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

In der 2. Projektphase werden basierend auf den Erkenntnissen der 1. Phase verschiedene Kunststoffe und Zuschläge auf ihre Eignung für Marikultur-Kreislaufanlagen überprüft. Dies geschieht im Labormaßstab mit Zellen und nitrifizierenden Anreicherungskulturen aus den laufenden Anlagen der Firma Ecomares bzw. GMA und mit geeigneten Referenzorganismen. Die Populationsanalysen und Kurzzeitaktivitätstests mit Nitrifikanten aus der Anlage Büsum werden auf Biofilter der Garnelenfarm in Strande bei Kiel ausgeweitet, wo ein geringerer Salzgehalt und eine höhere Temperatur eingesetzt werden.

Die sukzessive Anheftung von Bakterien auf neue Kunststoffe (Startphase) soll mittels verschiedener Methoden der molekularen Mikrobiologie und dem Einsatz von Rasterkraft- und Elektronenmikroskopie analysiert und dokumentiert werden. Letzteres ermöglicht eine Kooperation mit der Universität Duisburg-Essen.

In Hinblick auf eine mögliche Beeinträchtigung des Umsatzes im Biofilter wird die Toleranz gegenüber dem Stoffwechselprodukt Nitrat an Referenzorganismen und Anreicherungen aus den Anlagen in Strande und Büsum getestet. Vorversuche sollen zeigen, ob eine Denitrifikationseinheit die Leistung des Biofilters steigern könnte. Desweiteren sollen Aktivitätstest mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen zeigen, ob die Luftzufuhr in die Biofilter besser eingestellt bzw. reduziert werden kann.

Ergebnisse und Diskussion

In der 2. Phase des Projektes wurden die Versuche zur Nitrifikation bei der Wasseraufbereitung in Kreislaufanlagen der Marikultur und deren Beeinflussung durch verschiedene Kunststoffe fortgesetzt. Es wurde ein Bewertungsschema entwickelt, um in Wachstumsversuchen den Einfluss von Kunststoffgranulaten auf die Nitrifikation zu testen. Dabei zeigte sich, dass Polypropylen (PP) mit Glasfasersatz in weiß (30% GF) und recycelt (40% GF) die geringste Hemmung aufwies. High Density Polyethylen (HDPE) als A-ware (weiß) bzw. recyceltes Material (schwarz) ist ebenfalls als Trägermaterial geeignet, während sich vier weitere Kunststoffe negativ auf die Ammoniak- und Nitritoxidation auswirkten. Die Anheftung von nitrifizierenden Bakterien auf Polypropylen-Folien konnte mittels eines AFM (Atomic Force Microscope) visualisiert und quantifiziert werden, wobei diese bei einem Talkumzusatz (20%) besser war als bei einem Zusatz von Glasfasern (20%).

Die potentielle Abbauleistung der Nitrifikanten dokumentiert den Betriebsverlauf der Anlagen in Büsum und Strande, da die gemessene Aktivität die jeweilige Belastung widerspiegelt. Nitrit-oxidierende Bakterien erwiesen sich dabei als stabiler und aktiver als Ammoniak oxidierende Bakterien, da die NOB ein bis zu dreimal so großes Nitrifikationspotential entwickeln können als die AOB im gleichen Filter und sie verzögerter auf einen Belastungsabfall und -anstieg reagieren.

Untersuchungen zum Einfluss von Nitrat auf Kulturen von Nitrit oxidierenden Bakterien zeigten, dass Vertreter von *Nitrospira* stärker gehemmt werden als die von *Nitrobacter*. Die Aktivitätstests mit verschiedenen Nitratkonzentrationen haben gezeigt, dass die Aktivität der Nitrit-oxidierenden Bakterien auf den FK durch Konzentrationen von bereits 1,5 mM Nitrat eingeschränkt werden kann. Dieser Wert wird nicht selten in RAS überschritten.

Vorversuche zum Ablauf der Nitrifikation in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck im Labormaßstab haben deutlich gemacht, dass die Ammoniakoxidation bei 6-8 mg O₂/l ungehindert abläuft, während sie bei geringeren Werten verlangsamt wird. Bei Sauerstoffkonzentrationen unter 3 mg/l treten sogar Nitritpeaks als unerwünschte Begleiterscheinung auf. Generell kommen Nitrifikanten aber mit viel geringeren Sauerstoffkonzentrationen aus, als die in den Anlagen vorherrschenden.

Auch ohne Zugabe von organischen Substraten erfolgte eine Denitrifikation von 6,5 mM Nitrat in Laboransätzen mit bewachsenen Füllkörpern aus Büsum unter mikroaerophilen bis anaeroben Verhältnissen. In Versuchsansätzen mit weniger Nitrat (0,3 bzw. 1,5 mM) und Proben aus Strande konnte nur durch die Zugabe von Acetat das Nitrat vollständig zu gasförmigen Stickstoffverbindungen reduziert werden. Die Denitrifikationskapazität ist von der Belastung des Biofilters abhängig. Die Füllkörper selbst stellen keine Organik-Quelle für Denitrifikation dar.

Die bisherige Charakterisierung der Mikroorganismen durch verschiedene Methoden zeigte, dass *Nitrospira* in den untersuchten Habitaten eine zentrale Rolle übernimmt. In Strande und auch in Büsum sind sie durch mehrere Arten vertreten, was durch die Fettsäureanalytik bestätigt wurde. Die beiden verschiedenen Arten von *Nitrospira* machen 3-8% der Biofilmmasse auf den Füllkörpern aus. Die Isolierung eines Stammes aus der Anlage in Büsum ist bereits geglückt. Der Hauptvertreter der Ammoniakoxidanten wurde als *Nitrosomonas* (verwandt mit *Nm marina* bzw. *Nm aestuarii*) identifiziert, wobei sowohl in Strande als auch in Büsum eine diverse Population von mehreren Gattungen und Arten vorliegt.

Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Poster: VAAM 2008 (Frankfurt), European Aquaculture 2008 (Krakau), VAAM 2009 (Bochum)

Vorträge: VAAM 2007 (Osnabrück), DECHEMA 2009, DBU Sommerakademie 2009, VAAM 2010 (Hannover),

Messeauftritt: IFAT 2010 (Stand der DBU)

Publikation: "A robust strain of *Nitrospira* isolated from a marine recirculation aquaculture system", Keuter, Kruse, Lipski, Spieck (in Arbeit)

Fazit

Die bakterielle Nitrifikation in marinen RAS ist von essentieller Bedeutung für eine funktionierende Abwasserreinigung und damit für die Gesundheit der Fische. Die aktuelle Abbauleistung von Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) und Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) kann jedoch durch hemmende Einflüsse vermindert werden. Dies sind die für die Füllkörper verwendeten Kunststoffe und besonders bei den NOB eine zu hohe Nitratanhäufung im Biofilterwasser. Unsere Versuche konzentrierten sich auf die Bewertung ausgewählter Polymere und Zuschlagstoffe in Hinblick auf eine mögliche Hemmung der Aktivität und der Anheftung der Nitrifikanten. Weitere zu berücksichtigende Aspekte sind die Denitrifikation und die Reduzierung der Belüftung. Die Hauptvertreter der nitrifizierenden Bakterien konnten identifiziert, zum Teil isoliert und physiologisch charakterisiert werden. Damit wurden die Voraussetzungen zur Untersuchung einzelner Parameter im Labor geschaffen.

Inhaltsverzeichnis:

Kapitel		Seite
1	Einleitung	1
2	Zusammenfassung Phase I	4
3	Vergleich verschiedener Kunststofftypen auf eine mögliche Hemmung der nitrifizierenden Bakterien durch darin enthaltene chemische Zusätze	5
4	Untersuchungen zur Anheftung von nitrifizierenden Bakterien auf verschiedenen Kunststoffen	21
5	Quantifizierung der Nitrifikationsleistung der FK aus den Anlagen Strande und Büsum	43
6	Untersuchung des Einflusses von Nitrat auf marine Ammoniak- und Nitrit-oxidierende Bakterien in Laboransätzen	51
7	Optimierung der Ammoniak- und Nitritoxidation in den aktuellen Biofiltern durch Variation der Betriebsparameter	58
8	Experimente zur Denitrifikationsleistung der FK aus den Anlagen Strande und Büsum	63
9	Charakterisierung der nitrifizierenden Mikroorganismen in den Anlagen Strande und Büsum	67
10	Fazit	87
11	Literaturverzeichnis	91

Abkürzungsverzeichnis :

AFM	atomic force microscope
AOB	Ammoniak-oxidierende Bakterien
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DGGE	Denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese
EFM	Epifluoreszenzmikroskop
EM	Elektronenmikroskop
FISH	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung
FK	Füllkörper
HDPE	high-density Polyethylen
HPLC	high performance liquid chromatography
LDPE	low-density Polyethylen
NOB	Nitrit-oxidierende Bakterien
PCR	polymerase chain reaction
PE	Polyethylen
PP	Polypropylen
RAS	re-circulation aquaculture system
REM	Rasterelektronenmikroskop
TAN	total ammonia nitrogen

Zusammenfassung

In der 2. Phase des Projektes wurden die Versuche zur Nitrifikation bei der Wasseraufbereitung in Kreislaufanlagen der Marikultur und deren Beeinflussung durch verschiedene Kunststoffe fortgesetzt. Daraus können folgende Schlussfolgerungen gezogen werden:

- 1) Es wurde ein Bewertungsschema entwickelt, um in Wachstumsversuchen den Einfluss von Kunststoffgranulaten auf die Nitrifikation zu testen. Es zeigte sich, dass Polypropylen (PP) mit Glasfaserzusatz in weiß (30% GF) und recycelt (40% GF) die geringste Hemmung aufwies. High Density Polyethylen (HDPE) als Neuware (weiß) bzw. recyceltes Material (schwarz) ist ebenfalls als Trägermaterial geeignet, während sich vier weitere Kunststoffe negativ auf die Ammoniak- und Nitritoxidation auswirkten.
- 2) Die Anheftung von nitrifizierenden Bakterien auf Polypropylen-Folien konnte mittels eines AFM (Atomic Force Microscope) visualisiert und quantifiziert werden, wobei diese bei einem Talkumzusatz (20%) besser ist als bei einem Zusatz von Glasfasern (20%).
- 3) Die potentielle Abbauleistung der Nitrifikanten dokumentiert den Betriebsverlauf der Anlagen in Büsum und Strande, da die gemessene Aktivität die jeweilige Belastung widerspiegelt. Nitrit-oxidierende Bakterien erwiesen sich dabei als stabiler und aktiver als Ammoniak oxidierende Bakterien.
- 4) Untersuchungen zum Einfluss von Nitrat auf Kulturen von Nitrit oxidierenden Bakterien zeigten, dass Vertreter von *Nitrospira* stärker gehemmt werden als die von *Nitrobacter*. Obwohl die hemmenden Nitratkonzentrationen in der Praxis nicht relevant sind, ist die Beeinträchtigung von Biofilmzellen auf den Füllkörpern größer als die von Laborkulturen.
- 5) Vorversuche zum Ablauf der Nitrifikation in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck im Labormaßstab haben deutlich gemacht, dass die Ammoniakoxidation bei 6-8 mg O₂/l ungehindert abläuft, während sie bei geringeren Werten verlangsamt wird. Bei Sauerstoffkonzentrationen unter 3 mg/l treten sogar Nitritpeaks als unerwünschte Begleiterscheinung auf.
- 6) Auch ohne Zugabe von organischen Substraten erfolgte eine Denitrifikation von 6,5 mM Nitrat in Laboransätzen mit bewachsenen Füllkörpern aus Büsum unter mikroaerophilen bis anaeroben Verhältnissen. In Versuchsansätzen mit weniger Nitrat (0,3 bzw. 1,5 mM) und Proben aus Strande konnte nur durch die Zugabe von Acetat das Nitrat vollständig zu gasförmigen Stickstoffverbindungen reduziert werden. Die Denitrifikationskapazität ist von der Belastung des Biofilters abhängig. Die Füllkörper selbst stellen keine Organik-Quelle für Denitrifikation dar.
- 7) Die dominierenden Nitritoxidanten konnten zwei verschiedenen Arten von *Nitrospira* zugeordnet werden, die 3-8% der Biofilmmasse auf den Füllkörpern ausmachen. Der Hauptvertreter der Ammoniakoxidanten wurde als *Nitrosomonas* identifiziert, wobei sowohl in Strande als auch in Büsum eine diverse Population von mehreren Gattungen und Arten vorliegt.

Physiologische, mikroskopische, molekularbiologische und chemische Untersuchungen haben viele Aspekte der Biofiltration in Kreislaufanlagen der Aquakultur klären können. Aufgrund der Komplexität der Fragestellungen sind jedoch noch weitere Experimente notwendig, um die Nitrifikation in Bezug auf die verwendeten Trägermaterialien zu optimieren.

Einleitung

Das von der DBU seit Mai 2006 finanziell geförderte Projekt „Entwicklung neuartiger Trägermaterialien für die Wasseraufbereitung und Kreislaufführung in Marikultur-Produktionsanlagen der Fischzucht“ läuft seit September 2007 in seiner zweiten Phase. Dieser Zwischenbericht informiert über die Ergebnisse bis dato (August 2009) und über noch anstehende Versuche und neue Fragen, die bei den Untersuchungen von potentiellen Trägermaterialien und anderen Faktoren der Nitrifikation in Kreislaufanlagen aufgeworfen wurden.

Die Aquakultur insgesamt erlebt seit einigen Jahren einen Boom wie keine zweite Branche in der Lebensmittelproduktion (FAO, 2007; Schulz et al., 2005). In den entwickelten Ländern gehören 75% der produzierten Fische zu höherwertigen Fischarten, die in intensiv betriebenen Anlagen produziert werden (FAO, 2007).

Intensive Aquakulturen verbrauchen viel Wasser und produzieren viele Abfallprodukte, besonders eutrophierende Stickstoffverbindungen (1 kg Futter produziert ca. 30 g Stickstoff), die bei Durchflussanlagen in das nächstliegende Gewässer entsorgt werden. Durch die Kreislauftechnologie kann dagegen mehr als 90% des Wassers aufgereinigt werden und den Produktionsbecken wieder zugeführt werden. Weitere Vorteile der Kreislaufsysteme sind eine saisonunabhängige Produktion, die Verminderung von eingebrachten Krankheitserregern, die Reduktion von Medikamenten sowie kontrollierte Hälterungsbedingungen und damit höhere Bestandsdichten. Die Wasseraufreinigung erfolgt in den Biofiltern der Anlagen durch nitrifizierende Mikroorganismen, die die Stickstoffverbindungen Ammonium und Nitrit in das weniger toxische Nitrat umwandeln. Besonders in der Startphase eines Biofilters, jedoch auch im späteren Verlauf, können Verminderungen der Nitrifikationsleistung zu Ammonium- oder Nitritpeaks führen. Beide Verbindungen sind in bestimmten Konzentrationen toxisch für die gehälterten Organismen (Fische, Shrimps, etc). Um diese Unsicherheit in der Kreislauftechnologie, deren Investitionen im Gegensatz zu anderen Aquakultursystemen sehr hoch sind, auszuschließen, wird zunehmend an der „Black-Box“ Biofilter geforscht.

Um die erwünschten nitrifizierenden Bakterien im Biofilter zurückhalten zu können, werden so genannte Füllkörper (FK) eingesetzt, die die Aufwuchsfläche für die Mikroorganismen darstellen. Es handelt sich hierbei um dreidimensionale Strukturen aus Kunststoff, die in den Biofiltern von Rezirkulationsanlagen im Wasser schweben und durch Einströmung von Luft verwirbelt werden (moving-bed- oder Schwebbettverfahren). Der Ansatz des laufenden Projektes ist die Erforschung der Anheftung der Nitrifikanten auf diesen Kunststoffen und einer möglichen Hemmwirkung dieser auf die Nitrifikation. Den Kunststoffen werden aus materialtechnischen (Langlebigkeit) und verarbeitungstechnischen Gründen (Extrudierfähigkeit) von den Herstellern Additive wie Katalysatoren und Weichmacher beigemischt. Deren teils biozide Eigenschaften können in der Anwendung als Biofilter erhebliche Probleme bereiten.

Das primäre Ziel ist daher die Entwicklung eines Füllkörpers, der durch Zusätze für die nitrifizierenden Bakterien besonders attraktiv ist, oder zumindest nicht hemmend wirkt. Es gibt einige Hinweise in der Literatur, dass Nitrifikanten auf bestimmten Stoffen (z.B. Bentonit, Montmorillonit, Kalkstein, CaCO_3 , Cellulose) besonders gut

anheften (Diab und Shilo 1988; Kim et al., 1997; Teixeira et al., 1998a). Des Weiteren finden sich ebenfalls Veröffentlichungen über Kunststoffe in Aquakulturanlagen, deren Inhaltsstoffe nicht nur auf die Nitrifikanten sondern sogar für die gehälterten Shrimps toxische Wirkung hatten (Horowitz et al., 2001). Vorversuche in der Phase I haben gezeigt, dass Kunststoff-Granulate in den Medien die Nitrifikation hemmen. In der zweiten Phase wurden Hemmtests unter verschiedenen Bedingungen fortgeführt, wobei insgesamt acht Kunststoffe, die zum Teil Beimengungen von Glasfasern oder Talkum enthielten, verglichen. Parallel erfolgten schwerpunktmäßig an der Universität Duisburg Versuche zu Anheftung von Ammoniak- und Nitrit-oxidierenden Bakterien an Folien aus den gleichen Kunststoffen. Zur Visualisierung der angehefteten Zellen diente ein AFM (Atomic Force Microscope), welches gekoppelt an ein Fluoreszenzmikroskop gleichzeitig die Identifizierung der Mikroorganismen ermöglichte.

Ein weiterer Schwerpunkt des laufenden Projektes ist die Charakterisierung der an der Nitrifikation in den untersuchten Kreislaufanlagen beteiligten Mikroorganismen und die Untersuchung relevanter physiologischer Eigenschaften dieser, wie die Hemmung durch Nitrat, welches sich im Laufe der Zeit im Hälterungswasser aufkonzentriert. Die Charakterisierung der Nitrifikanten wird mit den bekannten Methoden aus der Molekularbiologie sowie Fettsäureanalysen und elektronenmikroskopisch durchgeführt. Die Zellen stammen aus Naturproben des Biofilms und aus Anreicherungen der Nitrifikanten aus den Biofiltern der Ecomares-Anlagen in Strande und Büsum.

Schon in der ersten Phase zeigten Versuchsergebnisse, dass die Nitrifikation durch das Biofilterwasser gehemmt wurde. Es wurde damals vermutet, dass dies mit der hohen Nitratkonzentration in den Biofiltern zusammenhängt. Daher wurde die Aktivität von verschiedenen Ammoniak- und Nitrit-oxidierenden Bakterien bei hohen Nitratkonzentrationen untersucht. Um die Nitratwerte in den Biofiltern zu verringern, wurde ebenfalls über den Einbau einer Denitrifikationsstufe diskutiert und einige Vorversuche zu dieser Thematik durchgeführt.

Weitere Untersuchungen sollen klären, ob durch Variation weiterer Parameter wie der Sauerstoffkonzentration in den Anlagen die Nitrifikation bei gleichzeitiger Energieeinsparung verbessert werden könnte. In diesem Zwischenbericht werden die hier genannten Themen in den jeweiligen Kapiteln vertieft und die bisherigen Ergebnisse dargestellt.

Projektpartner:

GEA 2H Water Technologies (Antragsteller und Bewilligungsempfänger)

Die Firma GEA 2H Water Technologies GmbH in Wettringen wurde 1988 gegründet und entwickelte und produzierte Füllkörper aus den verschiedensten Materialien wie z.B. PP, PVDF und PVC. Anwendungsbereiche finden sich in der Abwassereinigung (Aquakultur, kommunal und industriell), Abluftreinigung und Kühlung. 2005 wurde das Familienunternehmen in die GEA Group AG mit Sitz in Bochum eingegliedert und 2008 in GEA 2H Water Technologies GmbH umbenannt. Zur ausführlichen Darstellung des Firmenprofils siehe auch: www.gea-2h.com.

EAP (ehemals Ecomares)

Die Ecomares Marifarm GmbH wurde 1985 unter dem Namen BUTT, Gesellschaft (bR) für marine Fischzucht als Spin-off aus einem Forschungsprojekt in Strande bei Kiel gegründet. Hier wurde neben vielen kleineren Systemen und Becken für Barramundi, Wolfsbarsch, und Flundern auch eine Shrimp-Rezirkulationsanlage mit einem Volumen von 200 Kubikmetern eingerichtet. 1999 gründeten die Butt-Gesellschafter mit weiteren Kommanditisten die ECOMARES GmbH & Co. KG in Büsum, eine Meerwasser-Rezirkulationsanlage mit einer Kapazität von 100 Jahrestonnen Steinbutt. 2003 wurde die Ecomares Gruppe neu gegliedert: Unter einer internationalen Holding sind die Farm in Büsum, eine Aquaculture Engineering GmbH für den Anlagenbau und die MariFarm GmbH mit Schwerpunkt der Forschung und Entwicklung neuer Arten und Technologien eingegliedert. Ende 2007 musste ein Insolvenzantrag gestellt werden und die beiden Betriebe wurden im Mai 2008 von der EAP Aquaculture AG übernommen. Die Anlage in Büsum stand seit 2008 leer, nur in Strande wurde die Shrimpsanlage weitergeführt.

Limnomar

LimnoMar wurde im September 1991 von Dr. Watermann als unabhängiges Labor für limnische und marine Forschung und vergleichbare Pathologie gegründet. Der Sitz des Labors ist Hamburg. Seit 2002 verfügt LimnoMar über eine eigene Bewuchsstation im Hafen von Norderney. LimnoMar ist auf dem Gebiet der aquatischen Toxikologie/Pathologie und der Antifoulingforschung tätig. In zahlreichen Forschungsvorhaben standen sowohl bewuchsverhindernde wie bewuchsfördernde Inhaltsstoffe von Polymeren im Zentrum der Untersuchungen. (www.limnomar.de)

Universität Hamburg und Duisburg

In der Arbeitsgruppe von PD Dr. E. Spieck in der Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie der Uni Hamburg liegt eine jahrzehntelange Erfahrung in der Kultivierung nitrifizierender Bakterien vor. Im Rahmen einer Kooperation mit der Universität Osnabrück (DFG SP 667/3-1) werden dort von Myriam Kruse Markierungen spezifischer Fettsäuren für *Nitrospira* durchgeführt, um Rückschlüsse auf die Aktivität Kohlenstoff-autotropher Organismen ziehen zu können.

Die Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Wolfgang Sand in Duisburg beschäftigt sich mit der Problematik der unerwünschten Biofilmbildung sowie der mikrobiellen Materialzerstörung. Für das Projekt werden in Duisburg Anheftungsversuche mittels bildgebender Verfahren durchgeführt (AFM/EFM).

Zusammenfassung Phase I

In der 1. Phase des beantragten Projektes (Mai 2006 – September 2007) wurde die Population der nitrifizierenden Bakterien auf den Füllkörpern der Biofilter der Ecomares MariFarm in Büsum erfolgreich quantifiziert, identifiziert und in Kultur gebracht. Ammoniak oxidierende Bakterien wurden *Nitrosomonas cryotolerans* und Vertreter einer neuen Linie von marinen *Nitrosomonaden* zugeordnet. Darüber hinaus gibt es Hinweise auf das Vorkommen von Vertretern der Gattung *Nitrosococcus* und *Nitrosospira*. Im Gegensatz zu dieser komplexen Population an Ammoniakoxidanten dominiert im Biofilm eine bislang unbekannte Art von *Nitrospira* als Vertreter der Nitritoxidanten. Zellen von *Nitrobacter* wurden nur in Einzelfällen angetroffen.

Wie Kurzzeitaktivitätstests mittels HPLC gezeigt haben, sind die Nitrifikanten aus Büsum gut an die Betriebstemperatur von 17 °C und die aus Strande an 26 °C angepasst. Unter optimalen Laborbedingungen sind die Nitritoxidanten etwa dreimal so aktiv wie die Ammoniakoxidanten. Beide Bakteriengruppen werden unter Laborbedingungen von hohen Substratkonzentrationen bis 10 mM nicht gehemmt. Es gibt aber Hinweise auf eine Beeinträchtigung der Aktivität bei erhöhten Nitratkonzentrationen, wie sie im Wasser der Biofilters vorkommen.

Die Struktur des nitrifizierenden Biofilms wurde elektronenmikroskopisch dargestellt. Sowohl Ammoniak als auch Nitrit oxidierende Bakterien kommen in dichtgepackten Mikrokolonien in enger Nachbarschaft vor. Dort können sie auch ungünstige Perioden überdauern. Mittels spezifischer Antikörper und Gensonden wurden verschiedene Vertreter identifiziert und nach Analyse der 16S rRNA phylogenetisch eingeordnet. Es wurden selektive Verdünnungsreihen angelegt, um Vertreter beider Gruppen zu isolieren.

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 fabrikneuen, weißen Granulaten am stärksten ausgeprägt.

Eine systematische 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). 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. Eine Nitritabnahme konnte in den Biofiltern nicht nachgewiesen werden.

Wie Vorversuche gezeigt haben, sind denitrifizierende heterotrophe Bakterien im Biofilm der Füllkörper auch ohne Zusatz organischer Substanzen aktiv, sobald die Sauerstoffzufuhr vermindert wird. Es scheinen Kohlenstoffverbindungen aus den Kunststoffen und aus dem Biofilm selbst für die Nitratreduktion zur Verfügung zu stehen. Über welchen Zeitraum dies möglich ist, müssen weitere Versuche zeigen.

3

Vergleich verschiedener Kunststofftypen auf eine mögliche Hemmung der nitrifizierenden Bakterien durch darin enthaltene chemische Zusätze

Übersicht:

- **Einleitung**
- **Problemstellung**
- **Getestete Granulate**
- **Hemmtests**
- **Bewertungssystem Granulat-Hemmtests**
- **Diskussion**

Einleitung

Zur biologischen Abwasserreinigung in Aquarien oder Fischfarmen kommen verschiedene Filter zum Einsatz. Die bekanntesten sind Trickling-, Festbett- und Bewegtbett- (moving bed) Filter. Allen gemeinsam ist die Immobilisierung der nitrifizierenden Bakterien auf Filtermedien (Sand, Steine, Kunststoffkörper, etc.), damit sie nicht ausgewaschen werden, sondern in dem speziell dimensionierten Biofiltersystem das Abwasser reinigen. Dabei sollte den Bakterien eine möglichst große Oberfläche zur Besiedelung angeboten werden bei gleichzeitiger guter Belüftung und Verteilung von Substraten.

Kommerzielle RAS (recirculation aquaculture systems) nutzen häufig Füllkörper aus Kunststoff mit großer Oberfläche (Quadratmeter) pro Volumen (Kubikmeter) (Hutchinson et al., 2004). Auch die Bewegtbett-Biofilter der Anlagen in Strande und Büsum sind bzw. waren mit Füllkörpern aus HDPE befüllt (zu etwa 60%). Die schwarzen Füllkörper „2H-BCN-09“ der Firma GEA 2H Water Technologies sind aus recyceltem HDPE gefertigt und zu 3% mit Ruß versetzt, um die UV- Beständigkeit zu erhöhen (Abbildung 3.1).

Von ihrer Gesamtoberfläche von $8,1 \text{ cm}^2$ pro Stück sind $4,79 \text{ cm}^2$ geschützte Oberfläche. Diese Fläche wird auch die aktive Oberfläche genannt, da sich hier die nitrifizierenden Bakterien dauerhaft ansiedeln. Pro Kubikmeter haben Füllkörper des Typs BCN-09 eine Gesamtfläche von 884 m^2 und eine geschützte Fläche von 484 m^2 . Dank einer Dichte von $0,95 \text{ g/cm}^3$ schweben sie knapp unter der Wasseroberfläche. So verwirbeln sie gut mit der einströmenden Luft (Bewegtbett) und reinigen sich zu einem gewissen Grad selbst. Eine relativ einfache Reinigung der Füllkörper außerhalb des Biofilters ist durch die Handlichkeit der Kunststoffkörper (zum Beispiel im Gegensatz zu Sand) gegeben. Bevor neue Füllkörper in den Biofiltern der Ecomares Anlagen eingesetzt wurden, wurden sie einige Wochen in Süßwasser gespült, um eventuell vorhandenen, herstellungsbedingten Kunststoffabrieb zu entfernen und um die Hydrophobizität der fabrikneuen Füllkörper herabzusetzen.



Abb. 3.1: Neue und stark bewachsene Füllkörper vom Typ BCN 09 der Firma GEA 2H Water Technologies



Problemstellung

Obwohl Kunststoffpolymere weitestgehend inert sind, ist es möglich, dass chemische Zusätze in den Kunststoffen die nitrifizierenden Bakterien hemmen (ausführlichere Informationen im Bericht Phase I). Daher wurde in Phase I ein so genannter Langzeit-Hemmtest entwickelt: Biofilm-Zellen wurden von Füllkörpern aus den Anlagen abgeschüttelt und zusammen mit Granulaten von verschiedenen Kunststoffen (Ausgangsmaterial für BCN-09 recycelt und neu und ein Granulat mit Trinkwasserzulassung) in mineralisches Nitrifikanten-Medium mit relativ hohen Substratkonzentrationen gegeben. Der Verlauf der Kurven, für die die Abnahme von Nitrit bei den NOB bzw. die Zunahme der Produkte der Nitrifikation bei den AOB gegen die Zeit aufgetragen wurden, zeigte, dass sich die Nitrifikation im Beisein der Kunststoffe verlangsamt, und zwar unterschiedlich stark bei unterschiedlichen Materialien. Da es im laufenden Projekt um die Entwicklung neuartiger Kunststoffe für die Abwasserreinigung in marinen Fischfarmen geht, ist es natürlich wichtig festzustellen, welche Kunststoffe am wenigsten hemmen und für die Füllkörper-Produktion zu empfehlen sind.

Getestete Granulate

Für die Langzeit-Hemmtests standen bis zum Zeitpunkt dieser Auswertung insgesamt 8 Kunststoffgranulate zu Verfügung (siehe Abbildung 3.2 und Tabelle 3.1). Die meisten wurden von der Firma GEA 2H Water Technologies gestellt. Schon in der ersten Phase wurden HDPE weiß und HDPE schwarz (recycelt) und HDPE mit Trinkwasserzulassung (TWZ) in den Versuchen eingesetzt. Die anderen Granulate lagen nicht gleichzeitig zu Anfang der 2. Phase vor, daher konnten einige Kunststoffe nur in den letzten Hemmtests erprobt werden.

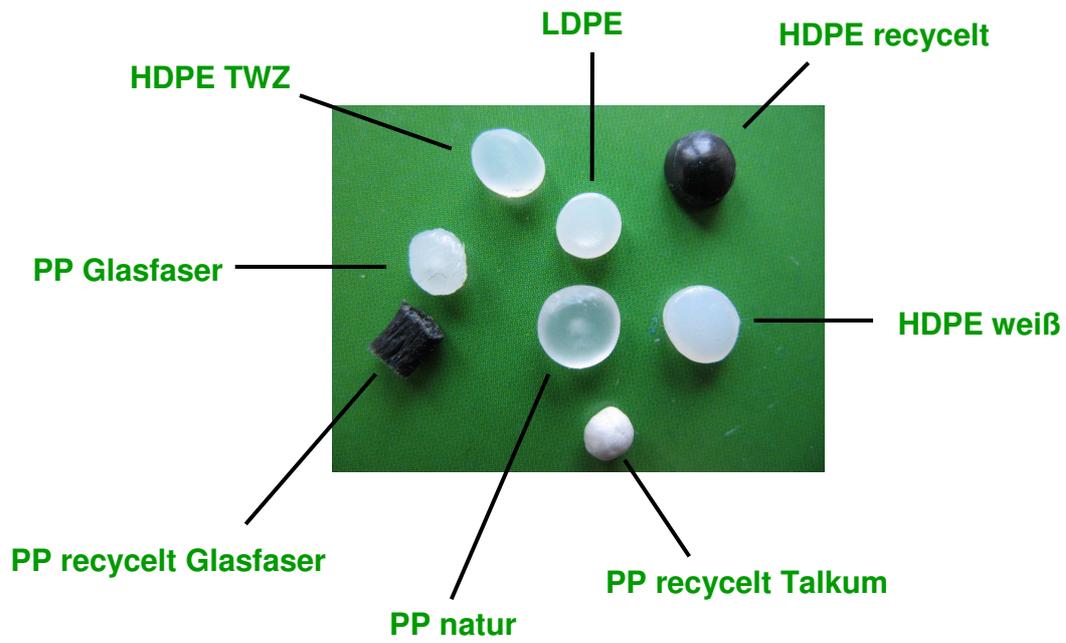


Abb. 3.2: Granulate, die in den Versuchen der Phase II eingesetzt wurden

Tabelle 3.1: Beschreibung und Eigenschaften der Granulate

Granulat	HDPE weiß	HDPE recyc	PP weiß natur	PP weiß Glasfaser	PP recyc Glasfaser	PP recyc Talkum	HDPE TWZ	LDPE weiß
Bemerkung/ Handelsname		~ 8% Ruß	Tipplen	PP H GF 330 (30%GF)	40% GF	AW MB PP T 70 (70%)		
Farbe	weiß	schwarz glänzend	weiß klar	weiß grün-gelblich	gräulich schwarz	weiß, silbrig glänzend	weiß gelblich	weiß klar
Färbung des Wassers	klar	leicht weißlich trüb	klar	weißlich trüb	weißlich trüb	klar	klar gelblich	klar
Oberflächenart	glatt	glatt	glatt	Rillen, Schneide- spuren?	geriffelt, rauh	rel. glatt	glatt	glatt
Gewicht* (g) trocken Mittelwert Std Abweichung	0,231 0,0045	0,2292 0,0188	0,3766 0,0373	0,235 0,0121	0,1744 0,0046	0,1862 0,0031	0,2588 0,0071	0,2628 0,0207
Gewicht* (g) nass Mittelwert Std Abweichung	0,3462 0,0125	0,3864 0,0222	0,4564 0,0394	0,3852 0,02778	0,2818 0,0388	0,3238 0,0626	0,3854 0,0212	0,319 0,0284
Verhältnis Gewicht trocken:nass	1 : 1,52	1 : 1,69	1 : 1,21	1 : 1,64	1 : 1,62	1 : 1,74	1 : 1,49	1 : 1,21
Größe (mm)	d 3,77 h 2,1	d 4,51 h 2,23	d 4,73 h 2,72	d 3,16	u 9** h 3,22	d 2,88	d 4,04 h 2,41	d 3,91 h 2,7
Dichte	schwimmt oben	schwimmt	schwimmt oben	sinkt	beides	sinkt	schwimmt	schwimmt
Oberfläche/ Stk mm²	47,2	63,55	75,56	31,37	40,86**	26,06	56,23	57,18
Benetzung mit Wasser	abweisend	abweisend	abweisend	weniger hydrophob als HDPE	abweisend	abweisend aufgeladen (springen)	abweisend	abweisend

Granulat	HDPE weiß	HDPE recyc	PP weiß natur	PP weiß Glasfaser	PP recyc Glasfaser	PP recyc Talkum	HDPE TWZ	LDPE weiß
Oberfläche/g trocken cm ²	20,4	27,73	20,06	13,35	21,94	14,0	21,73	21,76
Oberfläche/30g trocken cm ²	612	831,9	601,8	400,5	658,3	420	651,9	652,8
Oberfläche/g nass cm ²	13,63	16,45	16,56	8,14	14,50	8,04	14,59	17,92
Oberfläche/30g nass cm ²	408,9	493,5	496,8	244,2	435	241,2	437,7	537,6
g/300cm ² nass	22	18,24	18,11	36,86	20,69	37,31	20,56	16,74
g/300cm ² trocken	14,7	10,82	14,96	22,47	13,67	21,43	30,81	13,79

* Gewicht von 10 Stück

**geschätzt: Oberfläche Ellipse = 5,44mm², Länge= 3,22mm
Umfang 9mm,

Hemmtests

Zur Methodik:

Für die Hemmtests wurden stets 100 ml mineralisches Medium in Erlenmeyerkolben (300 ml) sterilisiert. Je nachdem, ob die Biofilter in Büsum oder Strande auf Hochtouren liefen oder kaum gefüttert wurde, variierten die Substratkonzentrationen. In den meisten Versuchen beliefen sie sich auf 4 oder 5 mM Substrat für AOB als auch NOB. Die Einwaage der Granulate betrug 30 g Nassgewicht, wenn nicht anders beschrieben. Die Zellen für das Inokulum wurden zeitnah aus den Anlagen gewonnen: 100 Füllkörper wurden in sterile Schottflaschen (500 ml) mit 100 ml NaCl (1,5 oder 2%ig) und Glaskügelchen (Boden bedeckt) gezählt und diese dann 2-3 Stunden heftig hin- und hergeschüttelt. Von der Zellsuspension wurden dann 4 oder (meist) 5 ml in die vorbereiteten Kolben pipettiert.

Außer in den ersten beiden Versuchen von Phase II wurden jeweils Parallelen angesetzt. Kolben ohne Zusatz von Granulaten dienten als Kontrollen.

Wenn nicht anders beschrieben, gelten die Ergebnisse für AOB wie für NOB.

Ergebnisse:

Die Substrate in den Kontrollkolben waren in allen Versuchen mit zum Teil sehr großem Unterschied zu den Granulat-Ansätzen am schnellsten verbraucht.

Tests 1 und 2 (ab 02.04.2007 und 11.10.2007)

FK aus Büsum (1) und Strande (2)

In diesen beiden ersten Tests wurde der hemmende Einfluss von schwarzem HDPE, weißem HDPE und HDPE mit Trinkwasserzulassung (TWZ) miteinander verglichen. Dazu kam der Vergleich zwischen „frischem“, also nur kurz gespültem, und schon länger in destilliertem Wasser gespültem Material. Wie in den Versuchen in Phase I zeigte sich, dass das schwarze HDPE im Vergleich zu den anderen beiden Materialien die Nitrifikation am wenigsten hemmt. Besonders bei den NOB verzögerten sich im Vergleich zum schwarzen Granulat die Lag-Phasen in den Kolben mit dem weißen und dem TWZ Granulat. Das TWZ Granulat hemmte stets am meisten, bei den NOB jeweils zusammen mit dem weißen HDPE Granulat, das nicht lange gespült wurde. Beim HDPE mit TWZ verhielt es sich im NOB-Test umgekehrt, im AOB-Test allerdings hemmte das länger gespülte Granulat weniger. Die Spüldauer scheint bei dem schwarzen Granulat keinen Einfluss auf dessen Wirkung auf die Nitrifikation zu haben, während bei dem weißen HDPE jeweils das länger gespülte weniger Hemmwirkung aufwies.

Tests 3 (ab 11.01.2008)

FK aus Strande

Bei diesem Test kamen die Granulate Polyolefin (Polyplast mit 40% Ruß, zum Färben) und Polypropylen recycelt mit Glasfasern (40%) zum Einsatz. Die beiden neuen Granulate waren erst seit einer Woche in Wasser eingelegt - im Gegensatz zu den anderen Granulaten, die bereits seit einem Jahr gespült wurden. Dennoch zeigte

das recycelte PP mit Glasfasern kaum Hemmung, die dazugehörigen Graphen verlaufen zusammen mit den Graphen des HDPE recycelt annähernd so steil wie die der Kontrollen (Abbildung 3.3). Das Polyolefin hemmte in diesem Test ungefähr so stark wie das HDPE weiß. Das TWZ HDPE Granulat (in zwei parallelen Ansätzen) hemmte wieder am stärksten. Da das Polyolefin-Granulat einen hohen Anteil an Ruß hat, färbte es sämtliche Arbeitsgefäße extrem an und wurde für keine weiteren Versuche eingesetzt.

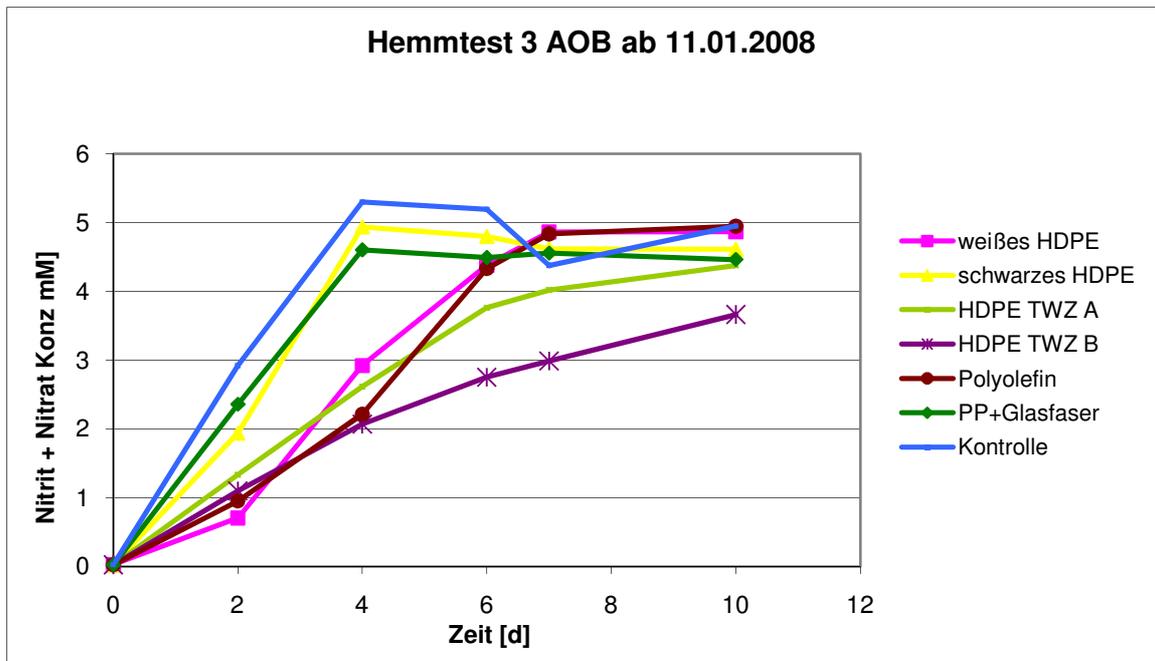


Abb. 3.3: Die Grafik zeigt die Ergebnisse aus dem Hemmtest 3 (AOB). Parallele Ansätze sind mit A und B gekennzeichnet.

Test 4 Hemmtests (ab 29.01.2008)

mit NOB-Anreicherungen und NOB-Kulturen

Hier wurden NOB Anreicherungen aus Büsum sowie Reinkulturen von *Nitrobacter* Stamm 311 und *Nitrospira marina* eingesetzt, um die hemmende Wirkung der Kunststoffe zu testen. Da auf den FK aus den Anlagen nicht nur Nitrifikanten sitzen, könnte so mit Sicherheit gesagt werden, ob die Kunststoffe tatsächlich die Nitrifikation hemmen und nicht etwa die heterotrophen Bakterien fördern, die daraufhin die autotrophe Nitrifikation beeinträchtigen. In diesem Versuch wurden weißes und recyceltes HDPE, HDPE mit TWZ und PP plus Glasfaser eingesetzt. Die Ergebnisse zeigen sehr unterschiedliche Hemmwirkungen der verschiedenen Kunststoffe. Bei einer der Anreicherungen war das Substrat im Kolben mit PP plus Glasfaser sogar eher verbraucht als in dem Kontrollkolben. Dieser Versuch soll auf jeden Fall wiederholt werden, sowohl mit NOB als auch mit AOB.

Test 5 (ab 04.04.2008)

FK aus Strande

Zu dieser Zeit waren die Biofilter in Strande anscheinend so aktiv, dass die eingesetzten Kunststoffe im Versuch keine erkennbare Verzögerung der Nitrifikation auslösen konnten - oder die Konzentrationen an Hemmstoffen waren zu gering. Es wurden hier das Granulat aus PP mit 30% Glasfaser (20 g), Stücke einer PP Folie mit Talkum (20%) (10 g) und Glasperlen (15 g) in die Versuchskolben gegeben. Die Glasperlen sollten als weitere Kontrolle dienen. In allen Ansätzen war die Ammoniak- bzw. Nitritoxidation nach sieben Tagen abgeschlossen.

Test 6 (ab 23.06.2008)

FK aus Strande

Eine Folie aus recyceltem PP mit 20% Glasfaser wurde in diesem Versuch direkt mit Granulat aus PP plus Glasfaser (40%) verglichen. Weiterhin wurden eine PP Folie mit 20% Talkum und das Granulat aus recyceltem HDPE verwendet. Von den Folien wurden jeweils 5 g (in Stücke geschnitten, ca. 90 cm² bei der Talkumfolie und 194 cm² bei der Folie mit Glasfaser), von den Granulaten 20 g Nasseinwaage (= 250 cm² PP plus Glasfaser und 290 cm² HDPE recycelt) in die Kolben gegeben. Alle Materialien waren zwei Wochen lang gespült worden.

Das schwarze HDPE Granulat hemmte bei den AOB sehr stark: das Substrat war erst nach 20 Tagen verbraucht, während in allen anderen AOB Kolben schon nach 10 Tagen kein Ammonium mehr zu messen war. Das PP Granulat mit Glasfasern hemmte in allen Ansätzen (NOB und AOB) etwas weniger als die PP Folie mit Glasfaser, obwohl die Oberfläche des Granulates sogar etwas größer war. Bei der Folie aus PP und 20% Talkum verhielt es sich bei AOB und NOB unterschiedlich. Bei den AOB hemmte das Granulat noch weniger als die PP Folie mit Glasfaser. Der Verlauf des Graphen ist fast kongruent mit dem der Kontrolle. Bei den NOB allerdings hemmte der gleiche Kunststoff stärker als das HDPE recycelt (Abbildung 3.4).

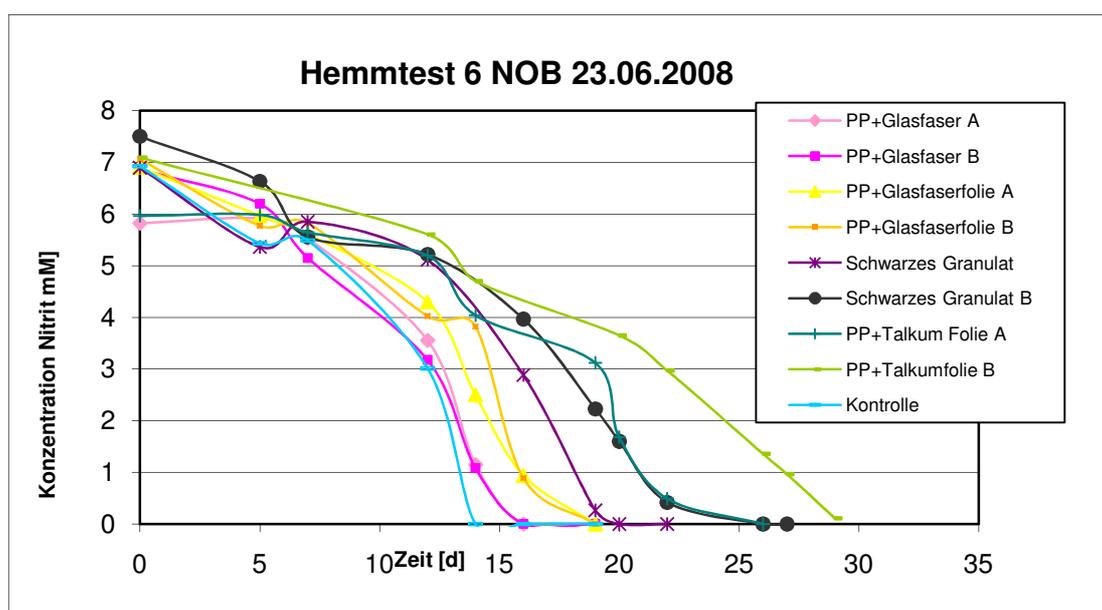


Abb. 3.4: Graphen zeigen die Nitritabnahme in den verschiedenen Ansätzen im Hemmtest 6 (NOB). Parallele Ansätze sind mit A und B gekennzeichnet.

Test 7 (ab 07.08.2008) und 8 (ab 11.09.2008)

FK aus Strande

Für diese Versuche wurden weiße Füllkörper silanisiert, um zu testen, ob diese Behandlung die Oberfläche so konditioniert, dass die Bakterien sich eher anheften. Daher sind diese Hemmversuche eigentlich ein Vorversuch zu einem Aktivitätstest (siehe Kapitel Aktivitätstest). In den Hemmversuchen wurden die silanisierten (in 2% Aceton-Silanlösung getauchte) Füllkörper mit unbehandelten und gewässerten neuen weißen HDPE FK und neuen weißen HDPE FK der Firma *Kaldnes* verglichen. Es wurden jeweils 100 FK in die 100 ml - Testmedien gegeben. Ein Unterschied in der Nitrifikation, auch im Vergleich zur Kontrolle, konnte nicht festgestellt werden.

Test 9 (ab 16.12.2008)

FK aus Strande

Das zu testende Material in diesem Versuch waren Folien aus Polypropylen. Eine bestand aus 100% PP, die andere aus recyceltem Material mit Ruß und 20% Talkum. In die Kolben wurden jeweils 100 cm² Folie (also 200 cm² Gesamtoberfläche –oben plus unten) gegeben. Die Folie war vorher klein geschnitten und zwei Wochen lang in Wasser gerührt worden. Es zeigte sich, dass beide Folien nur einen geringen hemmenden Einfluss auf die Nitrifikation hatten. In den zwei NOB-Kolben mit der weißen Folie wurde ab Tag 29 kein Nitrit mehr gemessen, in denen mit der schwarzen Folie ab Tag 33 (Kontrolle 27 Tage, Abb. 3.5). Bei den AOB verlief der Versuch ähnlich, nur waren die Unterschiede zwischen den Folien etwas größer: nach 7 Tagen waren in der Kontrolle 2,5 mM NH₄⁺ oxidiert worden, in den Kolben mit 100% PP jeweils 2,2 und 1,6 mM, in denen mit PP plus Ruß jeweils 1,2 und 0,7 mM.

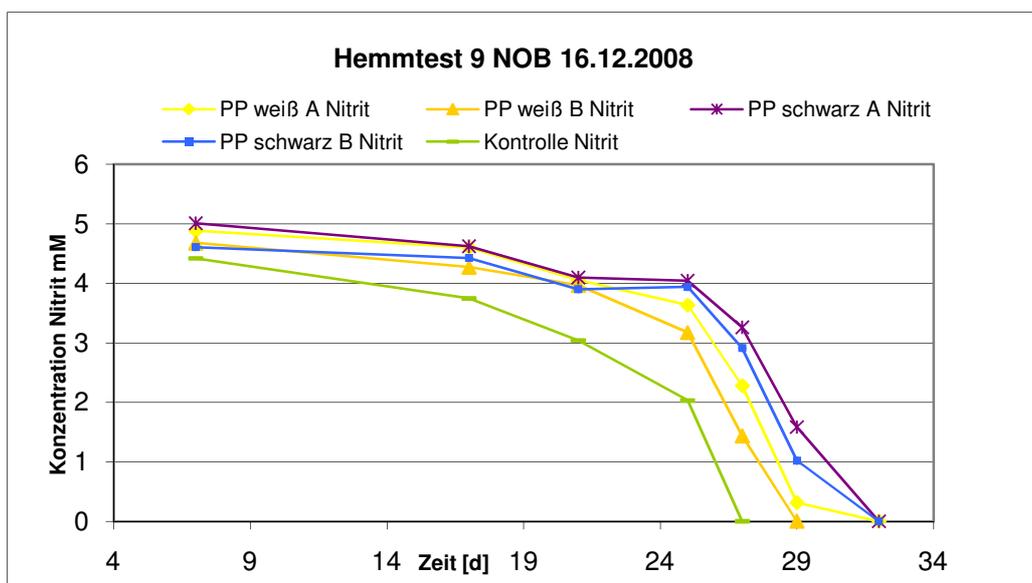


Abb. 3.5: Nitritabnahme im Beisein von zwei verschiedenen Polypropylen-Folien mit 200 cm² Gesamtoberfläche in Hemmtest 9 (NOB).

Test 10 (ab 23.02.2009)

FK aus Strande

In diesem Versuch wurden zum ersten Mal die Granulate PP weiß plus Glasfaser (30%) und PP weiß natur (also ohne Zusätze) und PP recycelt plus 70% Talkum (daher sieht das Material eher weiß als schwarz aus) eingesetzt. Wie die Graphen in Abbildung 3.6 und 3.7 zeigen, konnte eine extreme Hemmung durch die Kunststoffe HDPE weiß und PP weiß natur festgestellt werden. Das recycelte PP mit Talkum hemmte dabei etwas mehr als das recycelte HDPE. Bei dem PP weiß mit Glasfaser und dem PP recycelt mit Glasfaser (40%) konnte nur eine geringe Verzögerung der Nitrifikation im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden.

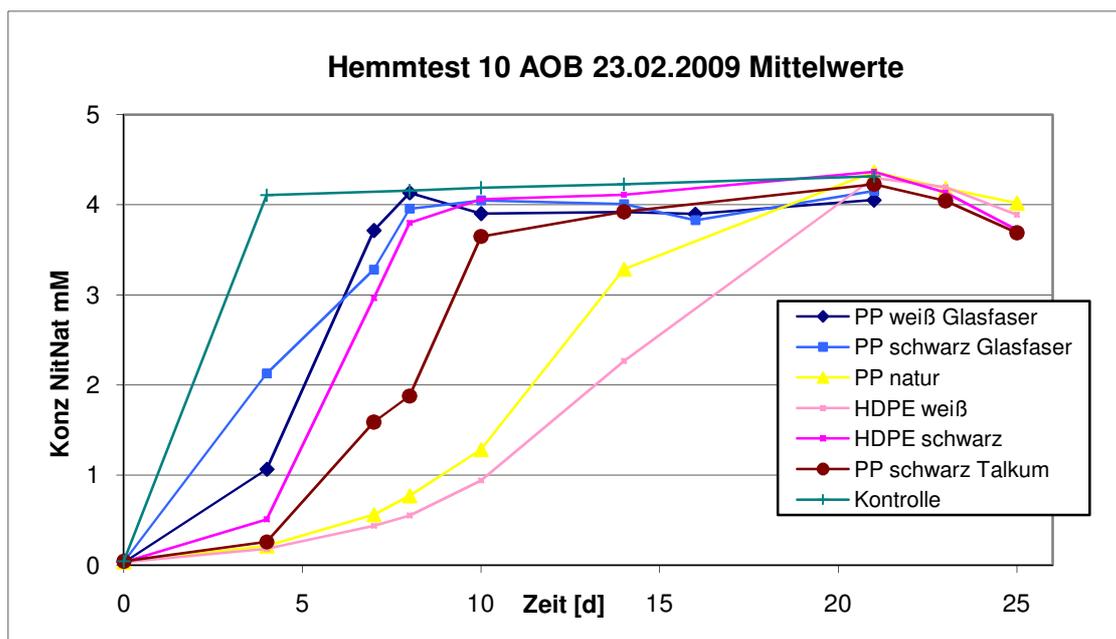


Abb. 3.6: Zunahme an Nitrit und Nitrat als Nitrifikationsleistung der AOB im Hemmtest 10

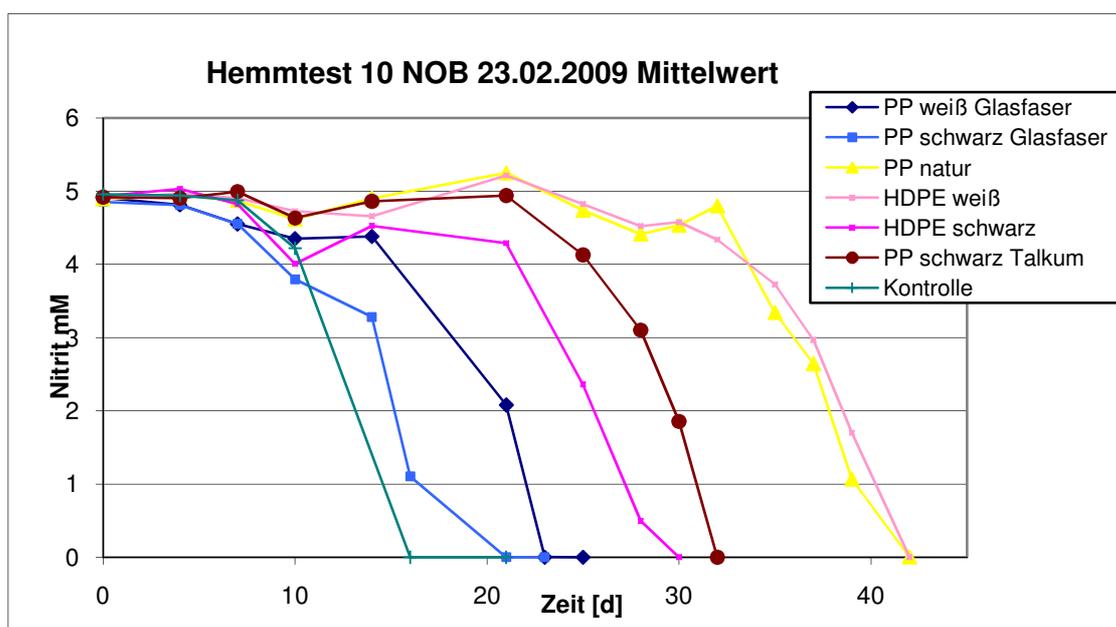


Abb. 3.7: Nitritkonzentrationen im Hemmtest 10 (NOB)

Test 11 (ab 30.03.2009)

FK aus Strande

Ein neu hinzugekommenes Material in diesem Test ist ein weißes LDPE (low-density Polypropylen) ohne weitere Zuschlagstoffe. Es wurde als erstes mit PP weiß plus Glasfaser und PP recycelt plus Glasfaser und dem recyceltem HDPE Granulat verglichen. Bei den AOB hemmte das LDPE am meisten. Erst nach mehr als zehn Tagen nach der Kontrolle (vier Tage) waren 3 mM Ammonium in den Kolben umgesetzt. Die Nitrifikation in den Kolben mit den PP Granulaten mit Glasfaser verlief fast so schnell wie in den Kontrollkolben. Das recycelte HDPE hemmte die Nitrifikation ebenfalls recht stark, erst nach 10 Tagen war das Ammonium der ursprünglichen 4 mM Lösung umgesetzt. Das LDPE hemmte die NOB sogar noch stärker als die AOB. Hier fand selbst nach 25 Tagen gar keine Nitrifikation statt, während die Bakterien in der Kontrolle nach 15 Tagen und in den Versuchen mit den anderen Granulaten nach 21 Tagen das Nitrit komplett zu Nitrat umgesetzt hatten. Auch in den AOB- Kolben fand keine Nitrit-Oxidation statt, nachdem dort die Ammonium-Oxidation abgeschlossen war. Das recycelte PP plus Glasfaser hatte bei den NOB ebenfalls einen sehr geringen hemmenden Effekt, das weiße PP plus Glasfaser jedoch verzögerte die Nitrifikation fast so stark wie das recycelte HDPE in diesem Test.

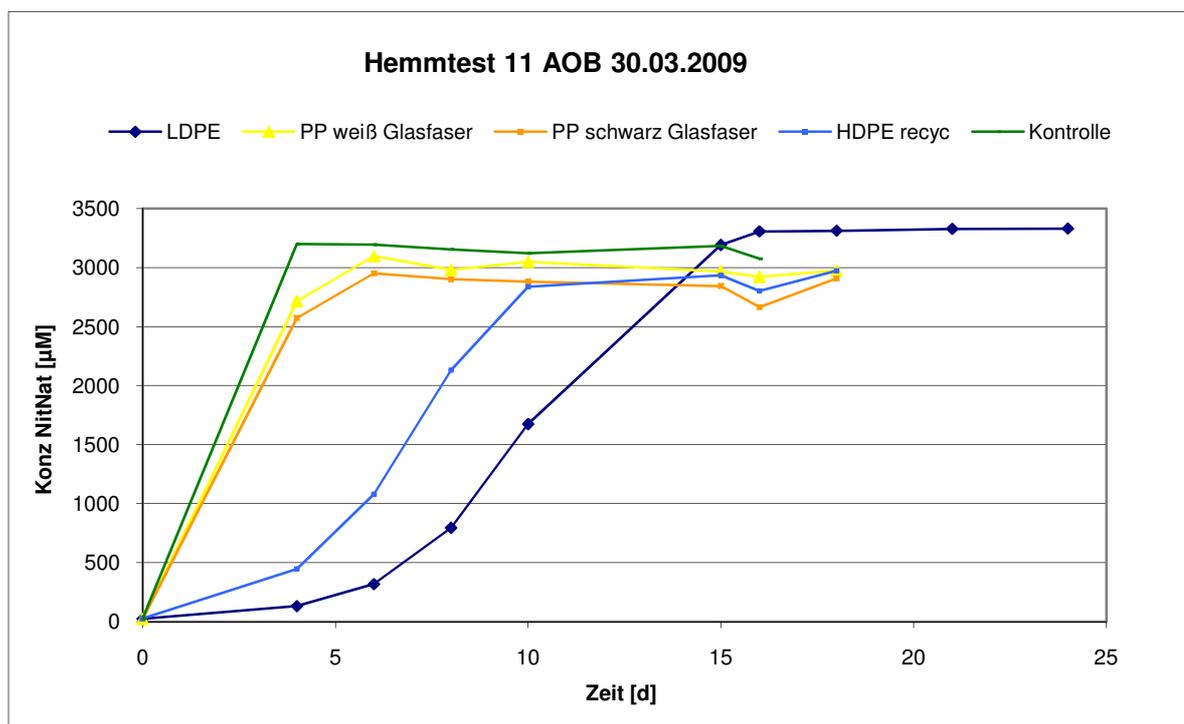


Abb. 3.8: Zunahme der Nitrit- plus Nitratkonzentrationen im Hemmtest 11 (AOB)

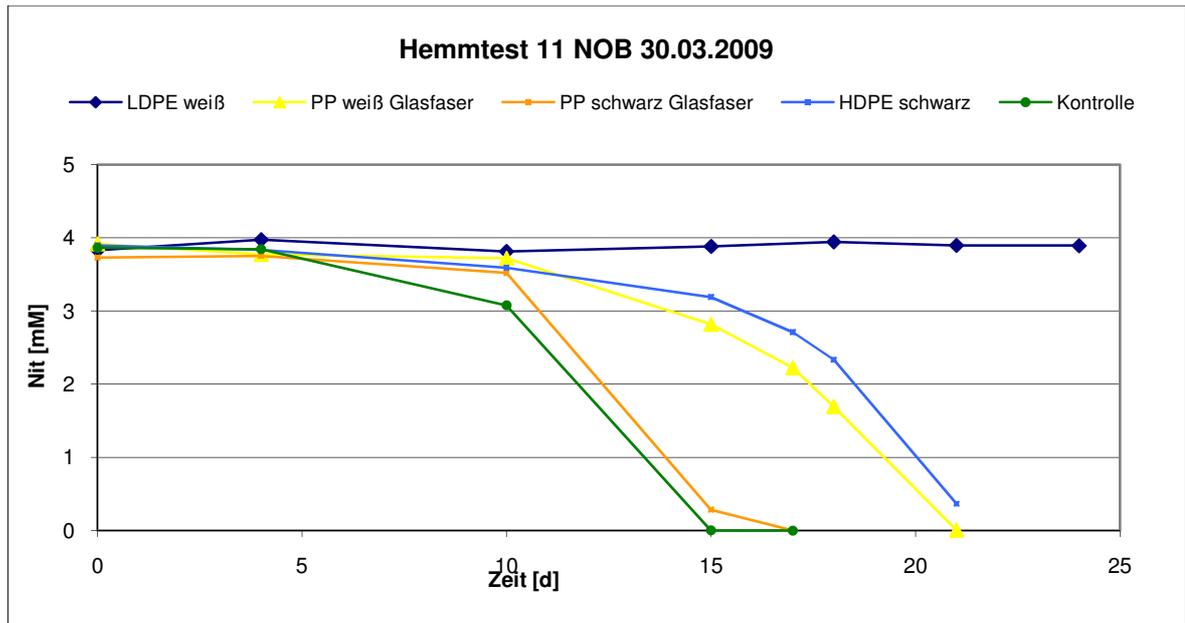


Abb. 3.8: Abnahme der Nitritkonzentrationen im Hemmtest 11 (NOB)

Test 12 (ab 29.04.2009)

FK aus Strande

Für diesen Test wurden die Oberflächen der Granulate berücksichtigt, da die mögliche Migration aus den Kunststoffen mit der Größe der Oberfläche proportional wäre. Die meisten Granulate wurden als Zylinder definiert, nur das recycelte PP plus Glasfaser und PP plus Talkum als Ellipsen bzw. Kugeln. Die Größe der Oberfläche wurde auf 300 cm^2 festgelegt und liegt damit etwas unter der Größe der Oberfläche, die im Durchschnitt eingesetzt wurde, wenn 30 g Nassgewicht in die Kolben gefüllt wurden (412 cm^2). Neben den Granulaten wurden auch recycelte und weiße FK eingesetzt. Die Granulate und FK wurden nach der Wässerung von 7 Wochen getrocknet abgewogen bzw. abgezählt. Der Test wurde noch nicht komplett ausgewertet, es zeichnen sich jedoch keine großen Änderungen hinsichtlich der Rangfolge der Materialien ab.

Bewertungssystem Granulat-Hemmtests:

Um zu einer nachvollziehbaren Bewertung der hemmenden Wirkung der verschiedenen Granulate in den Tests zu kommen, wurde folgendes Bewertungssystem entwickelt:

Wegen der jeweils stark abweichenden nitrifizierenden Aktivitäten der Zellen auf den FK aus den Anlagen kann nur die jeweilige Kontrolle als Vergleichswert gelten. Aus der Anzahl der Tage, die die gehemmten Zellen in den Kolben mit den Kunststoffen jeweils mehr brauchten, um das Substrat umzusetzen, wurde ein Mittelwert und die Standardabweichung gebildet. Wenn nun die Zellen in einem Kolben das Substrat schneller umgesetzt haben als dieser Mittelwert, wurde ein Punkt für den jeweiligen Kunststoff vergeben. Zwei Punkte gab es, wenn das Substrat in weniger Tagen

umgesetzt wurde als der Mittelwert minus Standardabweichung. Da einige Kunststoffe öfter in Tests eingesetzt wurden als andere, muss die Punktzahl durch die Anzahl der Tests geteilt werden, in denen der jeweilige Kunststoff eingesetzt wurde. Die höchste Punktzahl, die erreicht werden kann, ist somit zwei.

Genauso wurden auch Negativpunkte vergeben. Hier gab es einen Punkt, wenn die Anzahl der Tage, die mehr zu Substratumsetzung benötigt wurden als bei der Kontrolle, größer war als der Mittelwert. Zwei Negativpunkte wurden vergeben, wenn die Anzahl der Tage mehr als der Mittelwert plus Standardabweichung war.

Folien und FK wurden nicht in die Wertung einbezogen. Wenn zwei Kurven des gleichen Kunststoffes im selben Test voneinander abwichen, wurde der Mittelwert genommen.

Problematik: Der Verlauf von Substratabnahmekurven in der Nitrifikation ist häufig geprägt von einer langen lag- Phase und einer sehr schnellen Abnahme des Substrates ab einem bestimmten Zeitpunkt. Wenn nicht zufällig zu diesem Zeitpunkt Proben genommen werden, beschreiben die Kurven nicht mehr die tatsächliche Abnahme des Substrates, sondern bilden ein Artefakt. Bei der nächsten Probenahme liegt die Substratkonzentration bei Null, aber man weiß nicht, wie lange schon. Bei der Bewertung wurde diese Tatsache in einigen wenigen Fällen in die Bewertung einbezogen und der Graph korrigiert.

Auch ist zu beachten, dass die Mittelwerte und Standardabweichungen davon abhängig sind, in welcher Kombination die Granulate in den Versuchen eingesetzt wurden.

Eine weitere Möglichkeit, die Hemmwirkungen zu bewerten, wäre, die Granulate jeweils untereinander in jedem Test zu vergleichen. Hierbei wäre jedoch die Abweichung zur Kontrolle nicht berücksichtigt worden. Daher wurden die Hemmversuche vorerst nach der ersten beschriebenen Methode ausgewertet.

Bisher wurden die Tests 1, 2, 3, 6, 10 und 11 ausgewertet, d.h., nur Tests mit abgeschüttelten Zellen aus den Anlagen. Außerdem wurden nur Granulate berücksichtigt. Die Abbildungen 3.9 und 3.10 zeigen die berechneten Punkte für die jeweiligen Kunststoffe. Die Negativ- und Positivpunkte wurden nicht miteinander verrechnet sondern unabhängig voneinander aufgeführt. Über den Kunststoffbezeichnungen steht jeweils die Anzahl an Hemmversuchen, in denen der jeweilige Kunststoff eingesetzt wurde. Es darf nicht vergessen werden, dass alle Kunststoffe eine hemmende Wirkung auf die Nitrifikation im Vergleich zur Kontrolle hatten.

Bei den AOB ist das recycelte PP mit Glasfaser der Kunststoff, der am wenigsten hemmt (1,3 Punkte), danach kommt das weiße PP mit Glasfaser (1 Punkt), das recycelte HDPE (0,8 Punkte) und das weiße HDPE (0,5 Punkte). Bei den NOB erhielt ebenfalls das recycelte PP plus Glasfasern mit 1,3 die höchste Wertung, danach folgt aber das recycelte HDPE mit 0,7. Das weiße PP plus Glasfaser bekam 0,5 Punkte und das weiße HDPE 0,25. Die Vergabe von Positivpunkten fiel bei den NOB insgesamt niedriger aus. Bei den NOB wurden jedoch mehr Negativpunkte vergeben. So hat zum Beispiel das PP weiß mit Glasfaser bei den AOB keine Negativpunkte erhalten, bei den NOB 0,5 Negativ- und 0,5 Positivpunkte. Auch bei den Kunststoffen HDPE weiß und PP weiß weichen die AOB und die NOB voneinander ab. Während PP weiß für den AOB-Versuch weder positive noch negative Punkte bekommen hat, bekam dieser Kunststoff wie auch HDPE TWZ und LDPE weiß bei den NOB die höchste Anzahl an Negativpunkten, nämlich zwei. PP weiß jedoch und PP recycelt

mit 70% Talkum (das jeweils einem Negativpunkt bekommen hat) sind bisher nur in einem bewerteten Versuch eingesetzt worden.

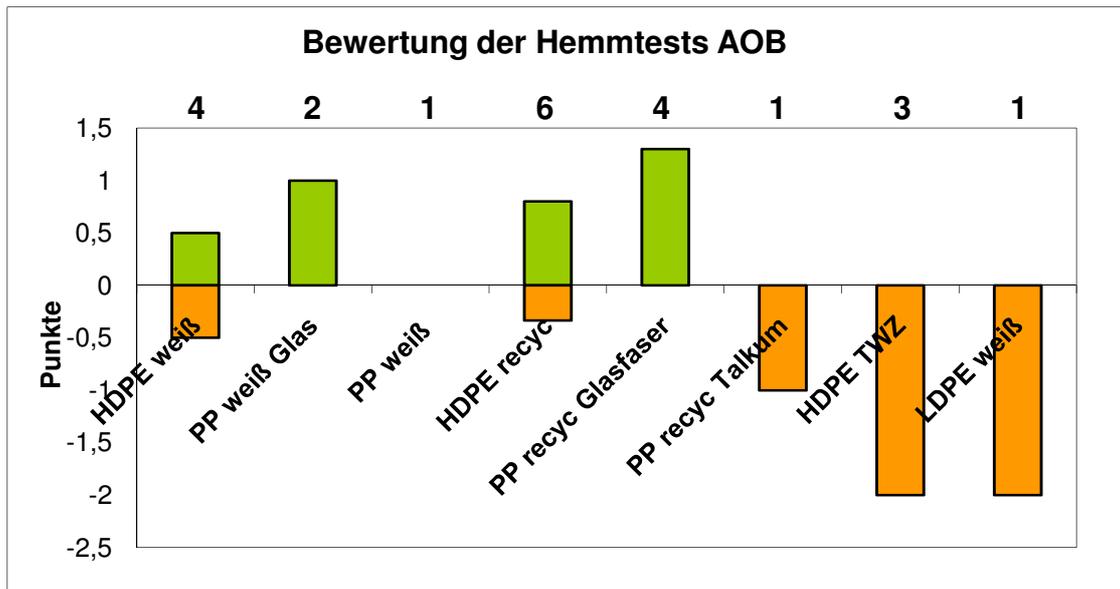


Abb. 3.9: AOB: Positiv- und Negativpunkte der Kunststoffe mit Anzahl der Tests, in denen sie eingesetzt wurden.

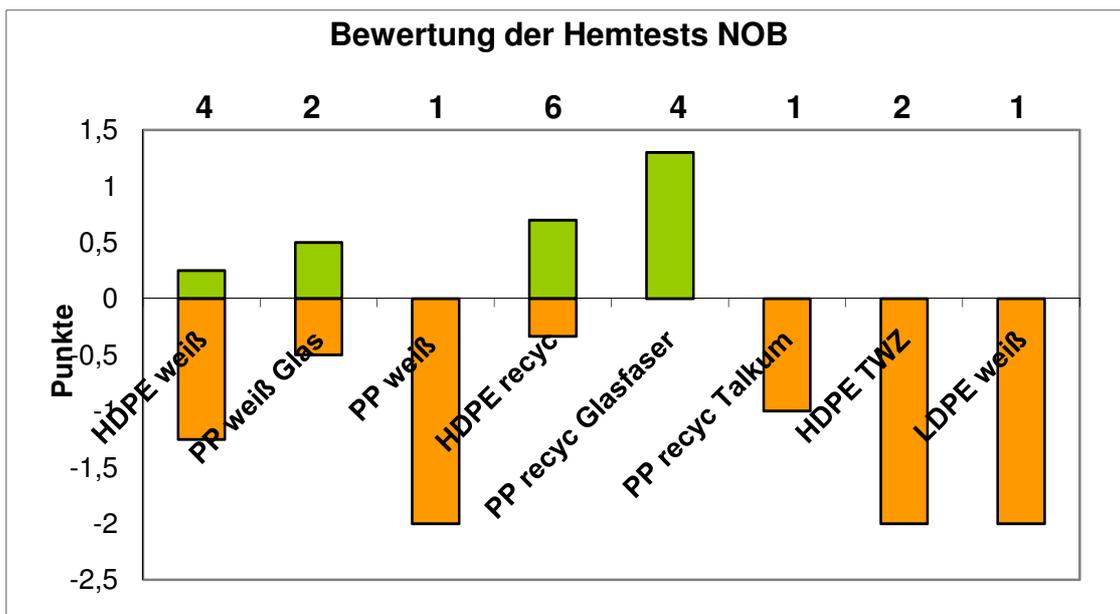


Abb. 3.10: NOB: Positiv- und Negativpunkte der Kunststoffe mit Anzahl der Tests, in denen sie eingesetzt wurden.

Diskussion:

Die im Projekt durchgeführten Hemmtests haben gezeigt, dass eine Hemmung der Nitrifikation im Beisein von verschiedenen Kunststoffen stattfindet. Da die Hemmung je nach Kunststoff wiederholt mehr oder weniger stark war, haben wir die Kunststoffe nach ihrer Hemmwirkung bewerten können.

Da in den Kontrollen durchweg die Substrate am schnellsten umgesetzt wurden, gehen wir davon aus, dass es bei den Verzögerungen der Nitrifikation in den Versuchskolben tatsächlich um eine Hemmung handelt und nicht um eine verbesserte Anheftung, da diese in den Kontrollen nicht stattfinden kann. Sauerstoffmessungen mit einem Handsauerstoffgerät (HANNA Instruments) in den geschüttelten Kolben haben Werte zwischen 7,3 und 7,7 g/L ergeben. Das bedeutet, dass die Sauerstoffversorgung auch in den Kolben mit Granulaten von diesen nicht verringert wird. Eine Alternative zu der Kontrolle ohne Granulate bestehend aus einem Material, das garantiert keine Stoffe freisetzt, wäre dennoch sinnvoll. Als Möglichkeit werden poröse Keramiken in Betracht gezogen.

Auffällig bei der Auswertung der Tests war, dass z.B. das Granulat Polypropylen weiß sehr stark hemmt, das weiße PP mit Glasfaser (30%) dagegen hatte fast keinen Einfluss. Auch verzögerte das recycelte PP mit 40% Glasfasern in Test 6 weniger als die Folie aus recyceltem PP mit 20% Glasfasern (obgleich deren Oberfläche kleiner war als die der Granulate). Die Frage ist nun, ob die Glasfasern förderlich wirken oder die Tatsache, dass weniger des Hauptstoffes Polypropylen mit seinen Additiven in dem Granulat enthalten ist. Keen und Prosser untersuchten 1987 die Anheftung von *Nitrobacter* auf Glasplättchen. Hier wiesen die angehefteten Zellen 20% mehr Zellwachstum auf als frei schwimmende Zellen. Eine Möglichkeit wäre auch, dass die Kunststoffe außer den Glasfasern noch weitere Ungleichheiten in ihren Inhaltstoffen aufweisen.

Ähnliche Vermutungen lässt auch der Vergleich Granulate - Füllkörper zu. Es liegen zur Untersuchung die Granulate HDPE recycelt, weiß und TWZ auch als gebrauchsfertige Füllkörper vor. In zwei Hemmtests (ohne TWZ FK) konnte in deren Beisein keine Hemmung festgestellt werden, obwohl in einem der Tests die Oberfläche der Granulate mit denen der FK übereinstimmte. Auch die Folie aus PP (weiß) hemmte in Test 9 etwas weniger als eine Folie aus recyceltem PP mit Talkum (20%), obwohl das Granulat PP weiß in den Versuchen stets sehr stark hemmte. Es ist möglich, dass die Granulate durch die Extrudierung hemmende Stoffe verlieren oder sie vielleicht besser binden.

Ein großes Problem in der Kunststoff-Herstellung ist, dass die verarbeitenden Unternehmen wie GEA 2H Water Technologies Rohware bestellen, deren genaue Inhaltsstoffe und Additive unbekannt sind und sich von einem Zulieferer zum anderen unterscheiden können. Eine chemische Analyse der Granulate und Folien wäre in diesem Fall natürlich sehr förderlich. Jedoch ist dies aus Kostengründen nicht machbar, da unbekannt ist, auf welche Stoffe genau untersucht werden soll.

Um die Frage zu klären, ob die Nitrifikation im Beisein von Kunststoffen selbst beeinträchtigt wird, ob nitrifizierende Zellen abgetötet werden oder heterotrophes Wachstum begünstigt wird, sind weitere Versuche mit Reinkulturen (AOB wie NOB) nötig. Es ist außerdem geplant, die Zellen vor und nach dem Versuch mit einem Fluoreszenzfarbstoff zu behandeln und die Zellen auszuzählen. Der Farbstoff CTC (5-Cyano-2,3-Ditolyltetrazoliumchlorid) färbt lebende (atmende) Zellen rot, die Gesamtzellzahl kann parallel mit DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindodihydrochlorid) bestimmt werden. So kann sowohl Zellwachstum als auch eventuelles Zellsterben festgestellt werden.

Ebenso sollte geklärt werden, ob sich eine Konzentrationssteigerung der Granulate in den Kolben proportional auf die Nitrifikation auswirkt, oder ob es sich dabei um

eine konzentrationsunabhängige Hemmung handelt. So wurde der Kunststoff Polypropylen weiß auch als Folie getestet und hatte eine ähnlich geringe hemmende Wirkung auf die Nitrifikation wie das parallel getestete PP recycelt. Da die eingesetzte Oberfläche in diesem Versuch nicht so groß wie in den anderen Versuchen war (200 cm² statt sonst knapp 500 cm²), könnte dies eine Erklärung für die verringerte Hemmung sein. Ebenso beeinflusst die vorhergehende Verarbeitung des Granulates zur Folie eventuell die Migration von chemischen Stoffen (s.o.).

Insgesamt waren in den Tests die Nitrit-oxidierenden Bakterien langsamer bei der Umsetzung ihres Substrates als die Ammoniak-oxidierenden Bakterien. Dies könnte zum Einen daran liegen, dass die hohe Substratkonzentration von 4 oder 5 mM die NOB zusätzlich stresst. Allerdings konnte auch beobachtet werden, dass sich in den AOB-Kolben ein Nitritpeak aufbaut, bevor dieses weiter zu Nitrat umgesetzt wird. In den AOB-Kolben wird jedoch von den AOB erst Nitrit produziert, so dass die NOB in diesen Kolben anfänglich nur niedrigen Konzentrationen ausgesetzt sind. Dabei muss berücksichtigt werden, dass NOB der Gattung *Nitrospira* (der dominierende NOB im Biofilm) sehr viel langsamer wachsen als AOB der Gattung *Nitrosomonas* (die hier vorherrschen). Eine andere Möglichkeit ist, dass die NOB insgesamt empfindlicher auf die Kunststoffe reagieren. Doch es auch in den Kontrollkolben besteht die Diskrepanz in der Substratumsetzung zwischen den AOB und den NOB. Es ist weiterhin möglich, dass die NOB sensibler auf die mechanische Behandlung vor den Versuchen reagieren, bei der sie mittels Glaskugeln und extremen Schüttelns von den FK gelöst werden. In den weiteren Test sollte diese Möglichkeit berücksichtigt werden.

4

Untersuchungen zur Anheftung von nitrifizierenden Bakterien auf verschiedenen Kunststoffen

Da es bei der Implementierung von moving-bed Biofiltern in RAS darum geht, möglichst schnell einen nitrifizierenden Biofilm zu etablieren, um Ammonium- oder Nitritpeaks zu vermeiden, sollte auch untersucht werden, wie schnell sich welche Bakterien auf verschiedenen Kunststoffen anheften. Die Versuche dazu wurden zum größten Teil an der Uni Duisburg in der Arbeitsgruppe von Prof. Sand durchgeführt.

Inhalt

- **Zur Adhäsion von nitrifizierenden Bakterien**
- **Visualisierung der Anheftung in der Kombination AFM/EFM**
- **Quantitativer Anheftungsversuch mit Polypropylen- Folien**
- **Anheftungsversuche mit Folien aus Granulaten mit anschließenden Aktivitätstests**
- **Aktivitätstest mit neuen und gebrauchten FK aus einem Hemmtest**
- **REM und AFM Aufnahmen von Granulaten und Folien**

Zur Adhäsion von nitrifizierenden Bakterien

B. Watermann

Es ist seit langem bekannt, dass im aquatischen Milieu eine hohe Anzahl von Bakterienarten an Oberflächen angeheftet leben und dort komplexe Biofilme bilden. Ebenso ist bekannt, dass es sehr unterschiedliche Anheftungsstrategien gibt und Bakterien in der Lage sind, ihre Adhäsionsmechanismen auf die jeweils zu besiedelnde Oberfläche anzupassen (Fletcher, 1996; Boland et al., 2000; Dunne, 2002).

Auch für nitrifizierende Bakterien konnte nachgewiesen werden, dass sie zu großen Anteilen an Partikel/Schwebstoffe oder Sedimente angeheftet leben. Angeheftete Nitrifizierer zeigten deutlich höhere Aktivitäten als planktonisch lebende, welche nur in sehr geringen Zellzahlen vorkommen (Diab und Shilo, 1988).

Erstaunlicherweise ist über die exakten Adhäsionsmechanismen und Haftpolymere von nitrifizierenden Bakterien relativ wenig bekannt. Obwohl sich zahlreiche Publikationen mit dem Problem der Herstellung und Erhaltung eines stabilen Biofilms

mit nitrifizierenden Bakterien in Bioreaktoren und Kläranlagen befassen, sind die gewonnenen Informationen sehr gering. Einige wenige Erkenntnisse wurden im Ausschlussverfahren gewonnen, so dass bekannt ist, womit sie sich nicht anheften, aber detaillierte Daten wie z.B. für pathogene Bakteriengruppen liegen nicht vor.

Bakterien können sich generell mit Hilfe von extrazellulären Substanzen anheften und zahlreiche spezielle Organellen oder extrazelluläre Strukturen bilden. Hierzu zählen Fimbrien, Pili, amyloide Fibrillen oder eine Mischung aus Proteinen, Polysacchariden und Lipiden, die auch als EPS (extrazelluläre polymere Substanzen oder extrazelluläre Polysaccharide) beschrieben werden.

Die Anheftung nitrifizierender Bakterien basiert nach bisherigem Kenntnisstand vor allem aus der Ausscheidung einer „Schleimkapsel“ oder, anders ausgedrückt, von EPS, welche das Bakterium oder die Bakterienkolonie mit dem Substrat verbinden. Hierbei wird möglicherweise keine chemische Verbindung mit der Oberfläche eingegangen, sondern es wurden Rauigkeiten im Bereich von wenigen Mikrometern zur physikalischen Verankerung/Verzahnung mit dem Substrat genutzt.

Als entscheidende Faktoren für die Anheftung werden in der Literatur folgende Parameter genannt:

- Oberflächenladung der Bakterien (überwiegend negative) und des Substrats
- Oberflächenenergie der Bakterien und des Substrats
- Hydrophobie des Substrats korrespondierend zu der überwiegenden Hydrophilie der Bakterienoberfläche, welches sowohl für *Nitrosomonas* als auch für *Nitrobacter* gelten soll

Hierzu gab es Untersuchungen mit *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* auf Substraten wie Kalkstein, Bimsstein (basaltartiges Vulkangestein) und porösem Glas. Die Messung der Grenzflächenenergie zwischen den Substraten und den Bakterienkolonien zeigte, dass diese zwischen Kalkstein und *Nitrosomonas* sowie *Nitrobacter* am niedrigsten war. Hierdurch wurde die Adhäsion gefördert. Zudem gehen die Autoren von einer Wechselwirkung zwischen den positiven Kalziumionen und den negativ geladenen Molekülen auf der Bakterienoberfläche/EPS aus (Teixera und Oliveira, 1998b).

Messungen der freien Energie und physiko-chemischen Eigenschaften der Bakterienoberfläche von Nitrifizierern sind sehr widersprüchlich in Abhängigkeit der gewählten Methode. Zudem bestehen Zweifel, ob wirklich die Bakterienoberfläche oder die jeweilige Schleimhülle (EPS) gemessen wurde (Teixera et al., 1998a und b).

In diesem Projekt durchgeführte Untersuchungen an nitrifizierenden Bakterien auf der Oberfläche von Füllkörpern ließen in elektronenmikroskopischen Aufnahmen nur einen amorphen „Schleim“ (EPS) erkennen, der die Bakterien umhüllt. Er umschließt zudem die Mikrokolonien und schafft ebenfalls eine Kleb-Verbindung zu dem Substrat. Es sind keinerlei extrazellulären Ausstülpungen oder extrazelluläre Strukturen wie z.B. Fibrillen zu erkennen. Dieses steht in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Larsen et al. (2008a), welche durch spezielle Nachweis- und Färbemethoden ausschließen konnten, dass nitrifizierende Bakterien wie *Nitrosomonas oligotropha* und *Nitrospira spec.* amyloide Fibrillen ausbildeten. Ebenfalls wurden keine Fibrillen bei denitrifizierenden Bakterien beobachtet.

In weiteren Untersuchungen (2008b) konnten Larsen et al. zeigen, dass Mikrokolonien von *Nitrosomonas* und *Nitrospira* sehr fest auf Klärschlammflocken hafteten. Auch bei turbulenten Scherkräften, die durch Rotation von 2200 U/s des mit Flocken beladenen Klärschlamm erzeugt wurden, konnte nur ein geringer Teil der Mikrokolonien der Nitrifizierer abgelöst werden. Nur 3% der Mikrokolonien (Durchmesser 4,5 – 9 µm) von *N. oligotropha* und 1% der Mikrokolonien (13 – 22,5 µm Durchmesser) von *Nitrospira* wurde durch die angreifenden Scherkräfte abgelöst. Nitrifizierer zeigten somit hohe Adhäsionskräfte, welche deutlich über denen der anderen hetero-/autotrophen Bakterien auf den Flocken liegen. Hieraus ist der Schluss möglich, dass es durch Einwirkung hoher Scherkräfte zu einer Anreicherung von Nitrifizierern kommt, da die meisten anderen Bakterien wesentlich geringer haften und abgelöst werden. Darüber hinaus kann vermutet werden, dass die Schleimkapseln sowohl die Haftung zum Substrat bewirken, als auch vor angreifenden Scherkräften schützen (s.o.).

In der Literatur finden sich aber auch Feststellungen, dass nitrifizierende Bakterien nur wenig EPS bilden und sie daher nicht fest haften (Terada et al., 2004). Bei niedrigen Temperaturen scheint mehr EPS gebildet zu werden als bei höheren Temperaturen (Al-Halbouni et al., 2008), woraus sich die Frage ableitet, ob bei niedrigen Temperaturen die Adhäsion stärker ist als bei höheren Temperaturen.

Ammoniak-oxidierende Bakterien besiedeln Substrate, um einerseits gelöste Ammoniumverbindungen besser aufzunehmen, welche sich an hydrophoben, negativ geladenen Oberflächen anlagern (Konditionierung) und andererseits, um einen Biofilm mit anderen Bakterien zu bilden, welche Nitrit zu Nitrat umwandeln können. Wahrscheinlich ist, dass die Ammoniak-oxidierenden Bakterien die Erstbesiedler darstellen und von ihrem Ausscheidungsprodukt Nitrit solche zur Ansiedlung und Anheftung stimuliert werden, welche Nitrit in Nitrat umsetzen (Marshall, 1996).

Nitrifizierende Bakterien besitzen Substratvorlieben für folgende Oberflächen:

- Hydrophobe Eigenschaften, keine strukturierten Wassermoleküle, die eine Annäherung erschweren
- Bentonit, Montmorillonit
- Kalkstein, CaCO₃
- Cellulose

(Diab und Shilo, 1988; Kim et al., 1997; Teixeira et al., 1998a)

Wie Teixeira et al. (1998a) zeigen konnten, ist die Aktivität von *Nitrosomonas*- und *Nitrobacter*- Kolonien auf Kalkstein deutlich höher als Basalt.

Untersuchungen zur Oberflächenkonditionierung von Polymeren ergab, dass die Auflagerung von Diethylamin auf Polyethylen eine Anheftung fördert (Terada et al., 2004).

Die in diesem Projekt identifizierten nitrifizierenden Bakterien gehörten zu unterschiedlichen Arten mit sehr unterschiedlichen morphologischen Eigenschaften:

- *Nitrospira* (pleomorphe, spiralige Zellen)
- *Nitrosomonas* (kurze Stäbchen)
- *Nitrosococcus* (rundliche bis ovale Gestalt)
- *Nitrobacter* (pleomorphe kurze Stäbchen)

Inwieweit diese Bakterienarten gleiche oder unterschiedliche Anheftungsmechanismen besitzen, ist nicht klar. In den bisherigen Untersuchungen dominierten Nitritoxidanten der Gattung *Nitrospira* mit ca. 60%. Ammoniakoxidierende Bakterien der Gattung *Nitrosomonas* waren mit ca. 30% vertreten. Heterotrophe Bakterien machten nur ca. 3% aus, was für die Selektion von nitrifizierenden Bakterien auf den Füllkörpern durch die hohen Scherkräfte und für eine hohe Adhäsion spricht. Auf der anderen Seite konnten auch *Nitrospira*-Zellen beobachtet werden, die sich abgelöst hatten und eine typisch planktonische Morphologie aufwiesen (Abschlussbericht Phase I).

Visualisierung der Anheftung in der Kombination AFM / EFM **Jürgen Schröt**

Der Arbeitsgruppe von Prof. Sand an der Uni Duisburg steht ein EFM (Epifluoreszenz-Mikroskop) mit einem AFM (atomic force microscope, auch: Rasterkraftmikroskop) gekoppelt zur Verfügung. So ist es möglich, die Oberflächenstruktur angehefteter Zellen im Fluoreszenzmikroskop zu identifizieren, wenn diese vorher mit Farbstoffen markiert wurden (Mangold et al., 2008).

Beim AFM scannt eine Spitze über die Oberfläche, die an einem metallenen Cantilever angebracht ist. Ein auf diese Spitze fokussierter Laserstrahl wird je nach Verbiegung des Cantilevers (die wiederum vom Höhenprofil der untersuchten Fläche abhängt) in unterschiedlichen Winkeln reflektiert. Jeder Verbiegung wird am Bildschirm ein Helligkeitswert zugeordnet und so ein Falschfarbenbild der Probe erzeugt. Gescannt wird zeilenweise mit konstanter Geschwindigkeit innerhalb eines zuvor festgelegten Ausschnitts der xy-Ebene.

Die Arbeiten an den Mikroskopen zur Anheftung nitrifizierender Bakterien wurden von Jürgen Schröt zum größten Teil im Rahmen seiner Bachelorarbeit durchgeführt.

Für die ersten Anheftungsversuche wurden Objektträger mit einer Folie (PP plus Glasfasern und Ruß) beklebt und in den Biofilter der Anlage in Strände gehängt (Juni 2008). Nach fünf bzw. elf Tagen wurden die Objektträger entnommen und nach Duisburg geschickt. Hier wurden die Proben mit der Sonde Nts712 hybridisiert (FISH = fluorescence *in-situ* hybridization), an die der Farbstoff Fluoreszin gekoppelt ist (Absorption-Max. 495 nm, Emission-Max. 520 nm). Die mittels AFM und EFM in Kombination entstandenen Bilder zeigen, dass sich bereits nach fünf Tagen Kolonien von *Nitrospira* auf der Folie gebildet hatten (Abb. 4.1).

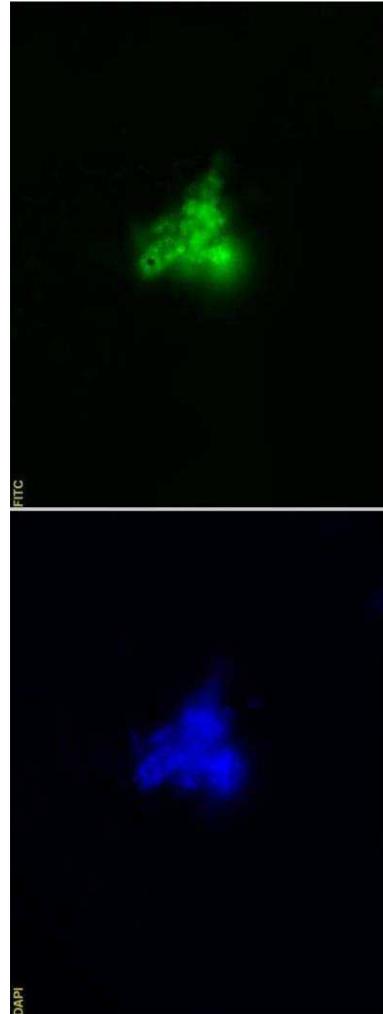
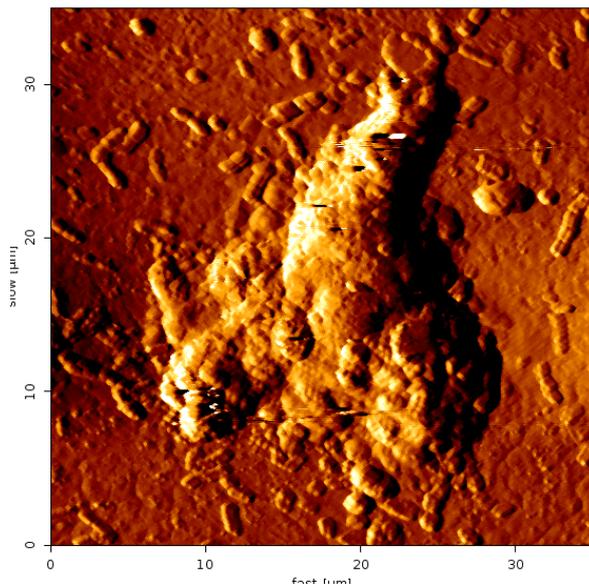


Abb. 4.1:
***Nitrospira*-Kolonie auf PP-Folie mit Glasfaser (20%) nach elftägiger Inkubation im Biofilter in Strande:**

oben: AFM Aufnahme (40x40µm)

rechts: Aufnahmen derselben Kolonie am Fluoreszenzmikroskop mit der *Nitrospira*-spezifische Sonde Ntsp712 mit dem Farbstoff Fluoreszin (oben) und mit DAPI (unten).

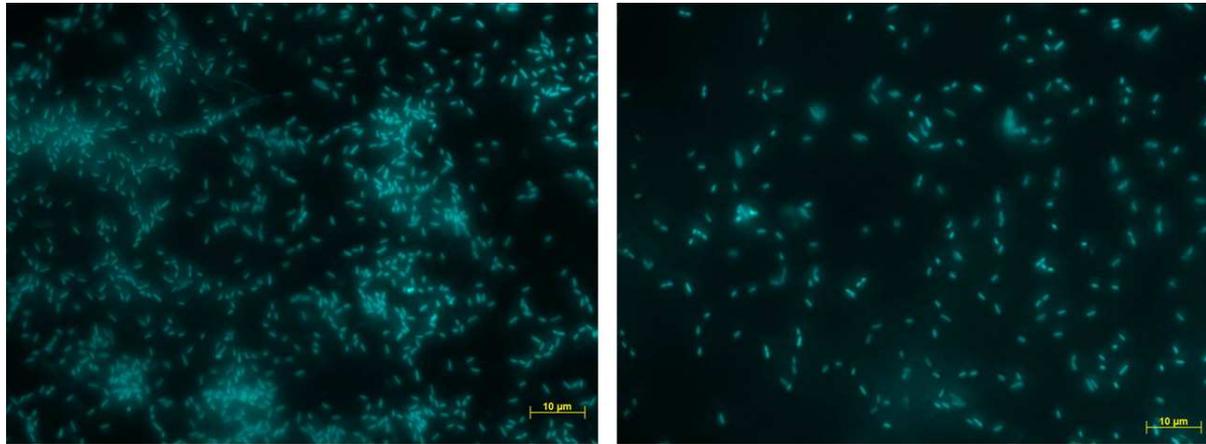
Ähnliche Bilder entstanden nach der Inkubation einer PP plus Talkum Folie in einer NOB Anreicherung aus Büsum im Labor. Die Ergebnisse zeigen, dass es möglich ist, in Kombination der Methoden FISH/EFM und AFM die Anheftung von nitrifizierenden Bakterien zu visualisieren. Dabei können Einzelzellen von Kolonien unterschieden werden und die angehefteten Zellen identifiziert und quantifiziert werden. So können die Anheftungsprozesse zeitaufgelöst dokumentiert werden.

Quantitativer Anheftungsversuch mit Polypropylen- Folien

Für die Anheftungsversuche im Labor wurden 100 ml Bakterienkulturen (Reinkulturen als auch Mischkulturen, AOB und NOB) in sterile Weithals-Erlenmeyerkolben (100 ml) mit Magnetrührstäbchen überführt. Dann wurde je ein Objektträger mit einer Folie beklebt in den Erlenmeyerkolben eingebracht. Die Folien bestanden aus PP (Polypropylen) mit 20% Talkum und 3% Ruß oder aus PP mit 20% Glasfaser und ca. 2% Ruß. Für die Anheftung wurde die Bakteriensuspension mit einem Magnetrührer bei 500 U/min und 30 °C für 24 Stunden gerührt.

Die Objektträger mit den PP-Folien wurden mit einer Pinzette entnommen und mit dem für die Bakterien spezifischen sterilen Nährmedium (AOB- bzw. NOB-Medium) abgespült, um lose Zellen zu entfernen.

Die Proben wurden dann mit 100-400 µL DAPI-Arbeitslösung benetzt und für 5-10 min bei 4 °C im Dunklen inkubiert. Anschließend wurden die Proben zweimal mit Reinstwasser gespült und luftgetrocknet. DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol) bindet selektiv an DNA und fluoresziert im UV-Licht. Die so gefärbten Zellen wurden am EFM (Epifluoreszenz-Mikroskop) mit Hilfe der AxioVision Software 4.7.X ausgezählt (Abb. 4.2).



PP-Folie mit 20% Talkum und 3% Ruß
953 Zellen

PP-Folie mit 20% Glasfaser & ca. 2% Ruß
243 Zellen

Abb. 4.2: EFM Aufnahmen der angehefteten und mit DAPI gefärbten Zellen auf den Folien mit Zellen aus einer AOB-Anreicherungskultur aus der Anlage in Büsum. Balken = 10µm.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Auszählungen der verschiedenen Anheftungsversuche. Die Zellzahl bezieht sich jeweils auf ein Sichtfeld ($6046 \mu\text{m}^2$), die Mittelwerte entstanden aus 20 Auszählungen (Abb. 4.3 und 4.4).

Details zu den Folien:

Folie Talkum = PP Folie mit 20%Talkum und 3% Ruß (grüne Balken)

Folie Glasfaser = PP Folie mit 20% Glasfaser und 2% Ruß (rote Balken)

Die Folien wurden von der Firma GEA 2H Water Technologies zur Verfügung gestellt.

Eingesetzte Kulturen:

AOB 3L Kolben = angereicherte AOB aus der Anlage in Büsum (Probennahme 2005)

AOB Modul 1 / filtriert = angereicherte AOB aus der Anlage in Büsum (2005)

Nb 311 = NOB Reinkultur *Nitrobacter* Stamm 311, marin

NOB Kolben 1 = Abgeschüttelte Zellen von FK aus Modul 2 (aus Hemmtest (04/07))

NOB "1.2., = aus Büsum, mehrfach überimpft (Verdünnungsreihe), zum Teil im terrestrischen Medium

NSM 295 = NOB Reinkultur *Nitrospira marina* 295

Anheftungsversuch 1

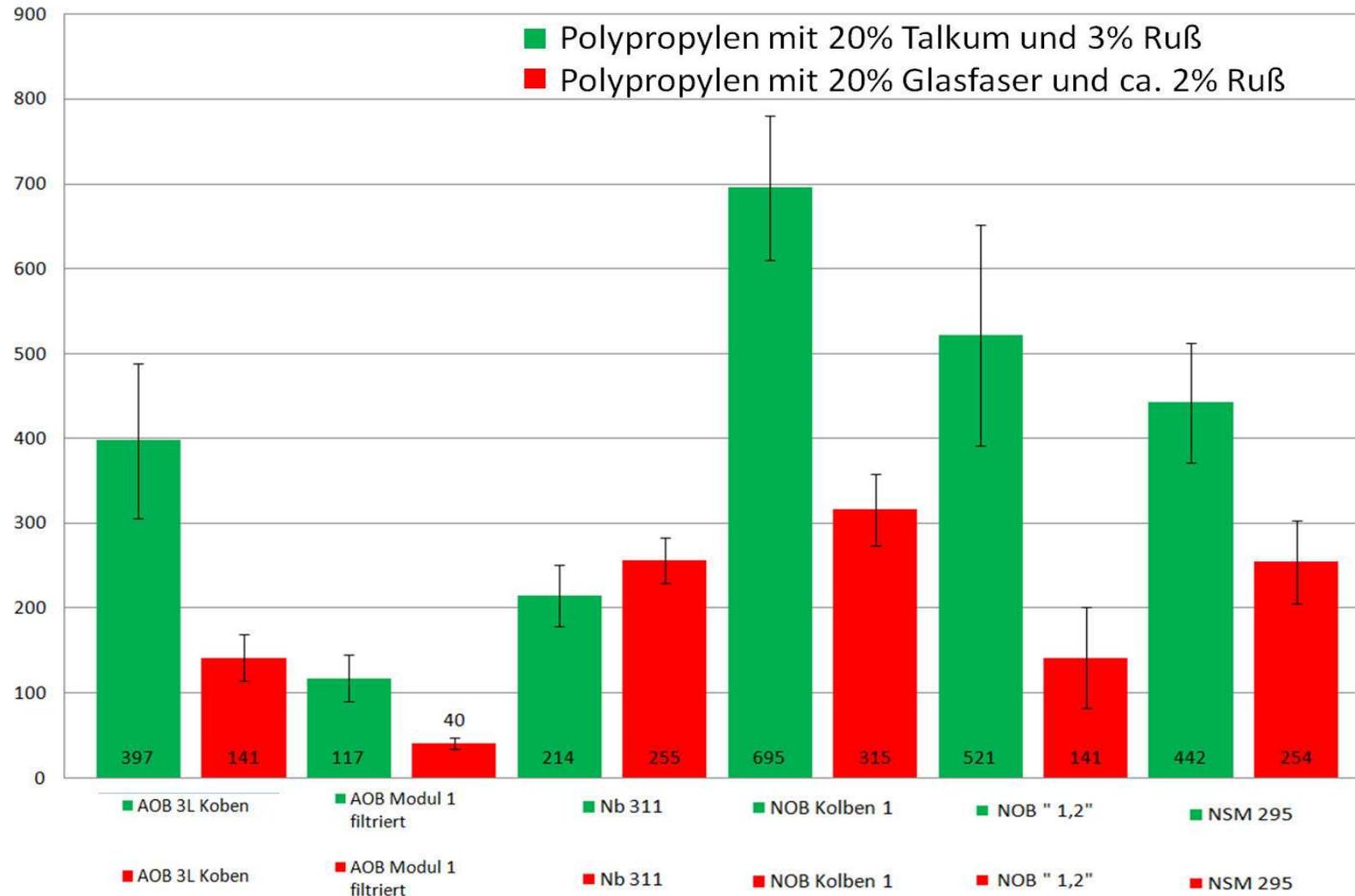


Abb. 4.3: Zellzahlen auf Folien mit Talkum (grün) und mit Glasfaser (rot) aus Versuch 1. Zahlen beziehen sich auf ein Sichtfeld (6046 μm^2) und sind der Mittelwert von +/- 20 Auszählungen.

Anheftungsversuch 2

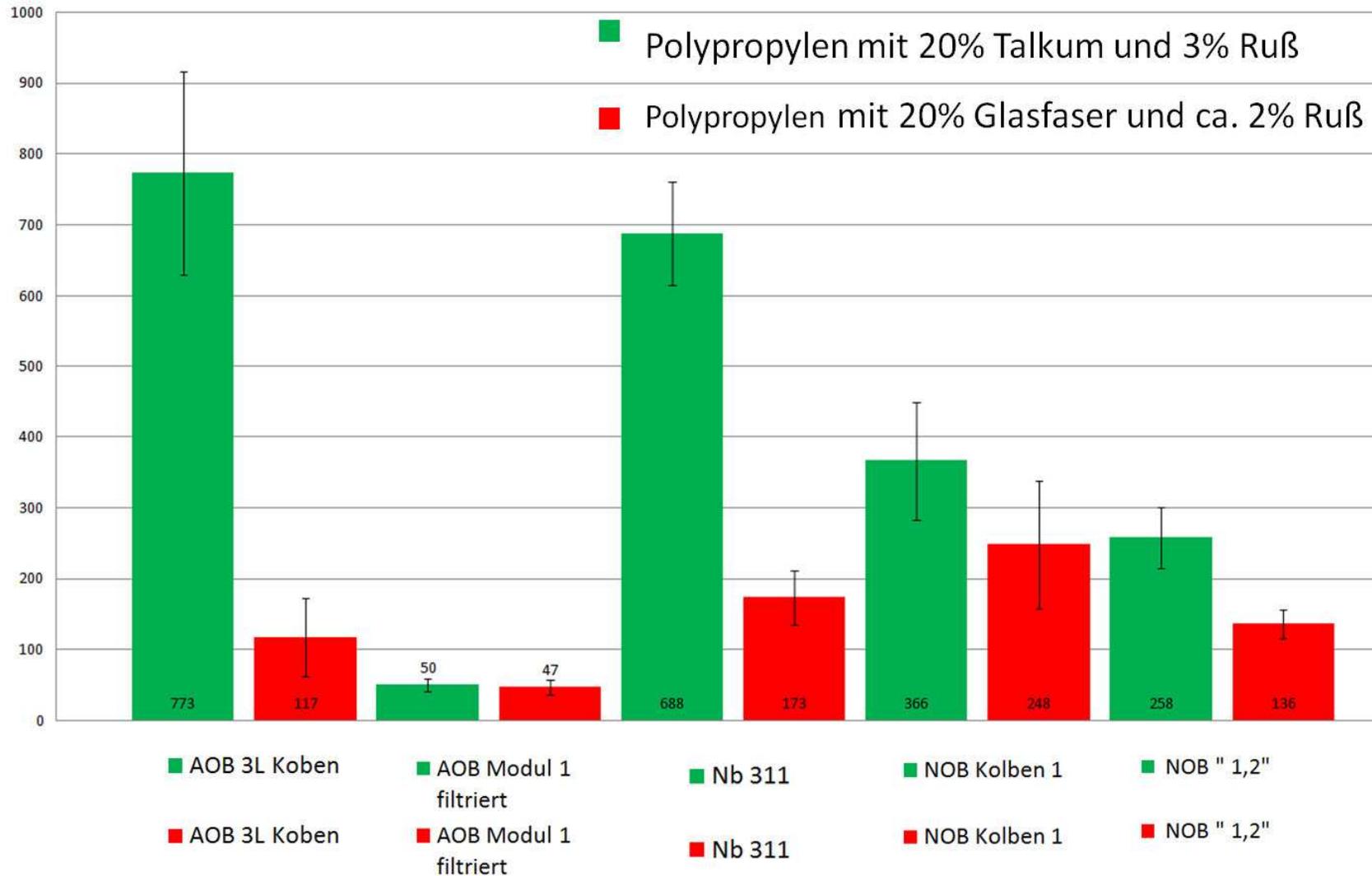


Abb. 4.4: Zellzahlen auf Folien mit Talkum (grün) und mit Glasfaser (rot) aus Versuch 2. Zahlen beziehen sich auf ein Sichtfeld (6046 μm^2) und sind der Mittelwert von +/- 20 Auszählungen.

Nach der verwendeten Methode ist die bakterielle Anheftung auf der PP-Folie mit 20% Talkum & 3% Ruß (PP-Folie 1) deutlich höher als auf der PP-Folie mit 20% Glasfaser und ca. 2% Ruß (PP-Folie 2). Es scheint daher, dass die Folie mit Talkum besser für die Primäranheftung geeignet ist als die Folie mit 20% Glasfaser.

Da DAPI an die DNA aller Mikroorganismen bindet, kann bei den Versuchen mit den Mischkulturen (Anreicherungen) aber nicht ausgeschlossen werden, dass es sich bei den angehefteten Zellen um andere Bakterien als Nitrifikanten handelt. Des Weiteren sollte überprüft werden, ob die Anheftung der Zellen mit deren Nitrifikationsleistung korreliert werden kann.

In den Langzeit-Hemmversuchen, die an der Uni Hamburg durchgeführt wurden, zeigte sich ein Polypropylengranulat mit 40% Glasfasern (die Folie hat 20%) als eines der am wenigsten hemmenden Granulate. Granulat aus Polypropylen mit Talkum stand nur mit einem Talkumgehalt von 70% zu Verfügung (ein Granulat, das zur Vermischung mit anderen Granulaten verwendet wird). Daher können die Ergebnisse aus den Anheftungs- und den Hemmversuchen nur schwer miteinander verglichen werden bzw. sie kongruieren nicht. Aus diesen und oben genannten Gründen werden bereits weitere Versuche durchgeführt:

Anheftungsversuche mit Folien aus Granulaten mit anschließenden Aktivitätstests

Um Ergebnisse aus den Anheftungstests mit denen aus den Hemmtests vergleichen zu können, wurden aus den Granulaten aus

- HDPE weiß (für 2H-BCN-09, im Folgenden auch HX 09 genannt)
- HDPE recycelt mit ca. 8% Ruß (für 2H-BCN-09, im Folgenden auch HX 09 genannt)
- HDPE 7700M (Trinkwasserzulassung)
- PP natur
- PP mit 40% Glasfaser und ca. 2% Ruß

selbst Folien hergestellt:

1. Ein Glasobjektträger wurde auf eine vorgeheizte Magnetrührplatte gelegt (190 °C für PP und 230 °C für HDPE)
2. Granulat wurde mit einer Pinzette auf den Objektträger gelegt
3. Ein zweiter Objektträger wurde auf das Granulat gelegt (Abb. 4.5)
4. Ein zweiter vorgeheizter Magnetrührer wurde auf die Objektträger gestellt (Sandwich, Abb. 4.6 und 4.7)
5. Nach ca. einer Minute wurden die Objektträger von der Heizplatte entnommen und bei Raumtemperatur abgekühlt (Abb. 4.8)



Abb. 4.5



Abb. 4.6

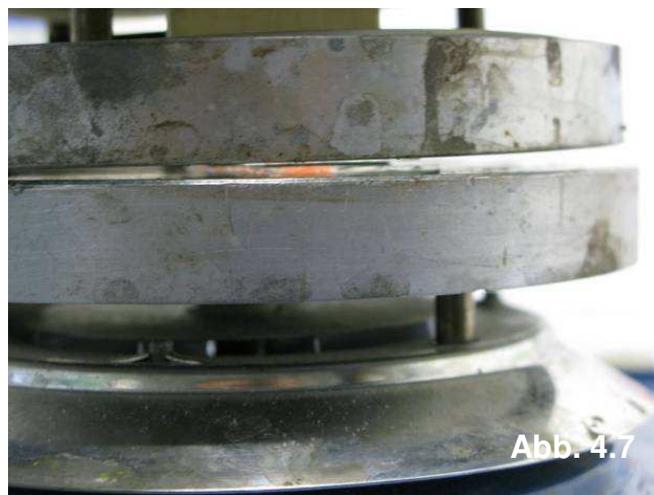


Abb. 4.7



Abb. 4.8

Versuchsdurchführung Anheftung (Vorversuch):

Für die Anheftungsversuche wurde *Nitrosomonas marina* Stamm 22 angezogen. Die aktiven Bakterien, in ihrem AOB-Nährmedium, wurden in eine sterile Schottflasche (1 Liter) mit Magnetrührerstäbchen überführt (500 ml Kultur, 500 ml Medium, 5 mM). Die fünf selbst hergestellten Folien aus Granulat und eine vorgefertigte Folie der Firma GEA 2H Water Technologies aus PP mit 20% Talkum und 3% Ruß wurden an einem Stab fixiert.

Dieser wurde 12 Stunden bei 80°C trocken sterilisiert und unter sterilen Bedingungen in die Schottflasche mit der Bakteriensuspension überführt und mit einem Septum verschlossen. Die Bakteriensuspension wurde durch einen Magnetrührer bei 500 U/min und 28 °C gerührt. Für die Sauerstoffversorgung wurde Druckluft (steril) mit einer Injektionsnadel in die Schottflasche eingebracht

Die Folien wurden nach 48 Stunden der Schottflasche entnommen, mit sterilem AOB-Medium abgespült und mit 100-400 µL DAPI-Arbeitslösung benetzt und für 5-10 min bei 4 °C im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Folien zweimal mit Reinstwasser gespült und luftgetrocknet.

Nach der Lufttrocknung wurden 20 bis 30 Bilder mit dem EFM aufgenommen und ausgezählt (Abb. 4.8). Bei Versuchsbeginn betrug die Zellzahl in der Schottflasche $9,84 \cdot 10^4$ Zellen/ml.

Tabelle 4.1: Auswertung des Anheftungsversuches mit *Nitrosomonas marina* Stamm 22 (Nmm22). Zellanzahl pro Sichtfeld und umgerechnet pro cm²

	HDPE (für HX09)	HDPE recyclet (für HX09)	7700M HDPE Trinkwasser Zulassung	Polypropylen mit 20% Glasfaser und ca. 2% Ruß	Polypropylen mit 20% Talkum und 3% Ruß	Polypropylen natur
Zellen pro 6045,5 µm ²	64,45±35,8	22,37±6,7	17,26±9,8	27,2±8,6	67,8±18,5	24,5±10,6
Zellen pro cm ²	1,07E+04 ± 5,92E+03	3,70E+03 ± 1,11E+03	2,85E+03 ± 1,62E+03	4,50E+03 ± 1,42E+03	1,12E+04 ± 3,06E+03	4,05 E+03 ± 1,75E+03

Ergebnis:

Nach der verwendeten Methode ist die bakterielle Anheftung auf der PP-Folie mit 20% Talkum und 3% Ruß und HDPE weiß deutlich höher als auf den anderen Folien, wobei die Standardabweichung bei der HDPE Folie sehr groß ist. Auf der Folie aus dem 7700M Granulat (mit Trinkwasserzulassung) hatten sich in diesem Versuch am wenigsten Zellen angeheftet. Pro cm² variieren die Zellzahlen zwischen $2,85 \cdot 10^3$ und $1,12 \cdot 10^4$. Zum Vergleich: in einem Biofilm aus einer RAS in Israel wurden auf einem cm² Material (Kabelbinder) mittels FISH $1,2 \cdot 10^{10}$ Zellen von *Nitrosomonas sp.* Nm143 und $3,6 \cdot 10^9$ Zellen von *Nitrosomonas marina* gezählt, also eine Gesamt-AOB Zellzahl von $1,6 \cdot 10^{10}$ (Fösel, 2007). Die Kabelbinder hingen mindestens ein halbes Jahr in einem arbeitenden Tropfkörper-Filter im Gegensatz zu unserem 48h-Versuch.

Die PP-Folie mit Talkum, an die sich in diesem Vorversuch wie auch schon in den Anheftungsversuchen 1 und 2 mit Polypropylenfolien am meisten Bakterien geheftet hatten, liegen nicht als Granulate vor. Nur ein Granulat mit 70% Talkum wurde in den Hemmtests mit anderen Granulaten verglichen und zeigte einen relativ starken negativen Effekt.

Die Folie aus PP mit 20% Talkum (5 g, 90 cm²) wurde in Hemmtest 6 mit der Folie mit Glasfaser (5 g, 194 cm²), dem Granulat mit Glasfasern (40%) und HDPE recyclet verglichen. In den AOB-Ansätzen hemmte die Talkum-Folie die Nitrifikation weniger als die PP-Folie mit 20% Glasfasern. Bei den NOB hemmte sie jedoch sogar mehr als das HDPE recyclet, obwohl die Granulate bis zu dreimal und die Folie mit

Glasfaser doppelt soviel Oberfläche aufwiesen wie die Folie mit Talkum. Es ist somit möglich, dass NOB und AOB verschieden stark durch die Kunststoffe gehemmt werden und sich dementsprechend unterschiedlich gut an diesen anheften.

Ein weiterer möglicher Grund für die Unterschiede in den Ergebnissen der Anheftungs- und Hemmtest könnte sein, dass die Anheftung primär nicht mit der Aktivität korreliert. Die weiteren Ergebnisse aus Duisburg (Anheftungsversuch mit anschließendem Aktivitätstest) können hier für Klärung sorgen.

Für zukünftige Versuche sollten weitere Nitrifikanten eingesetzt werden (AOB: *Nitrosomonas marina* 22; NOB: *Nitrospira marina* 295 und ECO2.1, eine Anreicherung aus Büsum). Zu den zu testenden Folien kommt noch eine PP Folie mit 70% Talkum dazu sowie eine Folie aus LDPE. Die Anheftungsversuche werden dann mit den verschiedenen Bakterien auf den Folien mit mindestens fünfmaliger Wiederholung durchgeführt und ein anschließender Aktivitätstest soll die Nitrifikationsleistung im Vergleich zu planktonischen Zellen bewerten. Eventuell sollen AFM Aufnahmen der Folien nach DAPI Färbung und Lufttrocknung angefertigt werden.

Aktivitätstest mit neuen FK aus einem Hemmtest (20.04.2009)

In dem Aktivitätstest am 20.04.2009 wurden FK eingesetzt, die zuvor schon in einem Hemmtest eingesetzt worden waren. Es handelte sich hierbei um fabrikneue (2 Wochen gespülte) schwarze und weiße FK des Typs BCN 09 und FK aus HDPE mit Trinkwasserzulassung des Typs BCN 012 KL (Oberfläche $859 \text{ m}^2/\text{m}^3$).

Der Hemmtest (Start am 01.04.2009) wurde mit 100 ml 4 mM Substrat (Nitrit) angesetzt und 3ml Zellsuspension versehen. Von den BCN 09 FK wurden jeweils 10 (insgesamt 81 cm^2 Fläche), von den BCN 012 KL jeweils 4 Stück (insgesamt $76,4 \text{ cm}^2$ Fläche) in die Kolben gegeben. Nach 20 Tagen war kein Nitrit mehr in den Kolben, wobei alle Versuchsansätze samt Kontrolle gleich lang für die Nitritoxidation gebraucht haben. In den darauf folgenden Aktivitätstest wurden je 5 BCN 09 (= $40,5 \text{ cm}^2$) bzw. 2 BCN 012 KL (= $38,2 \text{ cm}^2$) mit sterilem NaCl abgespült (um lose Zellen zu entfernen) und in 20 ml mineralisches Medium mit 1 mM Nitrit gegeben. Die beiden Parallelen der schwarzen und weißen BCN 09 FK zeigten untereinander keine Unterschiede in der Nitrifikation, in allen 4 Kolben war nach 2 Tagen kein Nitrit mehr zu messen (Abb. 4.9). Vermehrte Probenahmen hätten hier vielleicht zu einem Unterschied geführt. In den Kolben mit den BCN 012 KL FK war die Nitrifikation erst nach 4 bzw. 7 (wahrscheinlich 5,5) Tagen abgeschlossen, obwohl die eingesetzte Oberfläche nur ca. 2 cm^2 kleiner war als die der BCN 09 FK. Es scheinen sich also weitaus weniger Zellen während des Hemmtests auf die Oberfläche der BCN 012 KL aus HDPE mit Trinkwasserzulassung geheftet haben.

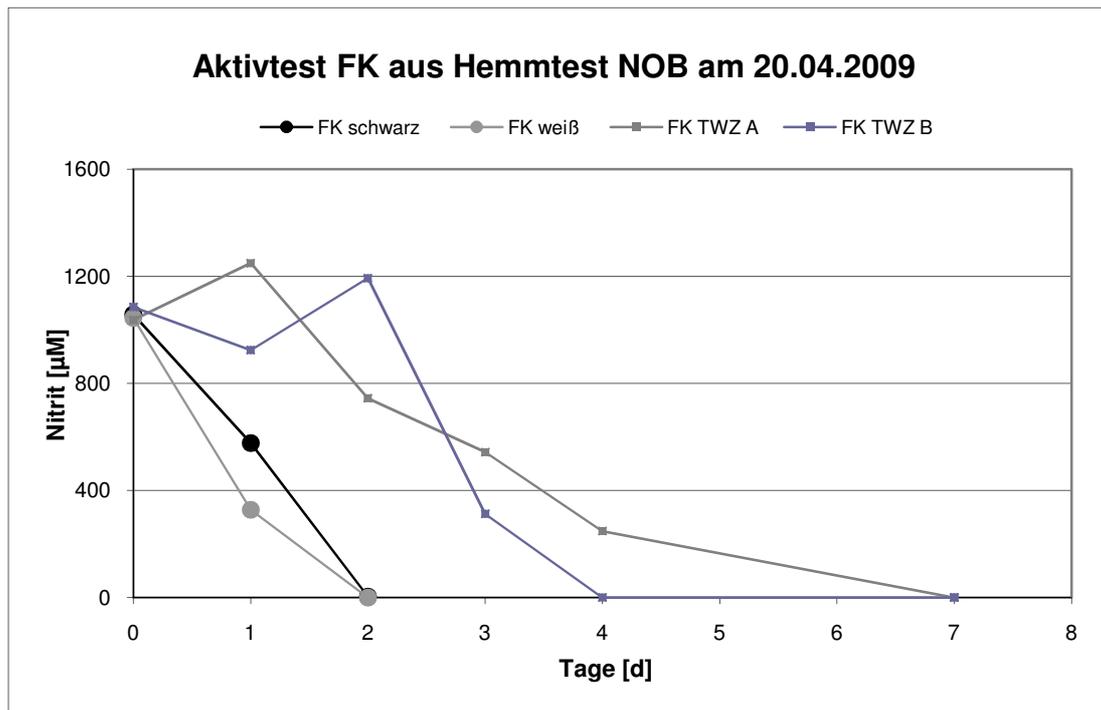


Abb. 4.8: Nitritabnahme durch Oxidation von angehefteten Zellen auf den FK aus vorherigem Hemmtest.

Aktivitätstest mit neuen und gebrauchten FK aus einem Hemmtest (29.1.2008)

Es wurde diskutiert, ob eine Konditionierung der Füllkörper die Anheftung von nitrifizierenden Bakterien fördern könnte. In dem Aktivitätstest am 28.01.2008 wurden FK eingesetzt, die zuvor schon in einem Hemmtest eingesetzt worden waren. Es handelte sich hierbei um fabrikneue (15 Monate in Wasser gespülte) und bereits gebrauchte schwarze und weiße FK. Letztere waren der Anlage in Strande entnommen, autoklaviert und mit Ultraschall, SDS (Sodium Dodecyl Sulphate) und Essigsäure gereinigt worden.

Im beschriebenen Hemmtest wurden je 50 dieser FK in NOB Medium mit je 5 mM Substrat und 5 ml Zellsuspension bei 28 °C geschüttelt. Die Nitrifikation war nach 10 Tagen abgeschlossen und zeigte keinerlei Unterschiede zwischen den verschiedenen FK. Nun wurde die Abbauleistung der wieder besiedelten FK in einem Aktivitätstest (1 und 3 mM, 10 FK in 40 ml) untersucht. Die Messungen der Nitritkonzentration in den Ansätzen ergaben, dass die schwarzen FK weder im 1 mM (2 Parallelen) noch im 3 mM Medium Unterschiede in der Nitrifikationsleistung zwischen den fabrikneuen und den gebrauchten FK aufwiesen. Bei den weißen FK allerdings waren die Unterschiede extrem: im Ansatz mit 1 mM Substrat war dieses in einer Parallele mit den gebrauchten (alten) FK nach 100 Stunden abgebaut (entspricht den schwarzen FK), in der anderen Parallele nach knapp 200 Stunden. Das Nitrit in den Ansätzen mit den neuen FK war nach dieser Zeit nicht einmal zur Hälfte abgebaut (Abb. 4.10). In den Ansätzen mit 3 mM Substrat war auch nach 200 Stunden keine nennenswerte Nitrifikation in dem Kolben mit den neuen weißen FK zu messen, in dem Versuchskolben mit den alten FK waren zwei Drittel der

Substratmenge umgesetzt. Hier dauerte die lag- Phase im Gegensatz zu den schwarzen FK etwas länger, die Abbaurrate war dann aber vergleichbar (Abb. 4.11). In diesem Aktivitätstest verlief die Besiedlung der Nitritoxidenten auf schwarzen FK (unter den Bedingungen des vorhergegangenen Hemmtests) schneller als auf weißen FK und auf weißen, vorher genutzten FK schneller als auf fabrikneuen FK. In dem vorher beschriebenen Test, in dem nur neue FK eingesetzt wurden, war die Aktivität bei den schwarzen und weißen FK gleich groß. Der Unterschied zwischen diesen beiden Tests besteht darin, dass i) die Nitrifikation im vorhergegangenen Hemmtest unterschiedlich lange dauerte (10 bzw. 20 Tage) und ii) die FK unterschiedlich lang gespült worden waren (15 Monate bzw. 20 Tage). In den Anheftungsversuchen mit *Nitrosomonas marina* strain 22 und den selbst hergestellten Folien hatten sich mehr Bakterien auf die weiße als auf die schwarze Folie angeheftet. Diese Diskrepanz soll durch weitere Anheftungs-Versuche geklärt werden. Ebenso sollen FK in Aktivitätstests eingesetzt werden, die auf verschiedene Weisen konditioniert wurden. Mögliche Konditionierungsmethoden, die betrieblich auch anwendbar erscheinen, wären:

- Erhitzen (bis zum Beispiel 90 °C)
- Behandlung mit leichter Säure/Alkohol
- Abstrahlen mit Sand/Wasser- Gemisch

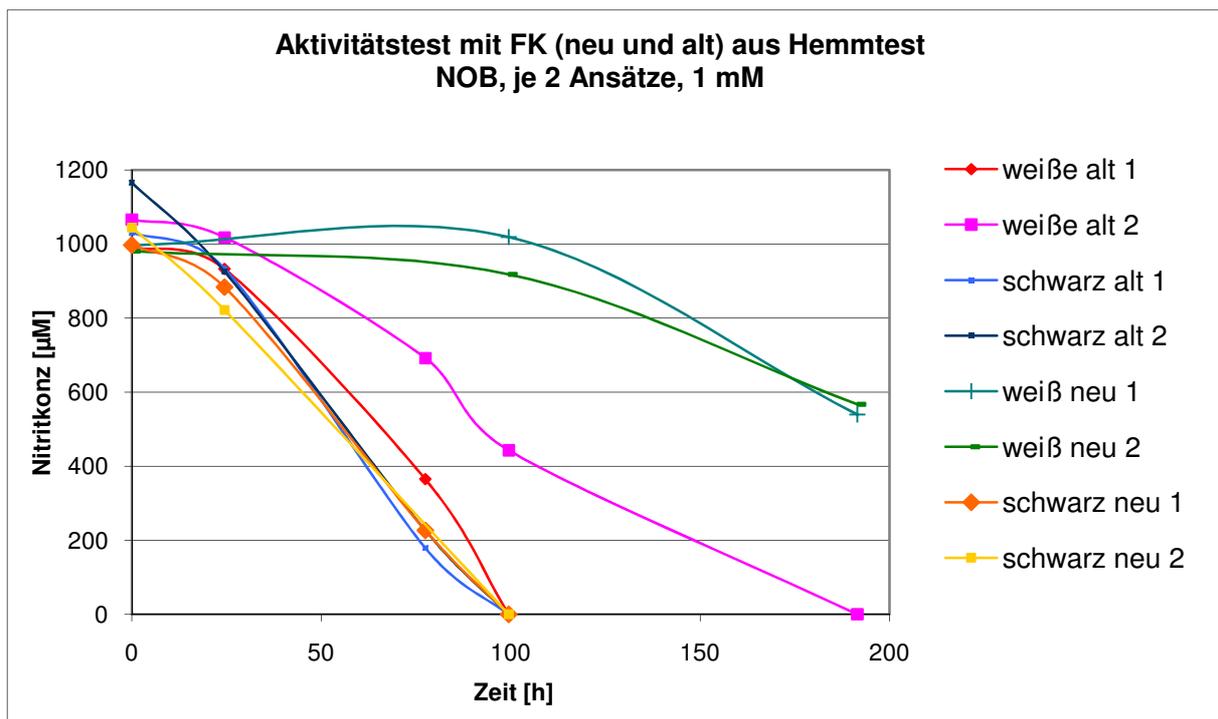


Abb. 4.9: Nitritabnahme durch Oxidation von angehefteten Zellen auf den neuen und alten FK aus vorherigem Hemmtest (NOB) bei einer Ausgangskonzentration von 1 mM.

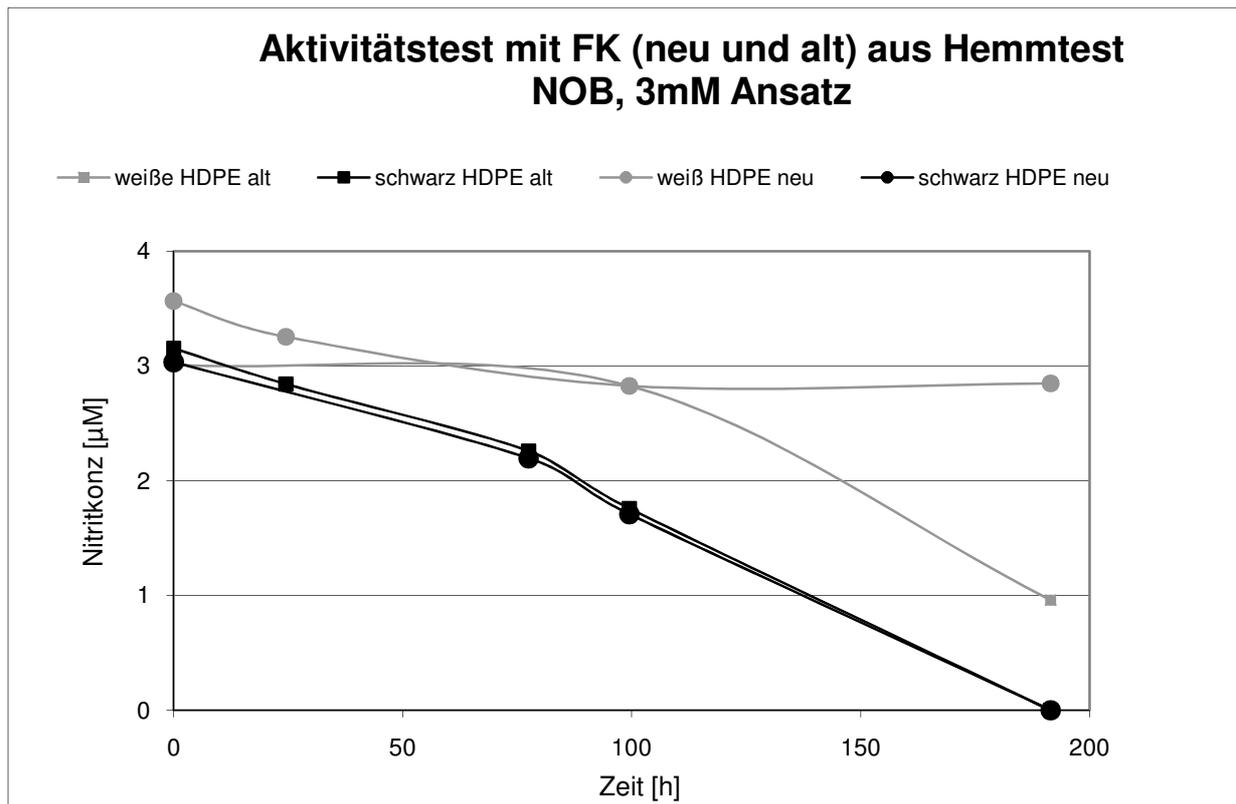


Abb. 4.10: Nitritabnahme durch Oxidation von angehefteten Zellen auf den FK aus vorherigem Hemmtest (NOB) bei einer Ausgangskonzentration von 3 mM.

REM und AFM Aufnahmen von bewachsenen Granulaten und Folien:

Im April 2009 wurden von Granulaten, die im Hemmtest 11 (AOB) eingesetzt worden waren, REM-Aufnahmen (Rasterelektronenmikroskopie) gemacht. Es sollte untersucht werden, ob man die angehefteten Zellen auf den verschiedenen Kunststoffen quantifizieren kann. Es stellte sich jedoch als sehr schwierig heraus, die Zellen zu zählen, da auch nach stundenlangem Suchen kaum Zellen entdeckt wurden. Diese befanden sich vorzugsweise in Vertiefungen. Abbildung 4.12 zeigt die Aufnahme von Zellen auf einem Granulatpellet aus recyceltem HDPE.



Abb. 4.11: REM-Aufnahme von Zellen in einer Vertiefung auf einem Granulatpellet aus recyceltem HDPE. Balken = 2 µm.

Die nächsten Bilder zeigen REM Aufnahmen von Granulaten in geringerer Auflösung (Balken = 500 µm). Das Polypropylen mit 40% Glasfaser (Abb. 4.13) hat eine deutlich strukturiertere Oberfläche als die Granulate aus HDPE (Abb. 4.15) und 100%em PP (Abb. 4.14).



Abb. 4.12: REM-Aufnahme eines Granulatpellets aus recyceltem Polypropylen mit 40% Glasfaser. Balken = 500 µm.

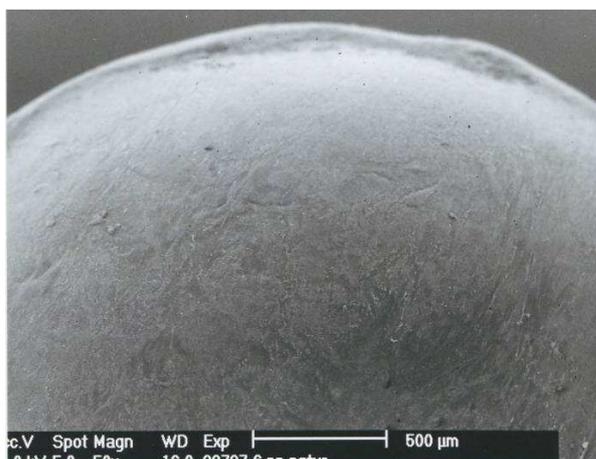


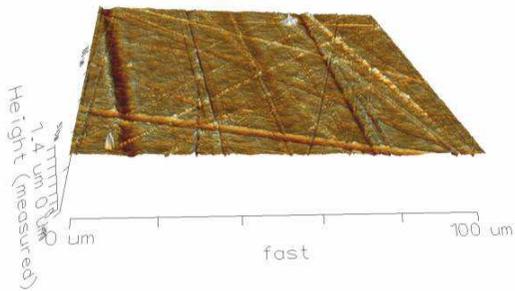
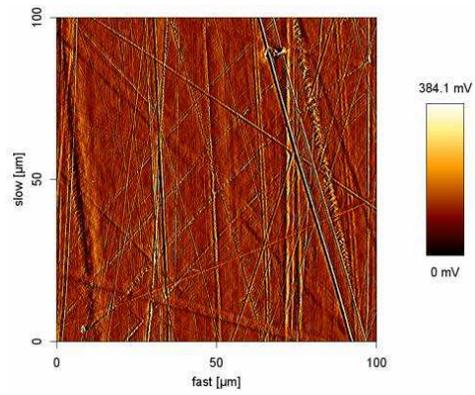
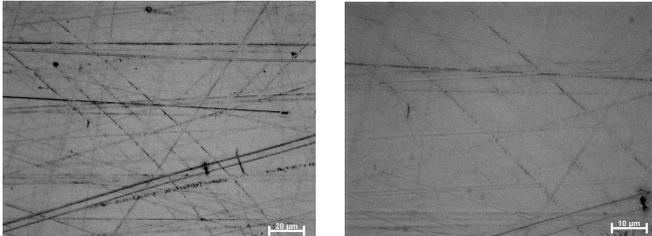
Abb. 4.13: REM-Aufnahme eines Granulatpellets aus 100%igem Polypropylen. Balken = 500 µm.



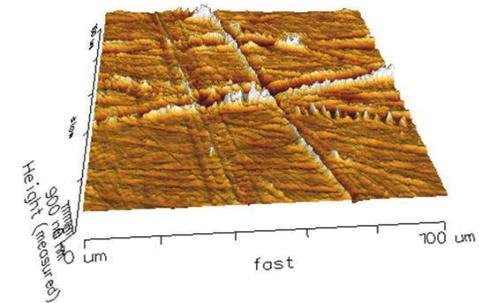
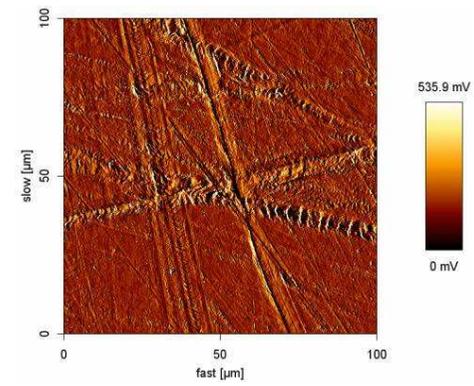
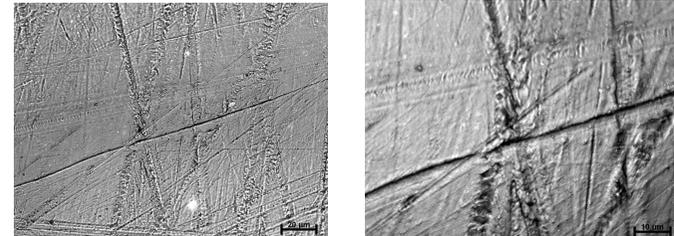
Abb. 4.14: REM-Aufnahme eines Granulatpellets aus weißem HDPE. Balken = 500 µm.

Die nächsten Bilder zeigen lichtmikroskopische und AFM-Aufnahmen einiger der selbst hergestellten Folien und der PP-Folie mit Talkum. Dabei wurden jeweils Ausschnitte vergrößert (40er und 100er Objektiv am Lichtmikroskop) und ein 100 x 100 µm Ausschnitt am AFM aufgenommen. Bei letzterem werden zwei Abbildungen erzeugt. Die erste ist die Abbildung der vertikalen Ablenkung des Cantilevers („vertical deflection“), die ein 2D-Bild der Oberfläche ohne Höheninformationen zeigt. Die zweite ist die sogenannte Höhen oder „Height“-Darstellung. In dieser Abbildung kann man zwar gut die Höhe einzelner Scan-Elemente ablesen, scharfe Kanten gibt es jedoch nicht.

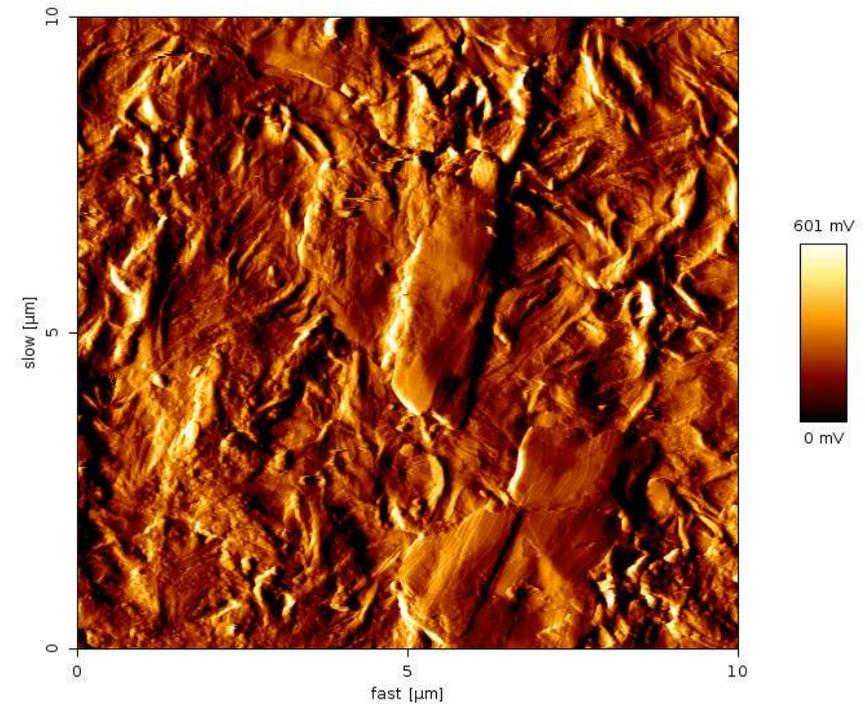
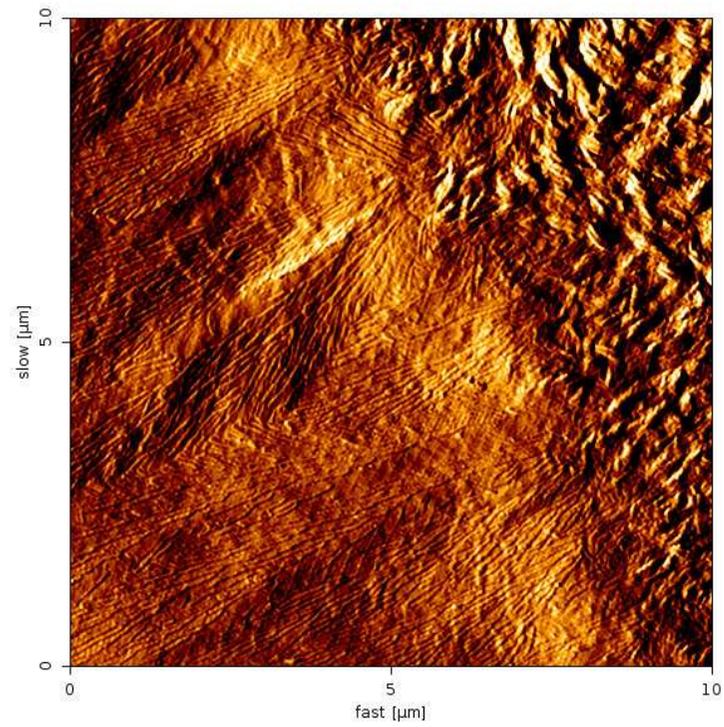
HDPE weiß



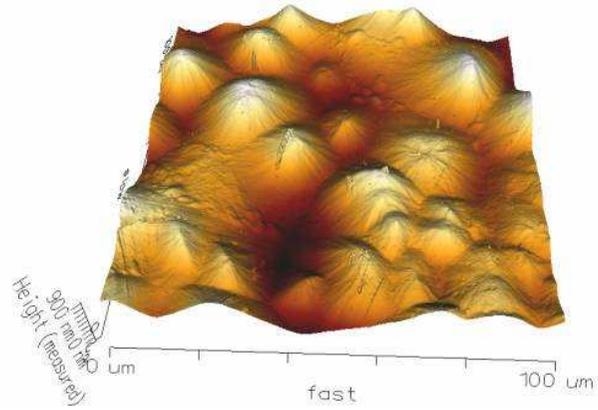
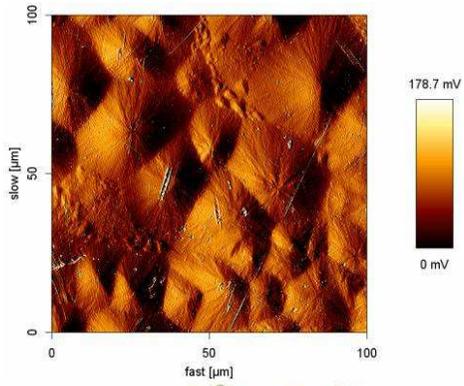
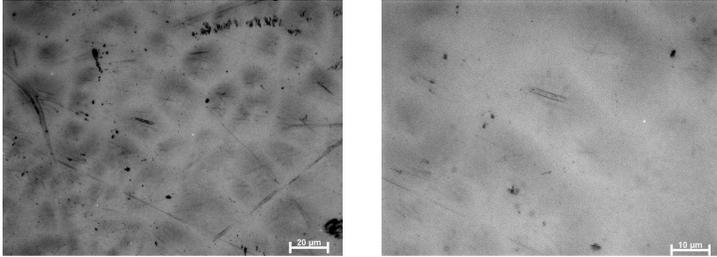
HDPE recycelt



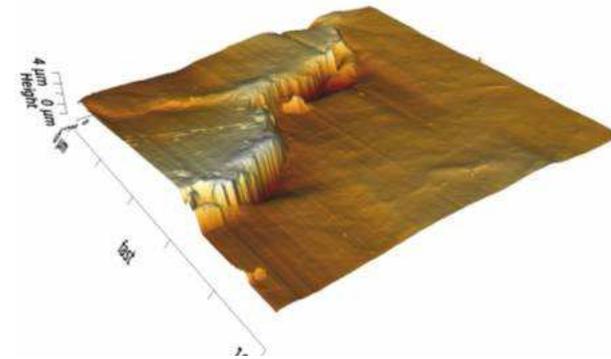
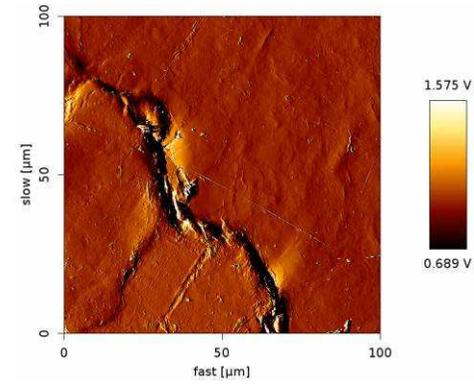
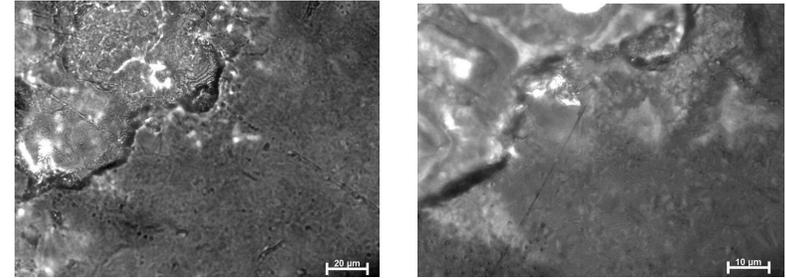
Weiße (links) und recycelte (rechts) Füllkörper aus HDPE (10 x 10 μm):



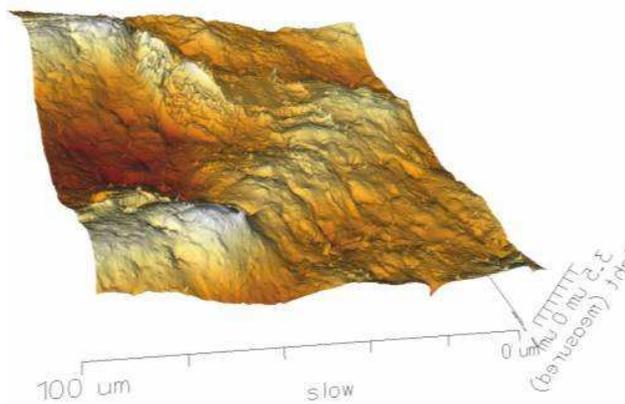
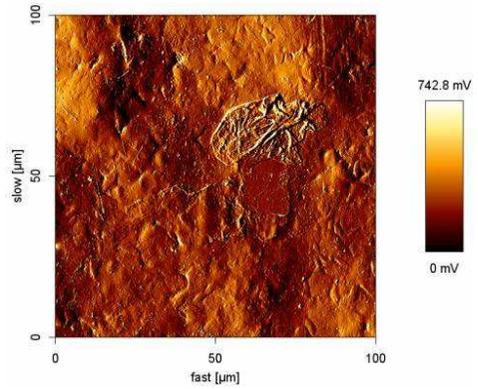
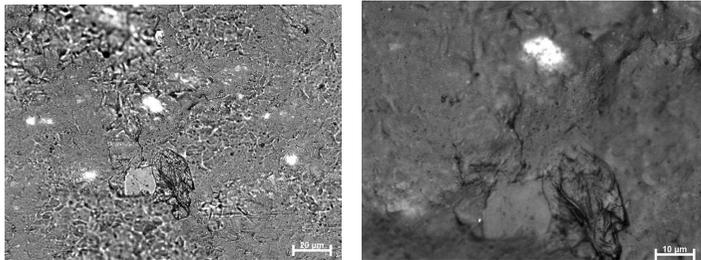
Polypropylen 100%



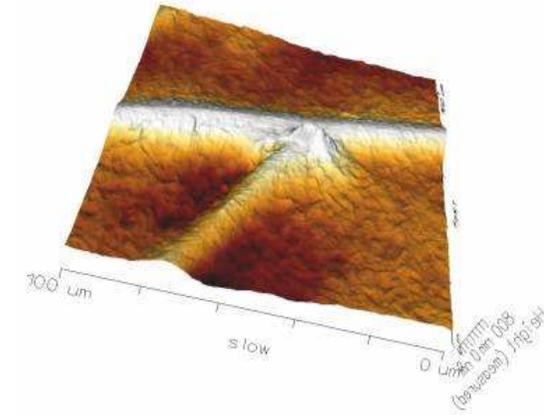
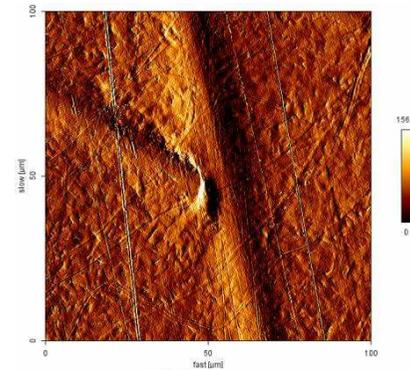
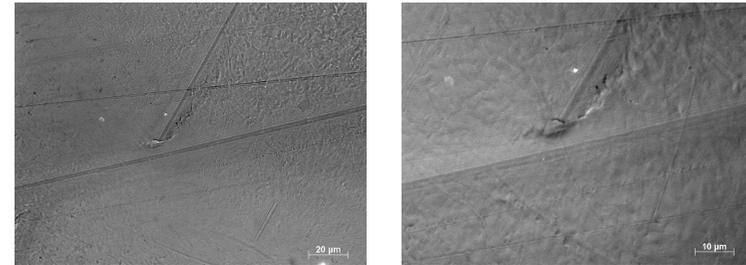
PP mit 70% Talkum



PP mit 20% Talkum und 3% Ruß (werksfertige Folie)



PP mit 30% Glasfaser



Quantifizierung der Nitrifikationsleistung der FK aus den Anlagen Strande und Büsum

Einleitung

Die Nitrifikationsleistung eines Biofilters ist hauptsächlich eine Funktion der Art des Biofiltermediums und des Volumens des Biofilters (Losordo und Hobbs, 2000). Jedes Biofiltermedium hat eine spezifische Oberfläche, angegeben als Quadratmeter pro Volumen. Die Nitrifikationsleistungen verschiedener Medien sind meist in g TAN/m²/Tag angegeben (TAN = total ammonia-nitrogen). Normale Nitrifikationsraten variieren zwischen 0,15 – 1,0 g TAN/m²/Tag. Sie sind stark von der Art des Mediums als auch von der Biofiltrationstechnik abhängig (Losordo und Hobbs, 2000). In diesem Bericht werden die Nitrifikationsleistungen in Mol pro Fläche oder FK angegeben. Da Ammoniak und Nitrit stöchiometrisch 1:1 zu Nitrit bzw. Nitrat umgesetzt werden, ist die Angabe in Mol praktikabler und es können die Umsatzraten der AOB mit denen der NOB verglichen werden.

2H-BCN-09 lautet der Handelsname der Füllkörper, die in den Anlagen in Büsum und Strande verwendet werden. Ihre Oberfläche wird in Gesamtoberfläche (836 m²/m³) und geschützte Oberfläche (494 m²/m³) unterteilt, da durch Strömung und Reibung an der äußeren Fläche der Füllkörper die Bildung von Biofilmen verhindert wird. In Büsum wurden nur recycelte, also schwarze Füllkörper dieser Art eingesetzt, in der Shrimpzuchtanlage in Strande wurde neben den schwarzen auch einige weiße FK des Typs 2H-BCN-09 in den Biofilter gefüllt. Weitere Füllkörper der Firma GEA 2H wurden von Stefanie Beth im Rahmen ihrer Diplomarbeit 2006/07 in der Versuchsanlage in Strande getestet.

Abbauleistungstest

In der zweiten Phase des Projektes wurde die Methode zur Bestimmung der Nitrifikations- oder Abbauleistung, die in der ersten Phase entwickelt wurde, übernommen und den jeweiligen Fragestellungen angepasst. Es handelt sich um potentielle Aktivitäten unter optimalen Laborbedingungen.

Methode (wenn nicht anders angegeben):

Es wurden je 10 bzw. 5 FK aus den Anlagen in 50 bzw. 25 ml steriles Medium gegeben. Die Kolben wurden stets geschüttelt (ca. 170rpm) und die Probenahmen erfolgten alle paar Stunden, je nach Aktivität auch bis zu 72 Stunden lang. Je nach Herkunft der FK erfolgten die Versuche bei 17 °C (Büsum) oder bei 28 °C (Strande). Die Konzentrationsänderung von Nitrit und Nitrat wurde mittels HPLC gemessen. Die Aktivität wurde dann über die Steigung der Geraden bestimmt (bei den AOB über die Zunahme von Nitrit plus Nitrat, bei den NOB über die Abnahme von Nitrit über die Zeit (h)).

Ergebnisse

Abbauleistung der FK aus dem Biofilter der Shrimp-Anlage in Strande:

Die Shrimp-Anlage besteht aus drei miteinander verbundenen Becken (gesamt 189 m³), in denen Garnelen der Art *Penaeus vannamei* als Postlarven eingesetzt und bis zu Marktgröße herangezogen werden. Der dazugehörige Biofilter hat ein Volumen von 11,3 m³ und wurde 2007 mit ca. 3 m³ FK in Betrieb genommen. Das Wasser durchläuft die Anlage mit 200 Litern pro Minute. Frischwasser wird der Ostsee entnommen, die Betriebstemperatur liegt um 28 °C, der Sauerstoffgehalt der Aufzuchtbecken schwankt zwischen 6,5 und 7mg/l und der pH-Wert liegt um 7. Das Shrimpfutter (außer Postlarven) besteht seit 2008 aus 35 % Protein und 9 % Fett (2007: 52 % Protein und 13 % Fett).

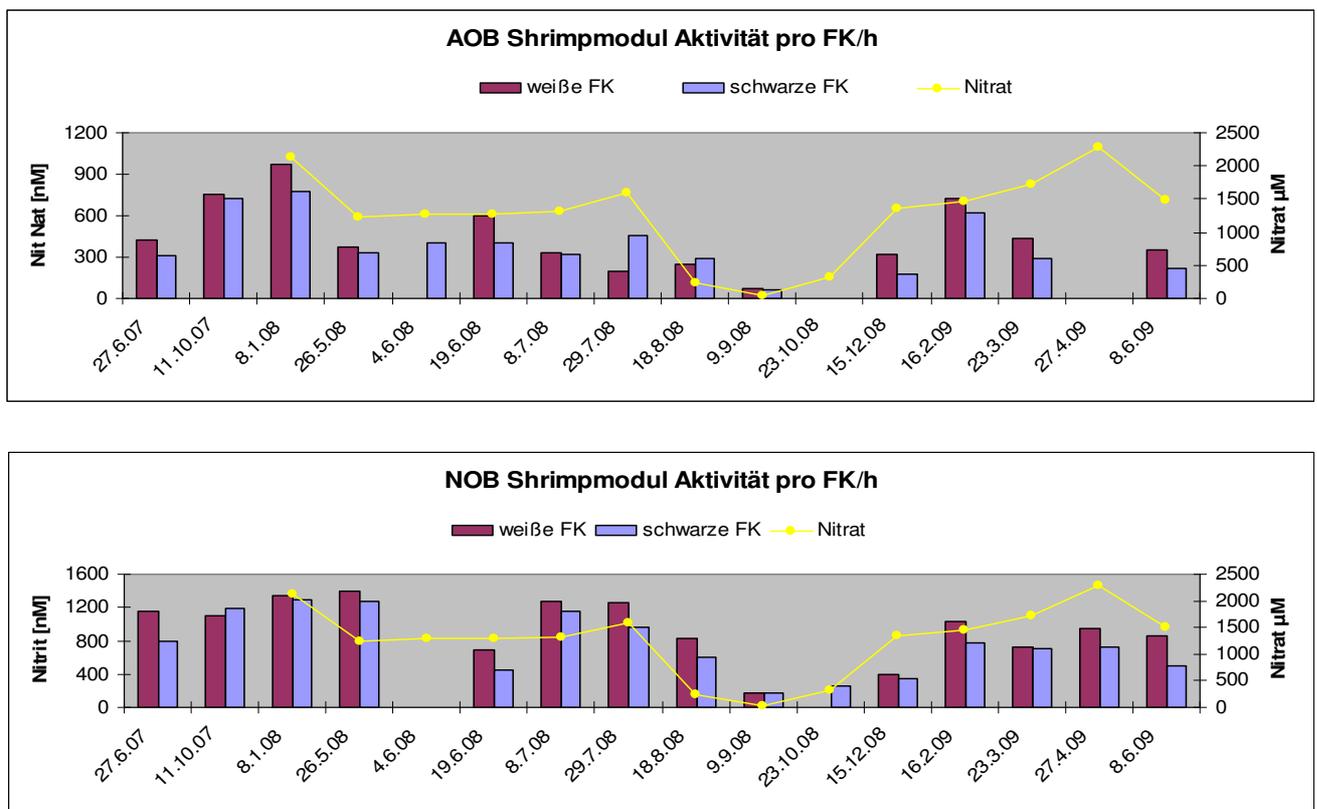


Abb. 5.1: Nitrifikationsleistungen in nM pro FK/Stunde der AOB (oben) und NOB (unten) im Shrimp-Modul über zwei Jahre hinweg. Der gelbe Graph beschreibt die Nitratkonzentrationen im Biofilter.

In den Balkendiagrammen (Abbildung 5.1) sind die Aktivitäten in Nanomol pro Stunde pro Füllkörper aufgetragen. Für eine Umrechnung in Fläche müssten die Werte durch 4,76 cm² geteilt werden (= geschätzte Fläche pro FK des Typs 2H-BCN-09). 1000 nmol/h*FK sind umgerechnet 0,8 mg TAN/m²*Tag. Die Abbauleistung der weißen Füllkörper ist mit einer Ausnahme stets größer, der Unterschied ist aber nicht signifikant (T-Test, ungepaart). Die Abbauleistung der NOB ist größer, zu einigen Zeiten sogar dreimal so hoch wie die der AOB (zum Beispiel im Mai 2008: 374 (weiß) und 326 (schwarz) nmol pro FK/h bei den AOB und 1389 bzw. 1275nmol pro FK/h bei den NOB. Ebenfalls reagierten die NOB langsamer auf einen Belastungsabfall in der Anlage. Ab Mai/Juni 2008 wurden die Shrimps abverkauft, ab August wurde nicht mehr gefüttert und die Becken waren im August/September für einige Wochen leer, bis im September

neue Postlarven eingesetzt wurden. Daher entstand im Oktober 2008 ein leichter Nitritpeak in der Anlage ($\sim 100\mu\text{M}$), da die Fütterung wieder begonnen hatte. An der Kurve der Nitratkonzentration (gelb) kann man die Belastung des Biofilters über die Zeit gut nachvollziehen. Im September 2008 war die Nitratkonzentration sogar bis auf knapp $40\mu\text{M}$ gesunken, was durch den Wasseraustausch verursacht wurde und nicht durch Denitrifikationsprozesse, da der Biofilter über die ganze Zeit hinweg normal belüftet wurde.

„Beutel“ - Proben

Am 10. Mai 2008 wurden zwei Netzbeutel in den Biofilter der Anlage Strande gehängt (Abb. 5.2). In ihnen befanden sich recycelte und weiße FK des Typs BN09. Die Maschengröße der Beutel wurde so gewählt, dass gerade keine FK herausrutschen konnten und eine Durchströmung mit dem Biofilterwasser gewährleistet war. Durch ein Gewicht hingen die Beutel ca. 1 m unterhalb der Oberfläche. Einer der Beutel wurde insgesamt achtmal bis zum 09.09.2008 beprobt. Die FK wurden gekühlt nach Hamburg gebracht und deren Abbauleistung am nächsten Tag untersucht. Parallel dazu wurden jeweils die „alten“ FK aus dem Biofilter im Test eingesetzt. Ziel dieser Untersuchung war es, die Erst-Besiedlung der FK mit nitrifizierenden Mikroorganismen anhand der zunehmenden Abbauleistung zeitlich zu verfolgen. In der Literatur wird für die vollständige Besiedlung ein Zeitraum von 28 – 60 Tagen angegeben (Carmignani and Bennett, 1977).



Abb. 5.2: Die beiden Beutel werden in den Biofilter gehängt.

Durch den starken Belastungsabfall seit August 2008 (siehe oben) verringerte sich die Abbauleistung der alten FK von Mai bis September von rund 350 nmol/h*FK (AOB) und 1300 nmol/h*FK (NOB) auf 75 nmol/h*FK (AOB) und 165 nmol/h*FK (NOB). Die Abbauleistung der neuen FK in den Beuteln stieg bis Ende Juli langsam an, dann sank auch diese wieder bis Oktober, so dass die Abbauleistungen der neuen und alten FK bis zum Ende der Probenahmen nicht auf denselben Wert kamen (Abb. 5.3). Die AOB zeigten zu Beginn des Versuchs einen schnelleren Anstieg ihrer Aktivität. Erst nach elf Wochen hatten die NOB die AOB diesbezüglich eingeholt. Wie auch die Ergebnisse der Aktivitätstests der „alten“ FK gezeigt haben, nahm das Nitrifikationspotential der NOB als Reaktion auf den Belastungsabfall weniger schnell ab als das der AOB.

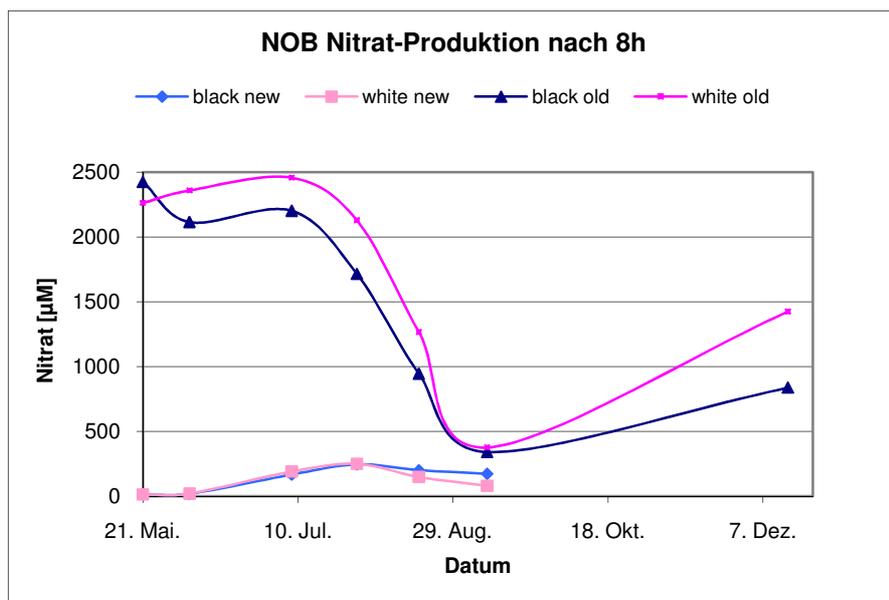
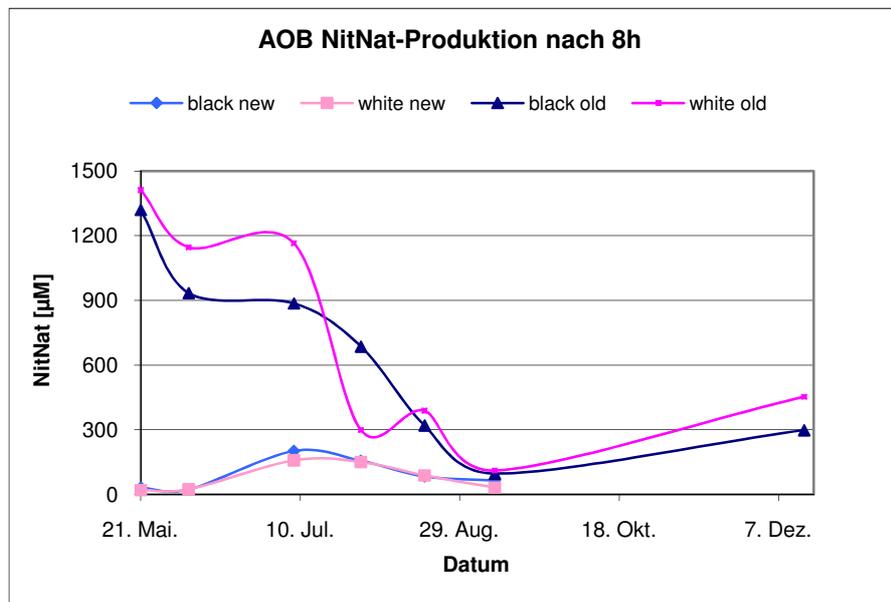


Abb. 5.3: Produktion von Nitrit + Nitrat (AOB, oben) bzw. Nitrat (NOB, unten) von je 10 FK in 50 ml Medium in 8 Stunden. Die FK aus den Beuteln (black bzw. white new) wurden nur bis September beprobt.

Abbauleistungen in der Versuchsanlage Strande (Tonnen):

In ihrer Diplomarbeit untersuchte Stefanie Beth 2006/07 die Abbauleistungen von fünf verschiedenen FK in der Versuchsanlage Strande, die aus zehn hintereinander geschlossenen Regenwassertonnen bestand, von denen jeweils zwei mit den gleichen FK befüllt wurden. Dieser Biofilter reinigte das Wasser von 4 kleineren Becken (je 2,7 m³), in denen bis Dezember 2008 Barramundi (*Lates calcarifer*) gehalten wurden (siehe Bericht Phase I). Am 14.06.2007 und am 11.10.2007 (ca. ein Jahr nach Inbetriebnahme) wurden erneut FK aus diesen Tonnen entnommen und in einem Aktivitätstest eingesetzt, um die Ergebnisse aus der Versuchsanlage mit denen aus den Versuchen im Labor zu vergleichen. Die Tabelle 5.1 zeigt die Ergebnisse des Versuchs mit den Proben vom 11.10.2007. Vergleicht man die FK untereinander, stimmen die Ergebnissen mit denen aus der Diplomarbeit überein. Die Ergebnisse der FK des Typs InterAqua-CurlerAdvanced X-1 werden hier nicht diskutiert, da für diesen Typ keine Angaben über die Fläche pro FK oder Stückzahl pro Volumen vorliegen.

Tabelle 5.1:

Vergleich der FK aus den Versuchstonnen in Strande am 11.10.2007:				
AOB	Abbauleistung in			
	$\mu\text{M}/\text{h} \cdot \text{Ansatz}$	$\text{nmol}/\text{h} \cdot \text{FK}$	$\text{nmol}/\text{h} \cdot \text{m}^3$	$\text{nmol}/\text{h} \cdot \text{cm}^2$ geschützte Fläche
HX09 weiß	146 (10FK)	732	755	153
HX09 schwarz	119 (10FK)	595	613	124
HXF12KLL	234 (5FK)	2340	1053	150
Anox Kaldnes	212 (2FK)	5300	504	101

Vergleich der FK in den Versuchstonnen in Strande am 11.10.2007:				
NOB	Abbauleistung in			
	$\mu\text{M}/\text{h} \cdot \text{Ansatz}$	$\text{nm}/\text{h} \cdot \text{FK}$	$\text{mm}/\text{h} \cdot \text{m}^3$	$\text{nm}/\text{h} \cdot \text{cm}^2$ geschützte Fläche
HX09 weiß	187 (10FK)	935	964	195
HX09 schwarz	204 (10FK)	1020	979	213
HXF12KLL	195 (5FK)	1950	878	125
Anox Kaldnes	211 (2FK)	5275	501	100

Ein erster Versuch mit den Proben vom 14.06. misslang leider und wurde am 27.06. wiederholt. Es konnten die gleichen Tendenzen festgestellt werden, allerdings waren die Abbauleistungen der FK bereits stark gesunken (keine Abbildung).

Wie Frau Beth schon beschrieben hatte, erreichten die HX09 weiß gegenüber den HX09 recycelt eine höhere Abbaurrate bei den AOB wie auch bei den NOB, obwohl beide Typen die gleiche Oberfläche aufweisen.

Die Abbauleistung pro m³ Schüttvolumen (eine handelsübliche Angabe für Füllkörper) ist am höchsten beim Typ HXF12KLL, da auch die Fläche pro Volumeneinheit größer ist als bei den anderen Typen. Pro cm² geschützte Fläche allerdings weisen die FK beider HX09-Typen eine größere Abbauleistung auf. Die Abbauleistung der FK des Typs Anox Kaldnes (HDPE) bildet sowohl pro Fläche als auch pro Schüttvolumen jeweils das Schlusslicht. Die Abbauleistung pro Fläche ist jedoch auch von der Bauart der jeweiligen FK abhängig. So wirken bei einigen FK mit großen Volumina eventuell stärkere Scherkräfte und die geschützte Fläche wäre damit nicht so verborgen wie bei anderen FK. Das wäre der Fall bei dem FK des Typs Anox Kaldnes. Bei dem FK des Typs HXF12KLL verhält es sich eventuell andersherum.

Abbauleistungen der FK in der Anlage Büsum

Die Anlage in Büsum wurde im Januar 2001 in Betrieb genommen, die neue Biofiltereinheit, wie sie auch im laufenden Projekt beprobt wurde, läuft seit Januar 2005. Die Anlage ist in zwei gleich große Systeme aufteilt, die Modul 1 und 2 genannt werden. Die Biofilter der Module sind wiederum in zwei gleich große Kompartimente aufgeteilt, die voneinander abgetrennt werden können. Die Biofilter fassen ein Volumen von je zwei mal 42 m³. Die Betriebstemperatur lag bei 15-20 °C, der pH-Wert bei 7.0, der Salzgehalt bei 24-30 ppm und der Sauerstoffgehalt bei 9-10 mg/l in den Fischbecken (Eintrag von technischem Sauerstoff), in den Biofiltern war er gesättigt.

Das Wasser der Fischbecken wird 2 Mal pro Stunde ausgetauscht, das entspricht einem Wasservolumen von 600 m³ pro Stunde, das durch die Komponenten der Wasseraufbereitung fließt. Etwa 5 – 10% des Produktionsvolumens (ca. 600m³, Gesamtwasservolumens ca. 900 m³) der Anlage werden täglich durch frisches Seewasser (ozoniert) ersetzt, also bis 60 m³/Tag.

Die Futtermenge im Jahr 2006 betrug im Durchschnitt 10 bis 15 kg im Modul 1 und 30 bis 40 kg im Modul 2 pro Tag. Der Besatz stieg von 22 t Ende 2006 auf 30 t Mitte 2007. Das Modul 1 wurde November 2007 abgeschaltet, Modul 2 im September 2008.

Ab März 2007 wurde ein Teil des Biofilters von Modul 1 vom System abgetrennt und darin neue FK gespült. Die Bezeichnung für diese Teilbiofilter ist im Folgenden 1.1 (alt) und 1.2 (neu). Ab April lief der neue Filter mit, bis schließlich der alte Filter vom System genommen wurde und 1.2 alleine für Modul 1 lief. Die Ergebnisse von Abbauleistungstests zwischen Oktober 2006 und Juni 2007 zeigen, wie sich die Aktivitäten der FK in dieser Zeit entwickelten (Tabelle 5.2):

Die Abbauleistung des Biofilters 1.1 erhöhte sich zwischen Oktober 2006 und April 2007 um 30% und 50% (NOB bzw. AOB). Diese Zunahme könnte an der erhöhten Belastung dieses Teilbiofilters liegen, da der Filter 1.2 im März vom System genommen wurde, um in ihm eine verbesserte Lufteinspeisung zu installieren.

Der neue Filter im Modul 1 (1.2) zeigte im April 2007 so gut wie keine Abbauleistung im Test, im Juni schon mehr als der alte Filter im Oktober 2006. Die NOB scheinen eine längere Anlaufphase zu benötigen. Das zeigten auch Nitrit-Peaks bis 55 μM (2,5 mg/l) im AOB-Test (in 7 Stunden bei einer NO_2 -Anfangskonzentration von 10 μM) während die Nitritkonzentration im Test mit den FK vom Modul 2 um 7 μM blieb (0,3 mg/l).

Tabelle 5.2:

**Abbauleistung neuer und alter Füllkörper:
(in nm/h pro FK)**

		Oktober 2006	April 2007	Juni 2007 (Ende der Startphase)
Modul 1 alt	AOB	334	515	Mitte April stillgelegt
	NOB	1025	1375	
Modul 1 neu	AOB		0	395
	NOB		85	465
Modul 2	AOB	425	740	675
	NOB	1056	1225	1270

Abbauleistung bei niedrigem pH-Werten

Ab Juni 2007 wurde in Modul 1 der Anlage Büsum der pH-Wert gesenkt, um so eine bakterielle Fischkrankheit zu bekämpfen. Zudem wurde die Futtermenge um mehr als 50% gesenkt. Dieser Umstand wurde als Möglichkeit genutzt, die Abbauleistungen der Nitrifikanten bei niedrigen pH-Werten zu untersuchen. Die Proben wurden am 17.08.2007 genommen, der pH-Wert betrug zu dieser Zeit 6,1 (Normalwert: 7), die Temperatur betrug 22°C und der Sauerstoffgehalt 8,7mg/l.

Die FK aus Modul 1 (NOB) zeigten in Medium mit einem pH-Wert von 5.3 eine Abbaurate von 235 nmol/h*FK und 419 nmol/h*FK in Medium mit einem pH-Wert von 7.5. Bei den AOB ergaben sich Werte von 222 nmol/h*FK (pH 5.3) und 616 nmol/h*FK (pH 7.5) Das heißt, bei Absenkung des pH-Wertes um 2 Einheiten erfolgte eine Reduktion der Aktivität um die Hälfte bei den NOB und um zwei Drittel bei den AOB.

Nach einer Inkubation der FK für 6 Tage in Biofilterwasser mit pH 7.5 wurde eine deutliche Steigerung der Abbauraten auf 519 nmol/h*FK bei den NOB ermittelt, was den Raten vor dem Absenken des pH-Wertes entspricht. Eine vorübergehende Senkung des pH-Wertes führte hier also akut zu einer Verminderung der Abbauleistung, ist aber reversibel. Die AOB erzielten nach der Inkubationszeit lediglich eine Abbaurate von 225 nmol/h*FK. Eine Interpretation ist hierfür schwierig. Es könnte sein, dass der niedrige pH-Wert keinen großen Einfluss auf die Abbauraten der AOB hatte, dass aber die lange Lagerung vor dem zweiten Test zu einem Einbruch der Abbauraten geführt hat.

Zusammenfassung Abbauleistungstests:

1. Die jeweiligen Nitrifikationsleistungen der FK korrelierten mit den Belastungsniveaus des Shrimp-Biofilters in der Anlage Strande.
2. NOB waren meistens aktiver als AOB, zum Teil bis zu dreimal so aktiv.
3. Die weißen FK des Typs BN09 zeigten eine höhere Abbauleistung als die schwarzen aus recyceltem Material desgleichen Typs.
4. Die Ergebnisse aus der Diplomarbeit von Stefanie Beth konnten auch im Labormaßstab bestätigt werden.
5. Eine vorübergehende pH-Wert Senkung (bis pH 5.3) bleibt ohne langwierige Konsequenzen für die Nitrifikation im Biofilter.
6. Die Abbauleistungen liegen im Bereich der Werte aus der Literatur.
7. NOB reagieren verzögerter auf einen Belastungsabfall und evtl. auch auf einen -anstieg (Nitritpeak im Oktober bei Belastungsanstieg).

Untersuchung des Einflusses von Nitrat auf marine Ammoniak und Nitrit oxidierende Bakterien in Laboransätzen

Übersicht:

- **Einleitung**
- **Aktivitätstests Nitratthemmung**
- **Nitratthemmtests mit nitrifizierenden Anreicherungen und Reinkulturen**

Einleitung

Nitrat ist das Endprodukt der aeroben autotrophen Nitrifikation.

Wie den Formeln



zu entnehmen ist, laufen die Nitrifikationsschritte stöchiometrisch eins zu eins ab, das heißt, aus einem Mol Ammonium wird ein Mol Nitrit und dann ein Mol Nitrat.

Für die kultivierten Organismen in Kreislaufanlagen ist Nitrat nicht so toxisch wie Ammoniak oder Nitrit. LC50 Werte aus älteren Studien liegen zwischen 1300-1500 mg NO₃-N/l für Fisch (Scott und Crunkilton, 2000; Tilak et al., 2002) und 490 mg NO₃-N/l für Shrimp (Cavalli et al., 1996). Camargo et al. (2005) empfehlen jedoch, in marinen Anlagen die Nitratkonzentration von 20 mg NO₃-N/L (=1420 µM) nicht überschreiten zu lassen. Ähnlich wie Nitrit blockiert Nitrat sauerstofftransportierende Pigmente des Blutes. Die Toxizität von Nitrat erhöht sich mit der Konzentration und der Einwirkungsdauer und sinkt mit der Größe der Organismen und zunehmendem Salzgehalt.

Auch die Nitrifikation selbst kann durch hohe Nitratkonzentrationen gehemmt werden. Aleem und Alexander (1960) beschrieben, dass ab 1-2 g Nitrat/L (16-32 mM) eine verlängerte Lag-Phase bei *Nitrobacter* hervorgerufen wird und bei 5 g/L (80 mM) 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 % reduzieren 33 mM Nitrat die Nitritoxidation von *Nitrobacter* um 66 % (Butt und Lees, 1960). Bei *Nitrospira moscoviensis* wurde eine Nitratthemmung ab 75 mM beobachtet (Ehrich et al., 1995). Diese Eigenschaft ist jedoch, wie auch die Toleranz gegenüber Nitrit, vom physiologischen Zustand der Zellen abhängig. Bislang liegen keine Erkenntnisse für *Nitrospira marina* vor.

Schon in der ersten Phase des Projektes konnte mit dem entwickelten Aktivitätstest im Labormaßstab festgestellt werden, dass die Nitrifikation im Biofilterwasser (steril wie auch nicht steril) der Anlage Büsum im Vergleich zu im Labor hergestelltem Medium langsamer ablief. Ein Verdacht fiel auf die hohe Nitratkonzentration in den Modulen von 6000 bzw. 6500 µM NO₃⁻.

Um dieser Vermutung nachzugehen, wurden in Phase II weitere Aktivitätstests mit Biofilterwasser und nitrathaltigem Medium angesetzt, sowie Nitrattoleranztests mit Reinkulturen und NOB-Anreicherungen aus den Anlagen.

Aktivitätstests Nitrathemmung

Die Aktivitätstests mit hohen Nitratkonzentrationen liefen parallel zu den schon beschriebenen Aktivitätstests mit schwarzen FK ab. Es wurden entweder 10 FK in 50 ml oder 5 FK in 25 ml mineralisches Medium oder Biofilterwasser (1-2 mM, je nach Belastung des Biofilters in Strande) gegeben. Die FK und das Biofilterwasser wurden jeweils zeitnah dem Biofilter der Shrimps- Anlage in Strande entnommen (max. eine Woche Lagerung bei 4 °C, meistens 1-2 Tage). Wenn nicht anders angegeben, wurden schwarze FK in den Versuchen eingesetzt.

Bei den NOB konnte eine zunehmende Hemmung der Nitrifikation mit der zunehmenden Nitratkonzentration festgestellt werden, allerdings gilt diese Aussage nur für hohe Konzentrationen ab 10 mM. In einigen Tests (wie in Test 17b, Abbildung 6.1) zeigte sich eine starke Hemmung bereits ab 3 mM Nitrat, in anderen jedoch (Test 23, Abbildung 6.3) wirkte sich die Hemmung nicht so stark aus bzw. gar nicht. Ähnliches gilt für die Versuche mit Biofilterwasser. So ließ das Ergebnis des Aktivtests 20 (Abbildung 6.4), in dem das „Medium Nitrat“ mit dergleichen Nitrat-Konzentration versehen wurde, wie in dem Biofilterwasser gemessen wurde (1700 µM), vermuten, dass das Nitrat im Biofilterwasser eine Hemmung verursacht. Zwar weichen die „Medium Nitrat“-Kurven von den „Biofilterwasser“-Kurven ab, sie sind aber alle weitaus flacher als die Kurven der Medien ohne Nitrat. In Test 17a schien jedoch keine Hemmung von dem Biofilterwasser oder dem darin enthaltenen Nitrat auszugehen (Abbildung 6.2).

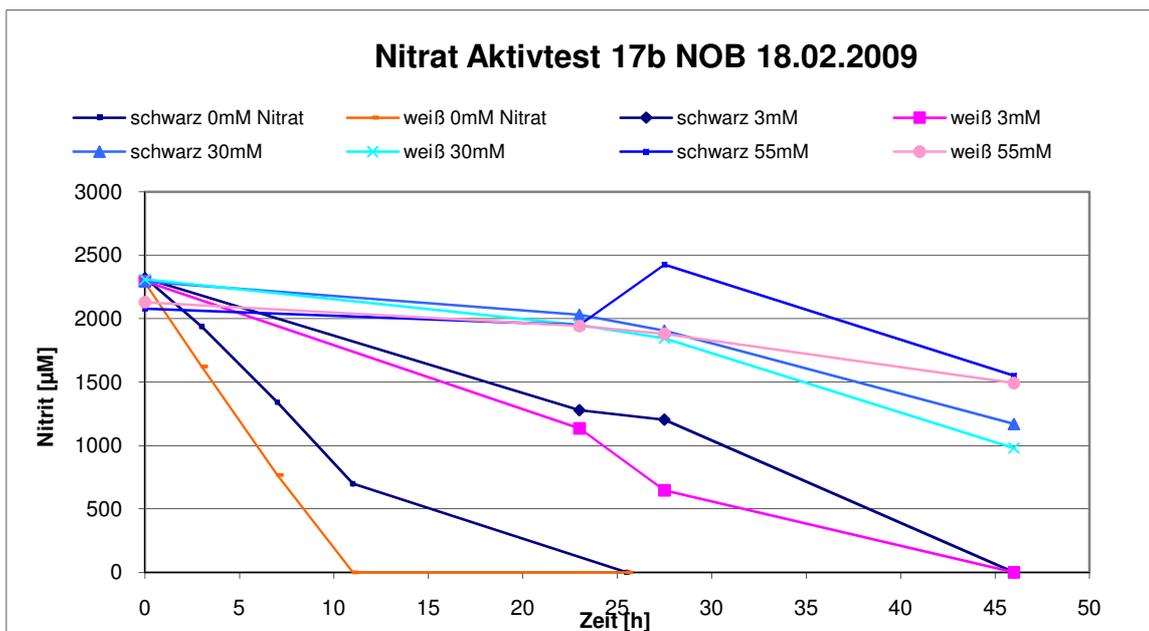


Abbildung 6.1: Abnahme der Nitritkonzentrationen in den Ansätzen mit verschiedenen Nitratkonzentrationen im Versuch 17b

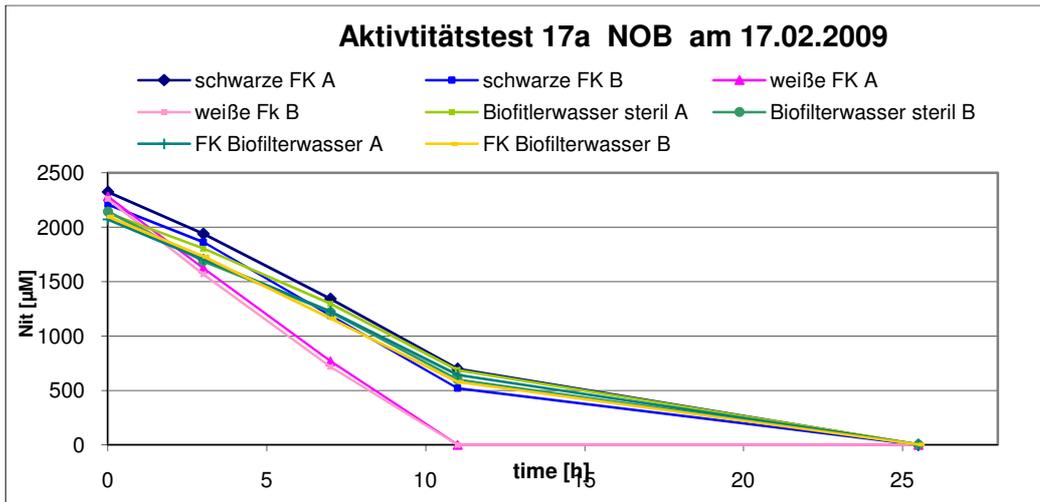


Abbildung 6.2: Abnahme der Nitritkonzentrationen in den Ansätzen mit und ohne Biofilterwasser im Versuch 17a

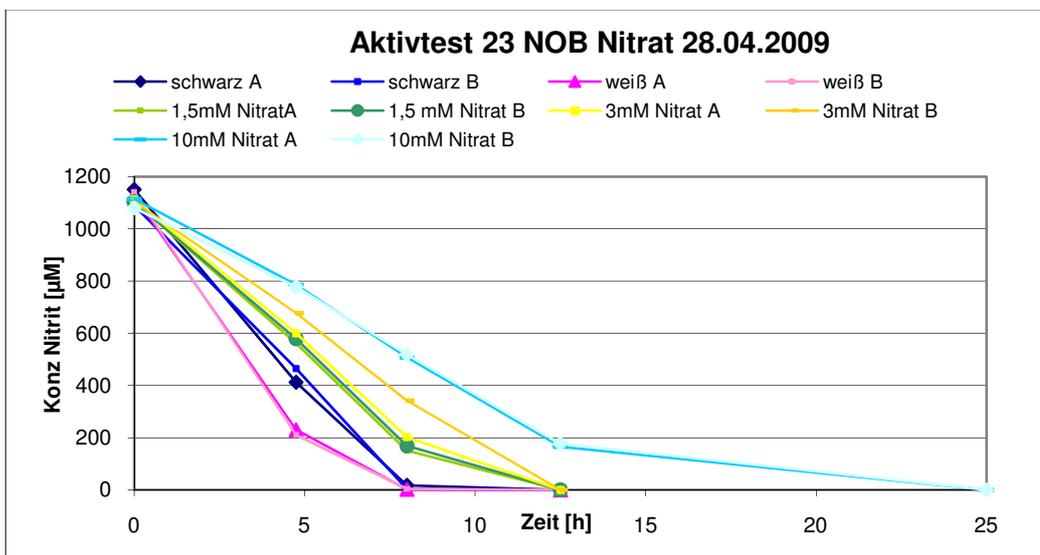


Abbildung 6.3: Abnahme der Nitritkonzentrationen in den Ansätzen mit verschiedenen Nitratkonzentrationen im Versuch 23

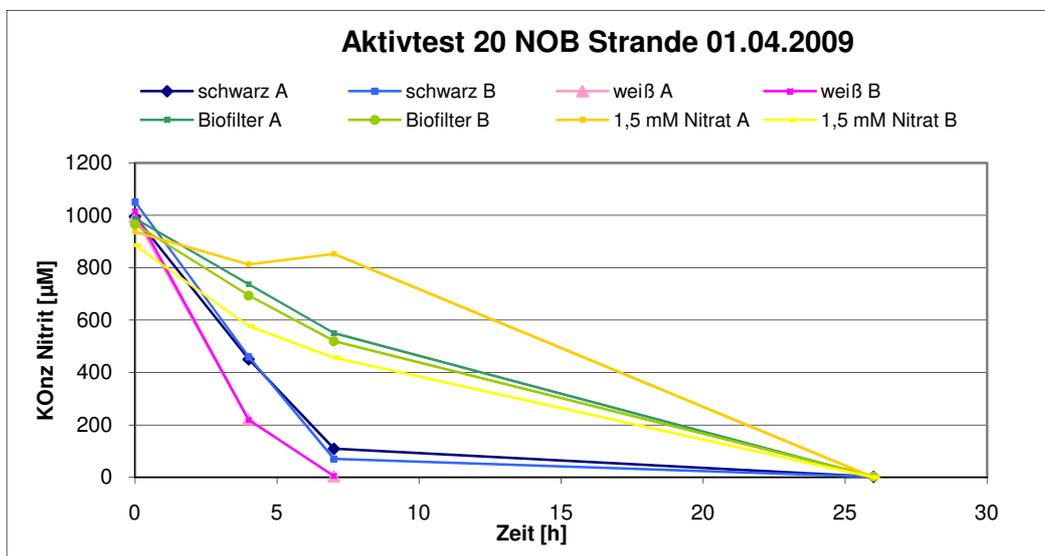


Abbildung 6.4: Abnahme der Nitritkonzentrationen in den Ansätzen mit Biofilterwasser bzw. 1,5 mM Nitrat im Versuch 20

Die Versuche mit den AOB ergaben nur schwer interpretierbare Ergebnisse, was zum Teil auch an fehlerhafter Versuchsdurchführung oder -vorbereitung lag. So kann zum Beispiel der Versuch 17a nicht verwertet werden, da der pH-Wert in den Kolben mit Nitratzugabe am Ende des Versuches bei 5,5 lag und die verzögerte Nitrifikation möglicherweise dadurch verursacht wurde. Am Ende von Versuch 17b (Abbildung 6.5) betrug der pH-Wert in den Kolben bei 6,5-7,0. In allen Ansätzen mit Nitratzugaben (bis 45 mM) verlief die Nitrifikation langsamer als in den Kontrollen, die einzelnen Parallelen waren jedoch unterschiedlich. In Versuch 18, in dem Biofilterwasser mit Medium ohne Nitrat verglichen wurde, konnte keine Hemmung der AOB festgestellt werden. Die Ammoniak-Oxidation war hier in allen Kolben nach bereits 8 Tagen abgeschlossen.

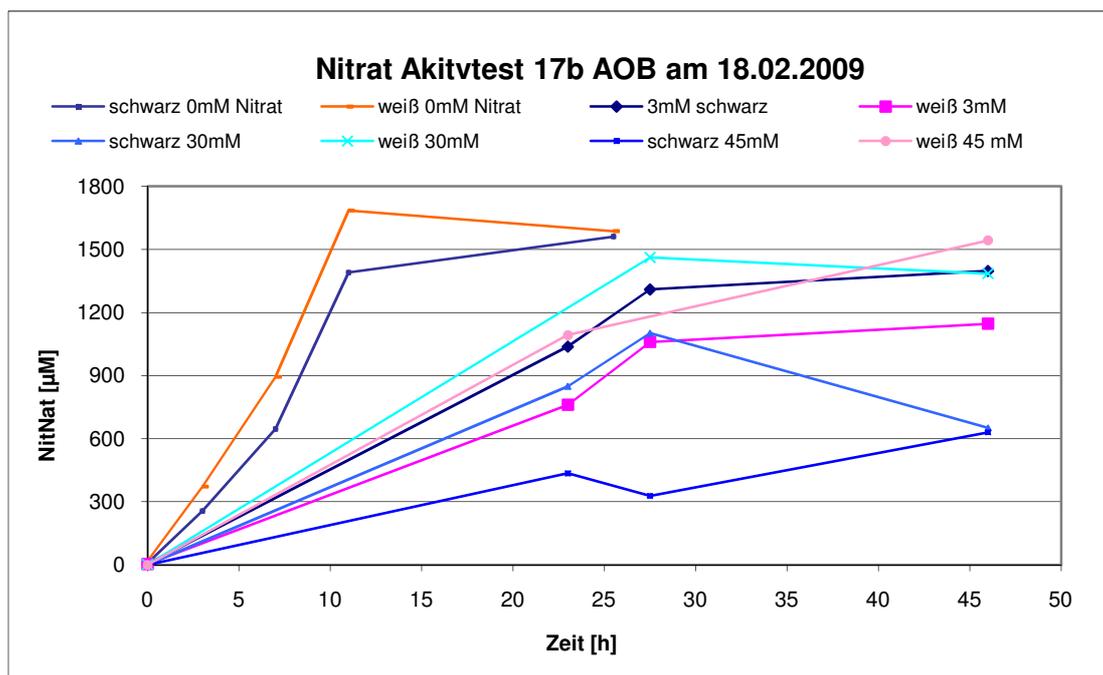


Abbildung 6.5: Zunahme Nitrit plus Nitrat in den AOB-Ansätzen mit verschiedenen Nitratkonzentrationen im Versuch 17b

Die durchgeführten Aktivitätstests haben gezeigt, dass zumindest die Nitritoxidation durch Biofilterwasser und Nitrat in höheren Konzentrationen gehemmt werden können. Es bleibt jedoch immer noch zu untersuchen, ob die Hemmung des Biofilterwassers durch das Nitrat oder anderen Komponenten ausgeht. Da es sich bei den Anlagen um sehr dynamische Systeme handelt, wird sich auch die Zusammensetzung des Biofilterwassers stetig verändern. Auf der anderen Seite verändert sich mit dem System auch die Nitrifikationsleistung der FK, die in den Versuchen eingesetzt werden. Um wirkliche sichere Aussagen zu treffen, werden vor allem mit AOB weitere Versuche dieser Art durchgeführt werden müssen.

Nitrat hemmtests mit nitrifizierenden Anreicherungen und Reinkulturen

Die Versuche zur Nitratkonzentration von nitrifizierenden Reinkulturen und Anreicherungen aus den Anlagen wurden jeweils mit 100 ml autotrophem Medium und stehend angesetzt. Die Nitratkonzentrationen variierten zwischen 0 und 120 mM (7,5 g/l).

Für einen umfassenden Vergleich wurden als Reinkulturen nicht nur die einzige beschriebene marine Art von *Nitrospira* - *Nitrospira marina* – eingesetzt, sondern auch marine Vertreter der Gattung *Nitrobacter*, und zwar Stamm 297 und 311. Die Kultur von *Nitrospira marina*, die in den Versuchen eingesetzt wurde, war verunreinigt mit einem Vertreter aus dem Stamm Actinobacteria.

Die Anreicherungen entstammten der Anlage in Büsum und haben die Bezeichnungen Ns Eco 2.1 und BUE M1 marin. Die Kultur Ns Eco 2.1 wurde schon Ende 2007 angesetzt und konnte mittlerweile durch vielmaliges Überimpfen und Verdünnungsreihen isoliert werden. Zum Zeitpunkt der Nitratkonzentrationen dürften sich noch wenige Verunreiniger in der Kultur befunden haben. Die Kultur BUE M1 marin wurde Mitte 2007 angesetzt und bis zu den Nitrat-Versuchen dreimal überimpft, daher sind hier noch relativ viele Begleitorganismen zu finden. Da *Nitrobacter* mehr Substrat umsetzt und höhere Nitritkonzentrationen tolerieren kann als *Nitrospira* (Schramm et al., 1999), wurden bei den *Nitrobacter*-Ansätzen 3 mM Nitrit eingesetzt im Gegensatz zu 1 mM bei den Ansätzen mit *Nitrospira* und den Anreicherungskulturen.

Die beiden *Nitrobacter*-Stämme wurden in insgesamt drei Versuchen eingesetzt. Bei der anfänglich höchsten Nitrat-Konzentration von 30 mM konnte bei keinem der Stämme eine Hemmung festgestellt werden, so dass die Konzentration bis auf 120 mM im dritten Versuch erhöht wurde (Abb. 6.6). Doch auch bei dieser hohen Nitrat-Konzentration konnte keine nennenswerte Hemmung festgestellt werden: das Nitrit in den Kolben mit 120 mM Nitrat war drei Tage später verbraucht als das in den Kontrollkolben ohne Nitratzugabe (nach 13 Tagen bei Stamm 311, nach 17 Tagen bei Stamm 297). Diese Angaben gehen nicht einher mit denen aus der Literatur. Zu beachten gilt dabei jedoch immer, dass die Aktivität und Toleranzen von nitrifizierenden Bakterien stark von deren jeweiligen Fitness abhängen, die wiederum von der Lagerung, Fütterung, Substrat- und Produktkonzentration abhängt.

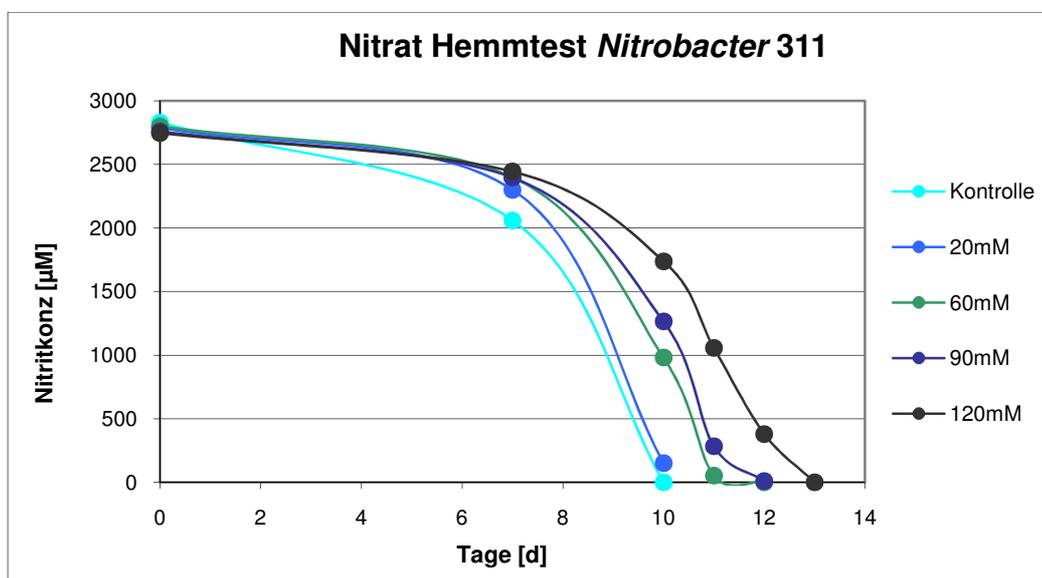


Abbildung 6.6: Abnahme der Nitritkonzentrationen in Gegenwart von bis zu 120 mM Nitrat bei *Nitrobacter* strain 311

Nitrospira marina 295 zeigte sich in den Hemmtests weitaus empfindlicher gegenüber Nitrat: schon bei Konzentrationen zwischen 0 und 50 mM fächerten sich die Kurven weit auf. Insgesamt brauchten die Stämme von *Nitrospira* länger als die *Nitrobacter*-Stämme, um das gegebene Substrat umzusetzen (bis zu 25 Tage bei 0,5 mM NO₂ ohne Nitrat). Wie oben erwähnt, hängt die Aktivität mit dem jeweiligen Zustand der Kulturen zusammen. Verschiedene Tests können daher schwer untereinander verglichen werden, zumindest, was die Dauer der Substratumsetzung betrifft. Die Höchstkonzentration, die *Nitrospira marina* noch tolerieren kann, konnte aber auch hier nicht festgestellt werden. Der Ansatz mit 80 mM hatte jedoch auch nach 32 Tagen nicht einmal die Hälfte des Substrates verbraucht, während im gleichen Test die Kontrolle nach 20 Tagen und der Ansatz mit 50 mM nach 32 Tagen das Substrat umgesetzt hatten (Abbildung 6.7).

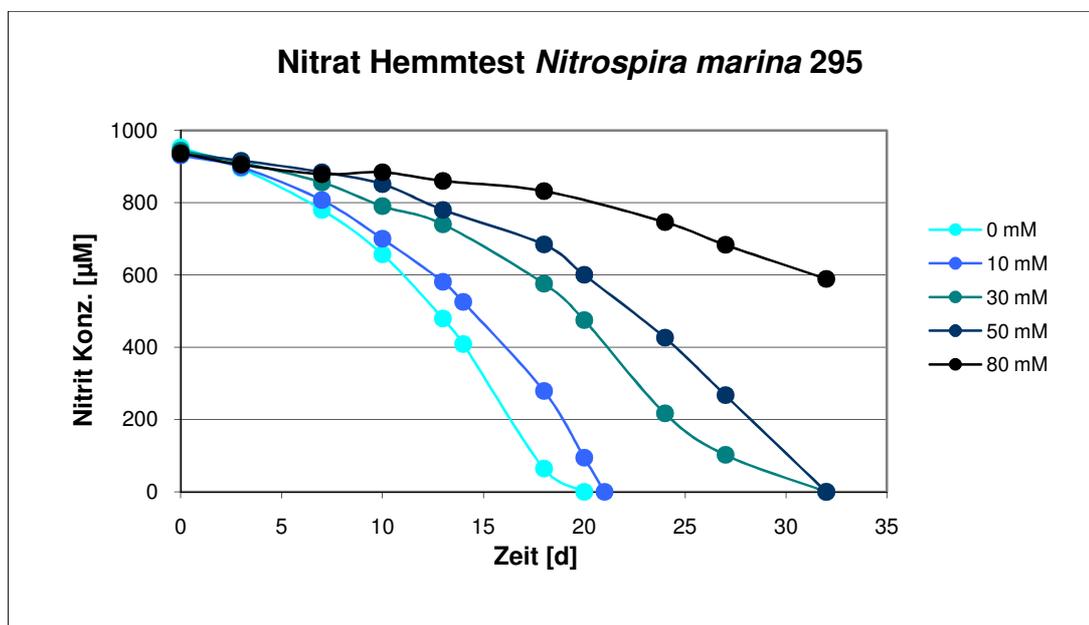


Abbildung 6.7: Abnahme der Nitritkonzentrationen in Gegenwart von bis zu 80 mM Nitrat bei *Nitrospira marina* Stamm 295

Auch die Anreicherung Ns Eco 2.1, 16S rRNA-Analysen zufolge ein naher Verwandter von *Nitrospira marina*, wurde in den Tests ebenfalls durch Nitrat-Konzentrationen von 55 mM stark gehemmt. So war in einem Test das Substrat in dem 55 mM-Ansatz erst nach doppelt so vielen Tagen (14) verbraucht wie in der Kontrolle (Abbildung 6.8).

Ähnliche Ergebnisse ergaben die Versuche mit der Anreicherung BUE M1 marin (Abbildung 6.9). Im 30 mM-Ansatz wurde erst nach 32 Tagen kein Substrat mehr detektiert. In der Kontrolle war in diesem Versuch bereits nach 17 Tagen kein Nitrit mehr gemessen.

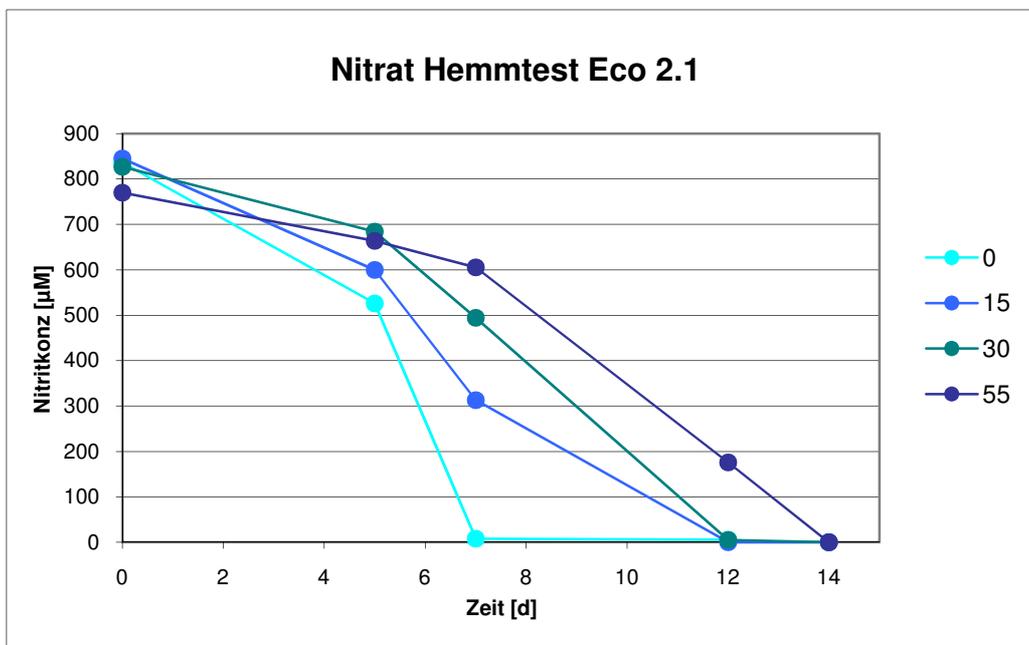


Abbildung 6.8: Abnahme der Nitritkonzentrationen in Gegenwart von bis zu 55 mM Nitrat bei der Anreicherung Eco 2.1

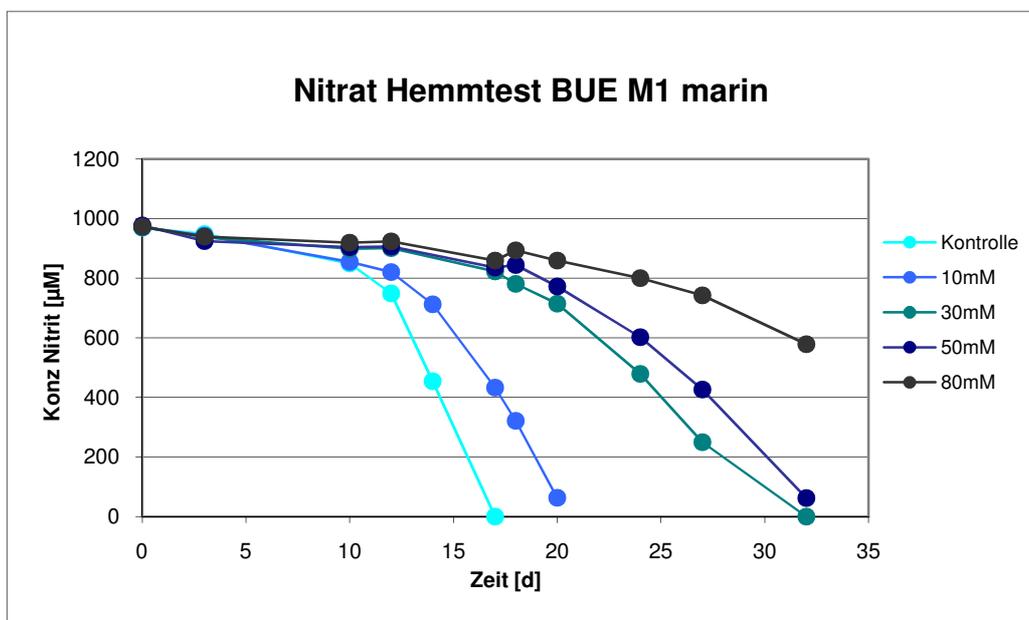


Abbildung 6.9: Abnahme der Nitritkonzentrationen in Gegenwart von bis zu 55 mM Nitrat bei der Anreicherung BUE M1 marin

Die Versuche zeigen, dass *Nitrobacter* hohe Nitratkonzentrationen von sogar 120 mM tolerieren kann, dabei lediglich eine verlängerte Lag-Phase aufzeigt. Alle anderen Kulturen jedoch, also *Nitrospira marina* und die Anreicherungen Eco Ns 2.1 und BUE M1 marin, reagierten auf die Erhöhung mit einer verringerten Aktivität, wie man an der Abflachung der Kurven ersehen kann.

Es müssten weitere Tests durchgeführt werden, um die Konzentration festzustellen, bei der die Nitrit-Oxidation der verschiedenen Kulturen komplett gehemmt wird. Jedoch ist diese Fragestellung für die Anwendung in RAS irrelevant, da Konzentrationen von schon 1420 µM zum Wohle der gehaltenen Organismen nicht überschritten werden sollten (s.o.).

Optimierung der Ammoniak- und Nitritoxidation in den aktuellen Biofiltern durch Variation der Betriebsparameter

Betriebsparameter Sauerstoff

Der Betrieb von Rezirkulationsanlagen ist besonders in unseren Breiten, im Gegensatz zu Durchflussanlagen oder Netzgehegen im Meer, mit vielen Kosten verbunden. Diese sollten natürlich so gering wie möglich gehalten werden, um einen Profit durch den Verkauf der Produkte zu gewährleisten. Eine nicht unerhebliche Kostenstelle ist die Belüftung der Biofilter (Park et al., 2006). Da einige Nitrifikanten mit wenig Sauerstoff auskommen, besteht die Möglichkeit, dass Anlagen auch mit einem geringeren Sauerstoffgehalt betrieben werden könnten. Normalerweise werden die Biofilter der Anlagen so stark belüftet, dass das Wasser sauerstoffgesättigt ist (den Biofiltern in Büssum ist eine Anreicherung des Wassers mit technischem Sauerstoff nachgeschaltet, bevor es in die Fischbecken gelangt). Wenn die Nitrifikation durch eine geringere Sauerstoffkonzentration nicht beeinträchtigt werden würde, könnte die Belüftung der Biofilter herabgesetzt werden. Allerdings dürfen dabei andere Faktoren nicht außer Acht gelassen werden, wie zum Beispiel der pH-Wert, der bei höheren Kohlenstoffdioxidkonzentrationen sinkt oder die Durchmischung der FK im Biofilter. Des Weiteren ist die Sauerstoffversorgung der Nitrifikanten in dicken Biofilmen bereits herabgesetzt. Außerdem wäre eventuell eine verstärkte Anreicherung des Wassers mit technischem Sauerstoff nötig, um in den Fischbecken einen ausreichenden Sauerstoffgehalt zu gewährleisten.

Sauerstoff-Aktivitätstests

Um die Nitrifikation bei unterschiedlichen Sauerstoffgehalten zu untersuchen, wurden bisher zwei Versuche durchgeführt. Hierbei wurden jeweils 100 FK aus Strande in Schottflaschen (500 ml) mit 400 ml AOB Medium (3 mM, CaCl_2) gegeben und bei 22 °C unterschiedlich schnell gerührt (Abb. 7.1). Der pH-Wert wurde durch Zugabe von NaHCO_3 immer wieder auf >7 eingestellt. Mit einem Handsauerstoffmessgerät (HI 9143; HANNA Instruments) wurden Sauerstoff und die Temperatur gemessen, Ammonium, Nitrit und Nitrat wurden mittels HPLC analysiert.



Abb. 7.1: Versuchsaufbau eines Sauerstoff-Aktivitätstests im 22°Raum. In den Flaschen sorgen unterschiedlich große Rührstäbe und unterschiedliche Rührgeschwindigkeiten für zwei unterschiedliche Sauerstoffverhältnisse.

Der Sauerstoffgehalt sollte in den beiden Versuchen über die Größe der Rührfische und die Rührgeschwindigkeit auf zwei unterschiedlichen Niveaus gehalten werden. Solange keine Bakterien in den Medien waren, war die Sauerstoffkonzentration in allen Ansätzen gesättigt.

Nach Zugabe der bewachsenen FK aus der Anlage Strande sank der Sauerstoffgehalt bei den jeweils weniger gerührten Ansätzen (Low Oxygen) stark ab bis auf Werte von knapp unter 1 mg/L. Mit der fortschreitenden Nitrifikation stieg der Sauerstoffgehalt im Versuch 2 wieder bis auf das Ausgangsniveau an. Bei Versuch 1 blieb der Sauerstoffgehalt niedrig, bis die Nitrifikation abgeschlossen war (Abb. 7.2 und 7.3).

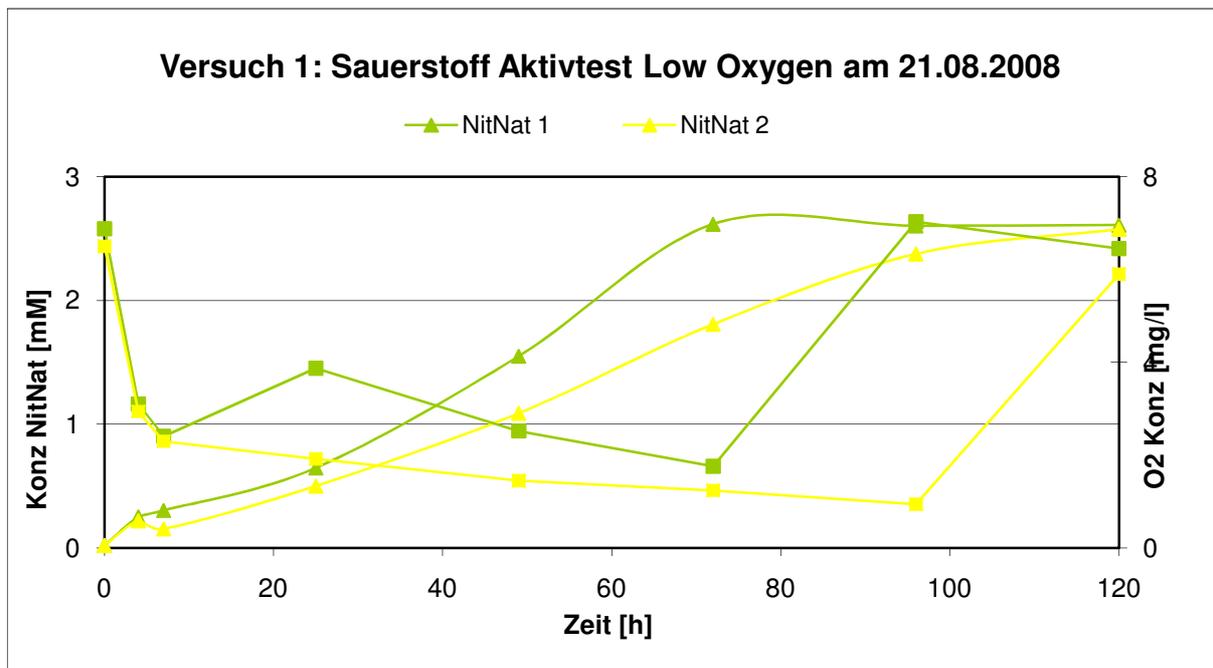


Abb. 7.2: Parallele Ansätze (gelb und grün) bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten im Versuch 1

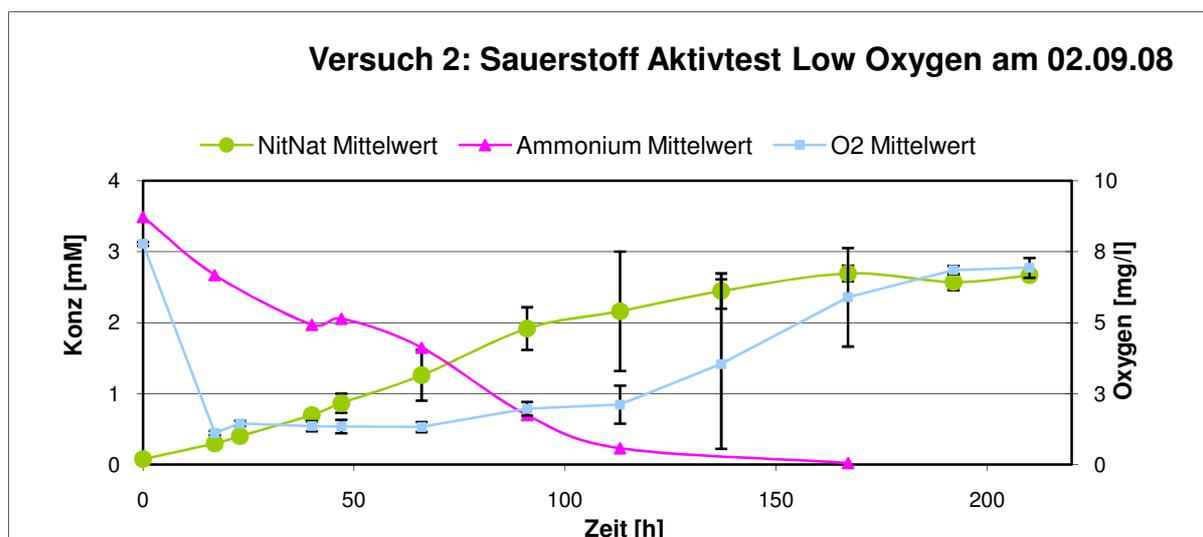


Abb. 7.3: Mittelwerte von drei parallelen Ansätzen mit Abweichungsindikatoren für Nitrit+Nitrat und Ammonium bei niedrigen Rührgeschwindigkeiten im Versuch 2

Auch bei den Ansätzen mit höheren Rührgeschwindigkeiten (High Oxygen) sank der Sauerstoffgehalt beim Einsetzen der Nitrifikation leicht ab (beim zweiten Versuch um mehr als die Hälfte auf 3,75 mg/l) (Abb. 7.4 und 7.5).

Im Versuch 2 lief die Nitrifikation in den drei Parallelen mit höherem Sauerstoffgehalt relativ gleichmäßig ab, sie war nach 110 Stunden abgeschlossen. Die Nitrifikation in den drei Ansätzen mit niedrigem Sauerstoffgehalt verlief im Versuch 2 unregelmäßiger (siehe Abweichungsindikatoren), im Schnitt war die Nitrifikation nach 160 Stunden abgeschlossen. In Versuch 1 entstand ein Nitritpeak (200 $\mu\text{M NO}_2^-$) in einer der Parallelen mit niedriger Sauerstoffkonzentration, als der Sauerstoffgehalt auf 0,94 mg/l abfiel. Weitere Nitritpeaks entstanden in Versuch 2 in den Ansätzen mit höherem Sauerstoffgehalt (bis zu 200 $\mu\text{M NO}_2^-$) und ebenfalls bei geringen Sauerstoffkonzentrationen (2,5 mg/l) (Abb. 7.6). Das bedeutet, dass hier die NOB langsamer nitrifiziert haben als die AOB, was jedoch nicht zwangsweise mit der sinkenden Sauerstoffkonzentration zu tun haben muss, die durch den Start der Nitrifikation entsteht. Bei weiteren Versuchen sollten AOB und NOB getrennt eingesetzt werden, um die Wirkung gesenkter Sauerstoffkonzentrationen bei NOB separat beobachten zu können.

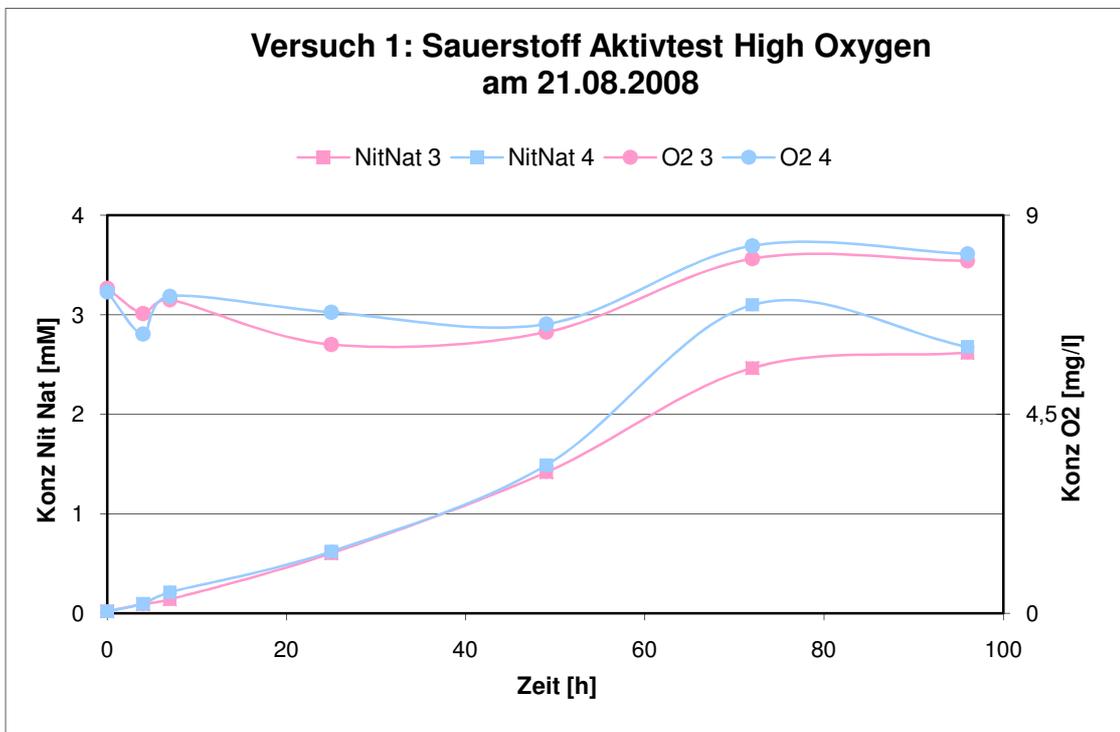


Abb. 7.4: Parallele Ansätze (pink und blau) bei hohen Rührgeschwindigkeiten im Versuch 1

Die Halbsättigungskonstante der Nitrifikanten, die in den Anlagen in Büsum und Strande vorherrschen (*Nitrosomonas* und *Nitrospira*), ist sehr gering:

Nitrosomonas: $K_O = 0,51 \text{ mg/l}$ (Schramm et al., 1999)

Nitrospira: $K_O = 0,13 \text{ bzw. } 0,47 \text{ mg/l}$ (Manser et al., 2005)

Eine Halbsättigungskonstante des Sauerstoffs ist die Konzentration, bei der die Prozessgeschwindigkeit gerade halb so groß wie die maximale Geschwindigkeit ist. Voraussetzung ist, dass alle anderen prozessbestimmten Substanzen in so großer Konzentration vorliegen, dass sie die Reaktionsgeschwindigkeit nicht beeinträchtigen (Hunze, 2005). Dementsprechend müsste die Nitrifikation bei Sauerstoffkonzentrationen unterhalb der Sättigung problemlos ablaufen.

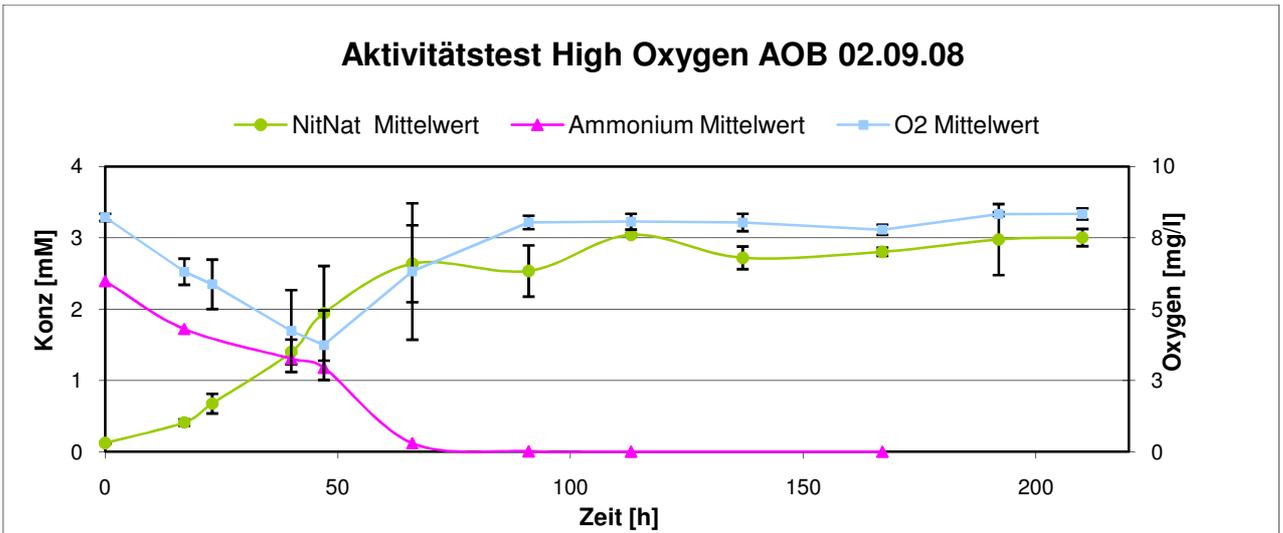


Abb. 7.5: Mittelwerte von drei parallelen Ansätzen mit Abweichungsindikatoren für Nitrit+Nitrat und Ammonium bei hohen Rührgeschwindigkeiten im Versuch 2

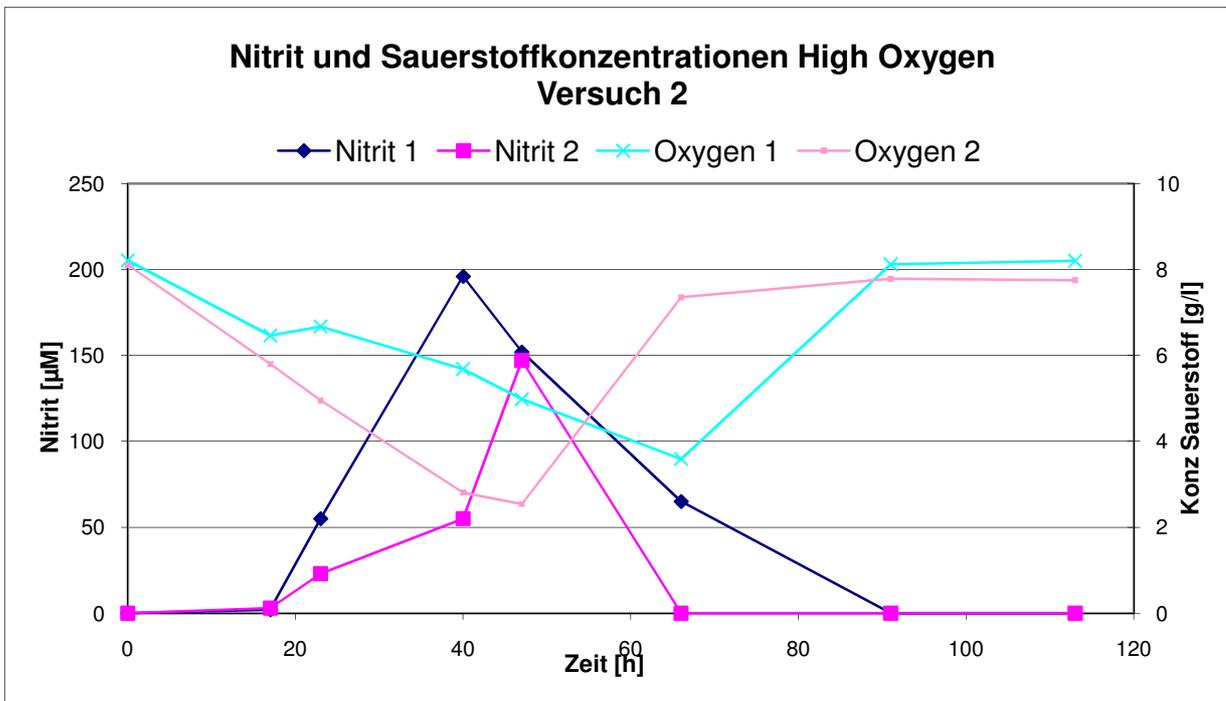


Abb. 7.6: Nitrit- und Sauerstoffkonzentrationen der beiden parallelen Ansätze (blau und rot) bei hohen Rührgeschwindigkeiten im Versuch 2

In der Literatur wird an einigen Stellen beschrieben, dass die aerobe Nitrifikation auch bei Sauerstoffkonzentrationen von 0,06 - 0,16 mg/l (Sliekers et al., 2005) bzw. bei 0,12 – 0,24 mg/l (Park und Noguera, 2008) vollständig ablaufen kann. Allerdings wurden auch hier vorübergehende Nitritpeaks beobachtet (Park und Noguera, 2008). Dieses Ereignis kann in Kläranlagen vorkommen, muss aber in RAS zum Wohle der gehälterten Organismen vermieden werden. Allerdings ist die Spanne der Sauerstoffkonzentrationen, die in den Versuchen gemessenen wurden (zwischen sauerstoffgesättigtem Prozesswasser zu Konzentrationen von 0,06 mg/l) sehr groß -

eine Verringerung der Belüftung auf Sauerstoffkonzentrationen auf 2-4 mg/l könnten schon eine Optimierung darstellen. Zudem muss unbedingt die Kohlenstoffdioxidkonzentration und der damit verbundene pH-Wert in die Messungen mit einbezogen werden.

Bei der hier angewandten Methode, die Nitrifikation bei unterschiedlichen Sauerstoffkonzentrationen zu untersuchen, kann keine konstante Sauerstoffkonzentration eingestellt werden, da die testbedingten Substratkonzentrationen für das Versuchsvolumen und die Versuchsdauer zu hoch sind. Diese Versuche sollten als Vorversuche verstanden werden. Eine Möglichkeit zur Fortführung dieser Tests besteht in der Verwendung von Fermentern, in denen bestimmte Parameter konstant gehalten werden und Proben entnommen werden können.

Experimente zur Denitrifikationsleistung der FK aus den Anlagen Strande und Büsum

Die Nitratkonzentrationen in RAS werden durch die Futtermengen und die Wasseraustauschraten bestimmt. Van Rijn (1996) berichtet von maximalen Konzentrationen zwischen 6400 und 8000 μM $\text{NO}_3\text{-N}$. Wie bereits im Bericht von Phase I dokumentiert, wies die Anlage Büsum Nitratkonzentrationen bis zu 6500 μM auf. In der Shrimp-Anlage in Strande erreichten die Werte phasenweise über 2000 μM (Anfang 2008 und Anfang 2009). Wie in Kapitel *Untersuchung des Einflusses von Nitrat auf marine Ammoniak -und Nitrit- oxidierende Bakterien in Laboransätzen* beschrieben, können zu hohe Nitratkonzentrationen sowohl auf die gehälterten Organismen als auch auf die Nitrifikanten negative Auswirkungen haben.

Aber auch aus ökologischen (Überdüngung) und gesundheitlichen Gründen sollte die Nitratkonzentrationen im Abwasser möglichst niedrig gehalten werden. Nitrat wird durch Mikroorganismen bei reduziertem Sauerstoffpartialdruck zu gasförmigen Stickstoffverbindungen wie N_2 und N_2O reduziert (Denitrifikation). Fast 130 Arten von Bakterien, dazu Vertreter von Archaeen und Pilzen können denitrifizieren (Zumft, 1992 und 1997; Kobayashi et al., 1996). Bei heterotrophen Bakterien sind organische Kohlenstoffverbindungen die Elektronendonatoren. Hohe C:N Verhältnisse und anaerobe Verhältnisse fördern demnach die Denitrifikation in Biofiltern, verdrängen jedoch auch die Nitrifikanten. In der Abwasseraufbereitung und Aquakultur werden seit langem verschiedene Möglichkeiten der kompletten Stickstoffelimination erforscht und angewandt, wie zum Beispiel nachgeschaltete Denitrifikationsstufen, zeitlich abwechselnde Sauerstoffverhältnisse in den Biofiltern (Sekoulov, 1988) oder der Einsatz von Algen (Brown, 1971). 56 Treffer ergibt allein die Suche mit dem Stichwort „Denitrifikation“ in der Projektdatenbank der DBU.

Besondere Aufmerksamkeit erfährt die Erforschung des erst vor kurzem entdeckten Prozesses der anaeroben Ammonium-Oxidation (Anammox), bei der Vertreter der Ordnung *Planctomycetales* Ammonium mit Nitrit unter anoxischen Bedingungen direkt zu molekularem Stickstoff verarbeiten (Strous et al., 1999). Als Kohlenstoffquelle dient ihnen hierbei Kohlenstoffdioxid.

Die Kohlenstoffquelle ist, wie schon erwähnt, einer der Faktoren für die vollständige Denitrifikation. Gaben von z.B. Methanol müssen genau kalkuliert werden, um die mögliche Bildung von Nitrit oder Schwefelwasserstoff zu verhindern (McCarty et al., 1969).

Ein positiver Nebeneffekt der Denitrifikation ist ein Anstieg des pH-Wertes, der durch die Nitrifikation gesenkt wird und in Aquakulturen meist durch Zugabe von Kalkwasser ausgeglichen werden muss.

Die Abbildung 8.1 zeigt eine vereinfachte schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufes. Der Anammox-Prozess ist eine Abkürzung des Kreislaufes ohne Nitratbildung und Denitrifikation direkt zu molekularem Stickstoff. Der hellblaue Bogen stellt die Stickstofffixierung dar. Mittels des Enzyms Nitrogenase können Bodenbakterien (oft in Symbiose mit Pflanzen (*Rhizobium*, *Frankia*)) und Cyanobakterien elementaren Stickstoff in verwertbaren Ammonium-Stickstoff umwandeln.

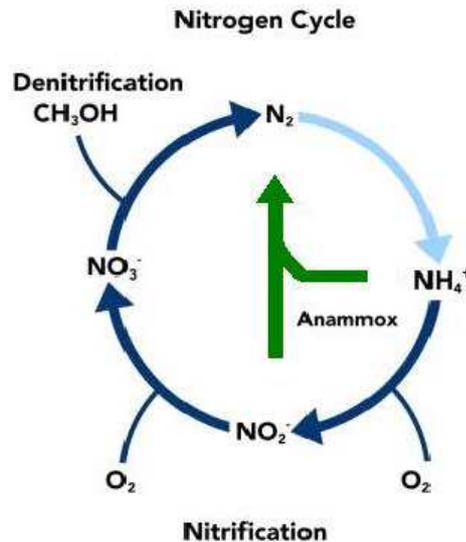


Abbildung 8.1: Schematische Darstellung des Stickstoffkreislaufes

Denitrifikations-Versuche Phase I:

In Phase I wurde nach Auswertung der Ergebnisse von Langzeit-Hemmtests mit Kunststoffgranulaten festgestellt, dass Ammonium zwar verbraucht, das Äquivalent an Nitrit und Nitrat jedoch nicht gebildet wurde. Dass die Ansätze in diesem Versuch stehend inkubiert wurden und die Granulate in den Kolben die Oberfläche der Medien bedeckten, könnte zu mikroaerophilen Bedingungen und Denitrifikation geführt haben. Als mögliche Kohlenstoffquelle (die Medien waren rein mineralisch) wurden der abgeschüttelte Biofilm von den FK oder die Granulate in Betracht gezogen.

Denitrifikationsversuche Büsum Phase II:

Für einen ersten Versuch wurden Schottflaschen (1 Liter) mit Biofilterwasser und wenigen FK gefüllt (Modul 1: $\frac{3}{4}$ voll, Modul 2: halbvoll) und verschlossen bei 4°C stehend über 30 Tage beprobt. Die FK und das Biofilterwasser wurden am 03.04.2007 den Modulen 1.1, 1.2 und 2 der Anlage in Büsum entnommen. Der Nitratgehalt der Module betrug 6500 (Modul 1.2) bis 7000 $\mu\text{M NO}_3\text{-N}$ (Modul 2). Wie in Kapitel *Untersuchung der Nitrifikationsleistung der FK aus den Anlagen Strande und Büsum* beschrieben, war Modul 1.2 gerade erst an das System angeschlossen worden und zeigt sehr niedrige Nitrifikationsleistungen, der Biofilm war noch nicht ausgebildet. Modul 1.1 und Modul 2 zeigten gleich hohe Abbauraten. Wie die Abbildung 8.2 zeigt, setzte in der Flasche Modul 1.1 sofort Denitrifikation ein. Nach 10 Tagen erhöhte sich die Nitritkonzentration stark bis auf 1,3 mM, sank nach Tag 17 jedoch schnell wieder ab. Wahrscheinlich häufte sich das Nitrit nach dem 1. Schritt der Denitrifikation an. Die vollständige Denitrifikation in der Flasche war nach 30 Tagen abgeschlossen. Es muss sich also entweder im Biofilterwasser, im Biofilm oder in den FK genug verfügbarer organischer Kohlenstoff für die Denitrifikation von 6600 μM Nitrat befunden haben.

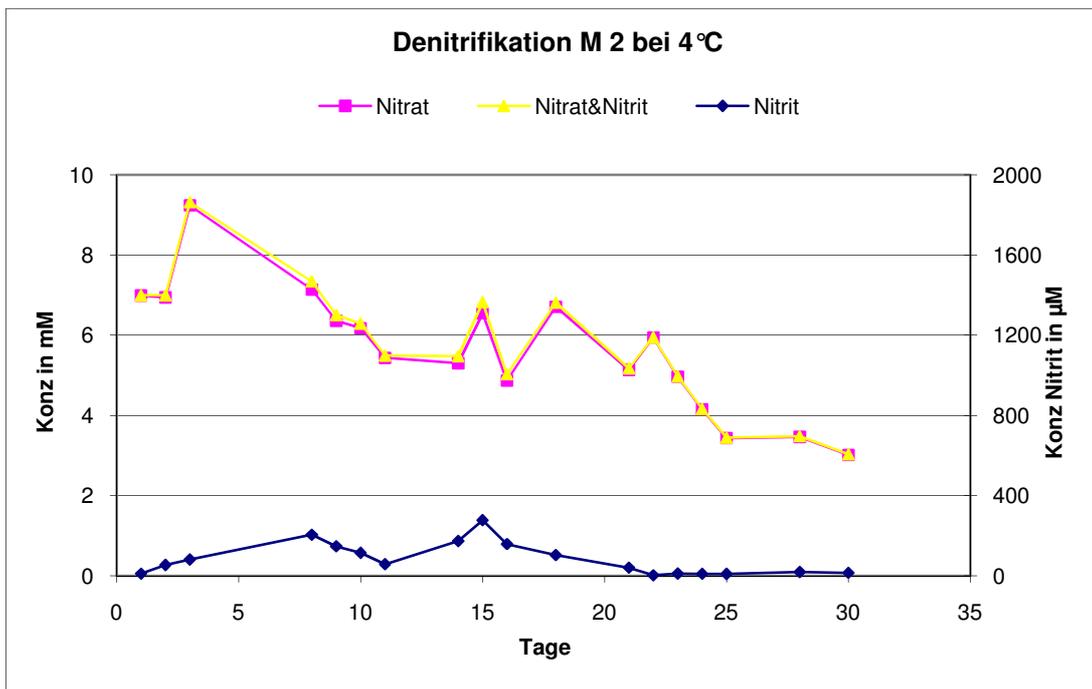
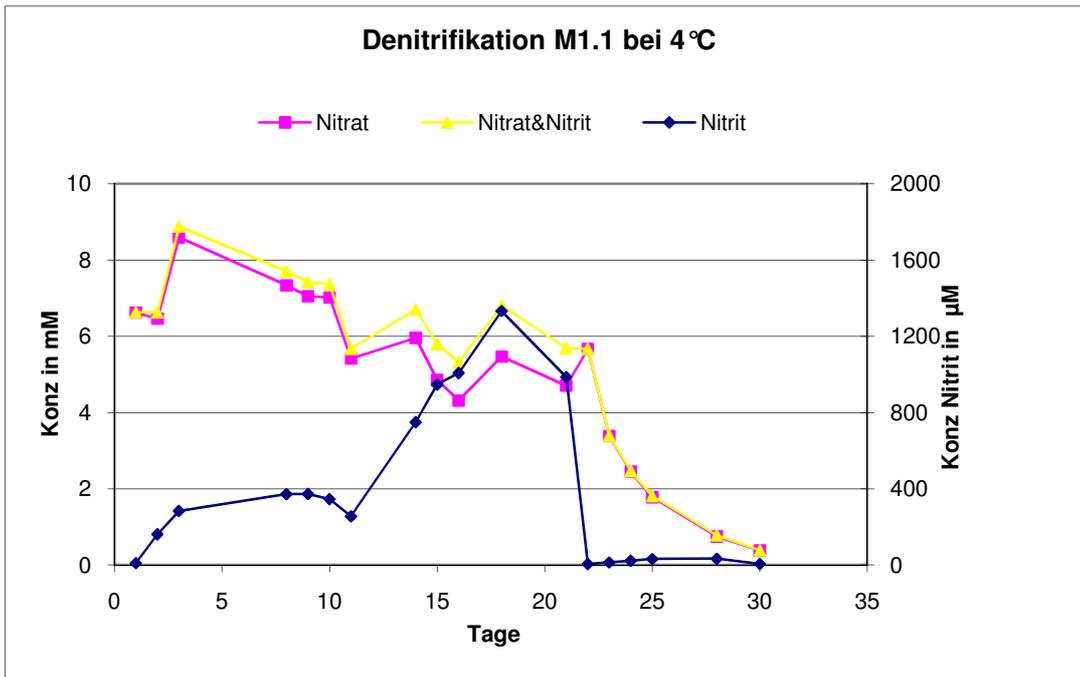


Abb. 8.2: Die Graphen zeigen die Konzentrationen von Nitrit (rechte Seite), Nitrat und Nitrit + Nitrat (linke Seite) in den Schottflaschen im Versuch 1.

Denitrifikationsversuche Strande Phase II:

Für einen Denitrifikations-Versuch ab dem 23.06.2008 wurden je 20 FK aus der Shrimp-Anlage in Strande und 200 ml Medium in Schottflaschen (250 ml) gegeben, die verschlossen bei 28 °C inkubiert wurden. Die Medien bestanden aus unsterilem Biofilterwasser, sterilem Biofilterwasser, mineralischem Medium mit je ca. 1,5 mM Nitrat und Denitrifikationsmedium mit 2,94 g tri-Natriumcitrat-Dihydrat und 2 bzw. 1,3 mM Nitrat. Der Nitratgehalt des Biofilters lag zu diesem Zeitpunkt bei knapp 1300 µM NO₃-N, die Aktivitäten der AOB und NOB bei 400 bis 450 nmol/h*FK, obwohl mit 5000 g Futter pro Tag die Belastung relativ hoch gewesen sein muss (ca. 161 g TAN/Tag). Nach zwei Wochen hatte keine Denitrifikation im Biofilterwasser oder mineralischem Medium stattgefunden, in den Denitrifikationsmedien war schon nach einer Woche kein Nitrat mehr gemessen worden.

Ein ähnliches Ergebnis lieferte ein Denitrifikationsversuch im August 2008, der mit Biofilterwasser und FK aus der Shrimp-Anlage in Strande angesetzt wurde. 40 FK wurden in 200 ml Biofilterwasser (0,3 mM Nitrat) gegeben, die Schottflaschen (250ml) waren geschlossen und standen im 28 °C Raum. Das Biofilterwasser war steril bzw. unsteril und einmal unsteril ohne Zugabe von FK. Nach sieben Tagen konnte keine Denitrifikation festgestellt werden, aber nach Zugabe von 5 mM Na-Acetat war das Nitrat innerhalb von drei Tagen vollständig umgesetzt. Das bedeutet, dass Denitrifikation vor der Gabe von Acetat wegen mangelnder Kohlenstoff-Quelle nicht stattfinden konnte.

Ergebnis Denitrifikationsversuche:

In Modul 1.1 und Modul 2 der Anlage in Büsum befanden sich zu Zeit des Versuches genug kohlenstoffhaltige Verbindungen, die eine (vollständige) Denitrifikation von 6 mM Nitrat möglich machten. Die unterschiedlichen Denitrifikationsgeschwindigkeiten können zum einen mit der Füllhöhe der Versuchsflaschen zusammenhängen (die Schottflasche Modul 2 war nur halb gefüllt), oder mit den jeweiligen Belastungen der Module.

Der Biofilter der Shrimp-Anlage in Strande wurde seit Mai/Juni 2008 weniger Belastung ausgesetzt und im August wurde schon nicht mehr gefüttert. Dies könnte eine Erklärung für die Ergebnisse der Denitrifikationsversuche sein, bei denen ohne Zugabe von organischen Kohlenstoffverbindungen keine Denitrifikation stattfand. Somit können die bewachsenen FK allein nicht die Kohlenstoffquelle für eine vollständige Reduktion von Nitrat sein.

Denitrifizierende heterotrophe Bakterien sind in beiden Anlagen in ausreichender Zellzahl vorhanden.

Charakterisierung der nitrifizierenden Mikroorganismen aus dem Biofilm der Biofilter

Übersicht:

- Einleitung
- Methodik zur Identifizierung der Bakterienpopulationen in den Biofiltern von Bäumen und Stränden
- Ergebnisse
- Zusammenfassung

Einleitung

Erst seit wenigen Jahren werden Populationsanalysen von nitrifizierenden Bakterien in Biofiltern von Aquakulturanlagen durchgeführt, wobei es nur wenige Informationen über marine Anlagen gibt. Es existieren weiterhin kaum Laborkulturen von Ammoniak- oder Nitritoxidanten, die aus Aquakulturanlagen stammen. Um die Aktivität der Bakterien in Biofiltersystemen zu gewährleisten, ist die Kenntnis über die Wachstumsbedingungen unerlässlich. Durch die Identifizierung der Arten und Analyse der Wachstumsparameter von Laborkulturen können wichtige erforderliche Hinweise für die Dimensionierung, die Startphase oder Fehlfunktionen in der Biofiltration erbracht werden. Somit leisten mikrobiologische Untersuchungen entscheidende Hinweise für den Umweltschutz.

Die weitverbreitete Lehrmeinung, dass es sich bei den dominierenden Nitritoxidanten in Biofiltern von Aquakulturen um *Nitrobacter* handelt, wurde bereits vor 10 Jahren widerlegt (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 Salzwasseranlagen *Nm. cryotolerans* (Tal et al., 2003), *Nm. europaea* (Hovanec und DeLong, 1996) und *Nm. aestuarii* (Itoi et al., 2006) fanden.

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 eine ungenügende Substratversorgung hervorgerufen werden (Fdz-Polanco 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).

Methodik zur Identifizierung der Bakterienpopulationen in den Anlagen Büsum und Strande

Für die Charakterisierung der Mikroorganismen aus den Biofiltern wurden sowohl Naturproben (der Biofilm selbst) als auch Anreicherungskulturen verwendet. Bei letzteren werden je nach Medium und anderen Faktoren (Rühren, Sauerstoff, Temperatur, Salzgehalt etc.) bestimmte Bakterien aus den Naturproben bevorzugt und stark angereichert.

Anreicherung von nitrifizierenden Bakterien

Die Anzucht der Nitritoxidanten erfolgte wahlweise mit 0,3 bis 3 mM Natriumnitrit in Erlenmeyerkolben. Die Inkubation fand bei 17 °C, 22 °C oder 28 °C meist stehend im Dunkeln statt. Das Wachstum wurde regelmäßig mit Hilfe eines Tüpfeltests überprüft (Schmidt und Belser, 1982). Durch die Zugabe von steriler 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 bis 10 mM Substrat mit Calciumcarbonat als Puffer kultiviert. Sollten die Zellen für weitere Versuche geerntet werden, wurde stattdessen CaCl_2 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, Brackwasser- (70% filtriertes und ozoniertes Ostseewasser aus der Anlage in Strande) oder marinem (70% filtriertes Nordseewasser vom Inst. für Hydrobiologie, Hamburg) Ammoniak- bzw. Nitritoxidanten-Medium (Lebedeva et al., 2005).

Zur Identifizierung der nitrifizierenden Bakterien und anderen Mikroorganismen in den Anlagen Büsum und Strande wurden verschiedene Methoden angewandt:

Transmissions-Elektronenmikroskopie

Um Zellen elektronenmikroskopisch untersuchen zu können, müssen diese zunächst fixiert, entwässert und in Kunstharz eingebettet werden. Die Füllkörper oder abzentrifugierten Zellen aus Anreicherungen 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. Die Nachkontrastierung erfolgte mit Uranylacetat und Bleicitrat (Watson et al., 1986) und die Zellen wurden mit Hilfe eines Transmissions-Elektronenmikroskops (Model Leo 906E) untersucht.

Molekularbiologische Methoden

Die Kulturen werden zur Zellgewinnung zentrifugiert und die Pellets in der DNA-Extraktion (s.u.) weiterverarbeitet. Bei den Naturproben wurde der Biofilm von den Füllkörpern durch Schütteln mit Glaskügelchen abgelöst oder direkt vom Rand des Biofilters geschabt.

Die genomische DNA aus den Biofilmzellen wurde mit Hilfe des DNA Isolierungskits „Ultra Clean™ Microbial DNA Isolation Kit“ der Firma MoBio Laboratories Inc. extrahiert. Danach wurde die DNA mit Hilfe der Polymerasenkettenreaktion (PCR) in einem Biometra Tpersonal Minicycler mit verschiedenen Primern vervielfältigt.

Zum Teil wurde mit amplifizierten PCR-Produkten eine DGGE (denaturierende Gradienten-Gel-Elektrophorese) durchgeführt, um so gleichlange DNA-Fragmente voneinander zu trennen, die von unterschiedlichen Organismen stammen. Die unterschiedlichen Zusammensetzungen mit den Basen Adenin, Guanin, Cytosin, Thymin lassen die Fragmente unterschiedlich weit im Gel wandern, so dass sie einzeln ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert werden können. Von einigen Proben wurden 16S-rDNA-Fragmente in den pGEM-T Cloning Vector (Promega) kloniert. Dieser wird in *E.coli* transformiert und auf Festmedium ausgestrichen. Jede Kolonie von *E.coli* vervielfältigt somit nur eine Version des 16S-Gens, die dann ebenfalls sequenziert werden kann. Die DNA-Fragmente wurden durch die Firma DNA-Cloning Service (Hamburg) sequenziert. Die erhaltenen Sequenzen wurde in der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov) eingegeben und unter Verwendung des Programms BLAST mit allen in den Datenbanken vorhandenen prokaryotischen (und archaealen) 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.

Fettsäure-Analyse und ¹³C-Markierung

Myriam Kruse

Chemolithoautotrophe Organismen zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, CO₂ fixieren zu können. Durch Assimilierung gelangt dieses in die Bausteine (z. B. Fettsäuren) der stoffwechselaktiven Zellen. Durch die Inkubation von Umweltproben mit ¹³C, welches in Form von stabilen Isotopen als Substrat zur Verfügung gestellt wird, können die Veränderungen im ¹³C zum ¹²C-Verhältnis dargestellt werden. Durch eine Fettsäureanalytik der Phospholipidfraktion können über die Abundanzen Rückschlüsse auf die Aktivität der autotrophen nitritoxidierenden Organismen geschlossen werden.

Den verschiedenen Nitrit-oxidierenden Bakterien können unterschiedliche Hauptfettsäuren zugeordnet werden. Versuche im Belebtschlamm einer kommerziellen Kläranlage zeigten hierbei vor allem die Konkurrenz der Organismen *Nitrobacter*, *Nitrotoga* und *Nitrospira* (Kruse, unveröffentlicht). Während die Organismen *Nitrobacter*, mit der Hauptfettsäure 18:1 cis 11, und *Nitrotoga*, mit der Hauptfettsäure 16:1 cis 9, keine spezifischen Lipide aufweisen, zeichnet sich der Organismus *Nitrospira* durch drei spezifische Hauptfettsäuren aus, die in verschiedenen Kombinationen vorkommen. Es

handelt sich um die Fettsäuren 16:1 cis 7, 16:1 cis 11 und 16:0 11 methyl (Lipski et al., 2001).

Um Hinweise auf die Zusammensetzung der nitritoxidierenden Bakteriengemeinschaft im Biofiltersystem der marinen Fischzuchtanlagen zu untersuchen, wurden chemotaxonomische Untersuchungen durchgeführt:

Die Präparation und Analyse der Fettsäuremuster aus Anreicherungskulturen erfolgte nach Sasser (1990). Um die Fettsäuren in Biofiltermaterial-Anreicherungen zu bestimmen wurden diese für mehrere Wochen in 3-Liter-Kolben mit 1,5 l Mineralmedium inkubiert und regelmäßig mit Nitrit versorgt. Die Zellen wurden dann geerntet und anschließend ca. 40 mg Zellmasse für die Präparation eingesetzt. Nach einem Verseifungs-, Methylierungs-, Extraktions- und Waschschrift erhielt man die Methylester der Fettsäuren. Die Markierung mit ^{13}C als Substrat für eine anschließende massenspektrometrische Analyse wurde wie bei Knief et al. (2003) beschrieben durchgeführt. Die Markierung des Biofiltermaterials wurde in gasdichten Kolben (500 ml) mit 20 mM $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ durchgeführt (Abb. 9.1).



Abb. 9.1: Gasdichte Kolben mit Biofiltermaterial

Hierzu wurden jeweils 100 Füllkörper in 100 ml Mineralmedium bei unterschiedlichen Temperaturen und Nitritkonzentrationen inkubiert. Die Inkubationszeit richtete sich nach dem Sauerstoffgehalt in den Kolben. Dieser wurde regelmäßig gemessen, um zu verhindern, dass die Proben anoxisch werden. Die Proben wurden bei einer Sauerstoffkonzentration von ca. 5 % geerntet. Die Nitritkonzentration wurde zwei Mal pro Woche bestimmt und bei Bedarf wurde die jeweilige Konzentration zugefüttert. Für die Lipidextraktion wurde das Biofiltermaterial von den Filterkörpern abgeschüttelt. 40 ml der Suspension wurden zentrifugiert und der Rückstand in die Phospholipid-Extraktion eingesetzt. Die Lipide wurden durch Chloroform extrahiert, über Silicagelsäulen getrennt und die Phospholipidfraktionen zu Fettsäuremethylester (FAMES) methyliert.

Die Auftrennung und Identifizierung der FAMES (Fettsäuremethylester) erfolgte am GC/MSD und GC/FID, wie bei Lipski und Altendorf (1997) beschrieben. Beim GC/MSD handelt es sich um einen Gaschromatographen (Hewlett Packard 5890 Series II Plus) mit angeschlossenen Massenspektrometer (Hewlett Packard MS 5972 Series) und beim GC/FID (Gaschromatograph mit Flammenionisationsdetektor) handelt es sich um einen Hewlett Packard 6890 GC.

ERGEBNISSE

Anlage Büsum:

Anreicherungen aus der Probennahme vom 31.10.2005:

Die Anreicherungen, die schon in der ersten Projektphase angesetzt wurden, wurden in der zweiten Phase weiter überimpft und kultiviert.

Ammoniak-oxidierende Bakterien (AOB):

Aus einer AOB Kultur, die in 3L-Kolben unter Rühren in CaCl₂-AOB Medium (marin) bei 17 °C angereichert wurde, wurden am 06.03.2008 Zellen geerntet und nach einer Dichtegradientenzentrifugation (Percoll-Zentrifugation) in Verdünnungsreihen überimpft. Die höchsten noch angewachsenen Verdünnungsstufen (10^{-x}) wurden in 100ml Kolben überimpft. Daraus wurden am 16.02.2009 Zellen geerntet und die DNA isoliert. Nach einer PCR mit dem Primerpaar AmoAf/AmoAr (Rotthauwe et al.,1997), welches an die α -Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase bindet, wurden die amplifizierten Fragmente kloniert und je ein bis drei Klone sequenziert. Die Sequenzen ergaben, dass es sich bei den Ammoniakoxidanten um nahe Verwandte von *Nitrosomonas marina* handelt. Weitere Berechnungen können Aufschluss darüber geben, ob es sich um neue Arten handelt oder nicht.

Nitrit-oxidierende Bakterien (NOB):

Die Anreicherung 2.1 (marines NOB Medium, am 12.10.2007 angeimpft, Probe von 2005 aus Büsum) bildete bei der Kultivierung in einem Kolben (5 Liter) unter Rühren im 22 °C Raum einen ausgeprägten rot-braunen Biofilm an der Glaswand des Kolbens. Im März 2008 wurden mit diesem Biofilm Verdünnungsreihen angeimpft, von deren höchsten noch angewachsenen Verdünnungsstufen eine weitere Verdünnungsreihe angeimpft wurde. Dadurch konnte ein neuer Vertreter von *Nitrospira* isoliert und in physiologischen Versuchen weiter untersucht werden. Der „Nitrospira 2.1“ zeichnet sich durch seine hohe Substrattoleranz sowie durch die starke Bildung von Biofilmen an festen Oberflächen aus (Abb. 9.2).

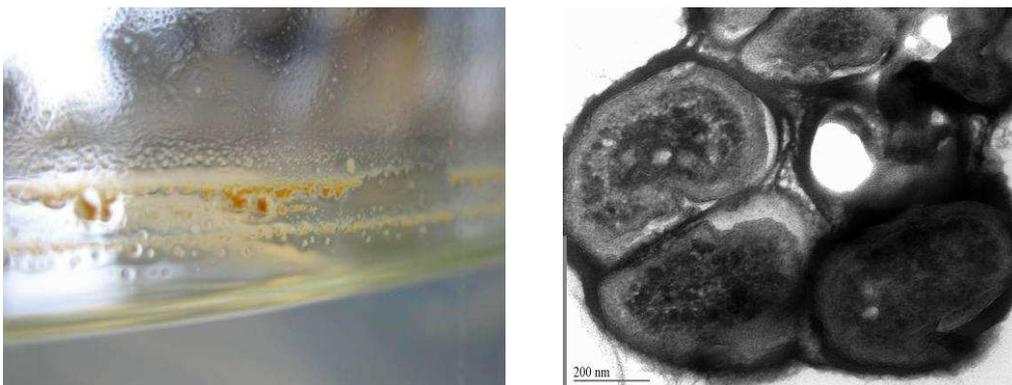


Abb. 9.2: Anreicherung des Nitritoxidanten Eco 2.1 Ns: links: Biofilmbildung an der Glaswand der Kulturflasche, rechts: Ultradünnschnitt- Aufnahme einer Kolonie von *Nitrospira*. Balken = 200nm

In Abbildung 9.3 ist ein Stammbaum von *Nitrospira* dargestellt. Er zeigt die Verwandtschaft der Anreicherung Eco 2.1 Ns und eines weiteren Vertreters von *Nitrospira* (ECOMARES M1), der durch spezifische PCR in der DNA des Biofilms am Biofilterrand von Modul 1 detektiert wurde. Im Gegensatz zu der Kultur Eco 2.1 konnten diese Bakterien nicht im Labor angereichert werden, da die Kultivierungsbedingungen

wahrscheinlich besser an *Ns marina* und nahen Verwandten dessen angepasst sind. Der hoch angereicherte *Nitrospira* 2.1 ist näher mit der beschriebenen Art *Nitrospira marina* verwandt als der Vertreter ECOMARES M1. Die höchste Ähnlichkeit der 16S rRNA-Sequenz hat die Kultur 2.1 mit einem Klon aus einer israelischen marinen RAS (Foesel et al., 2007).

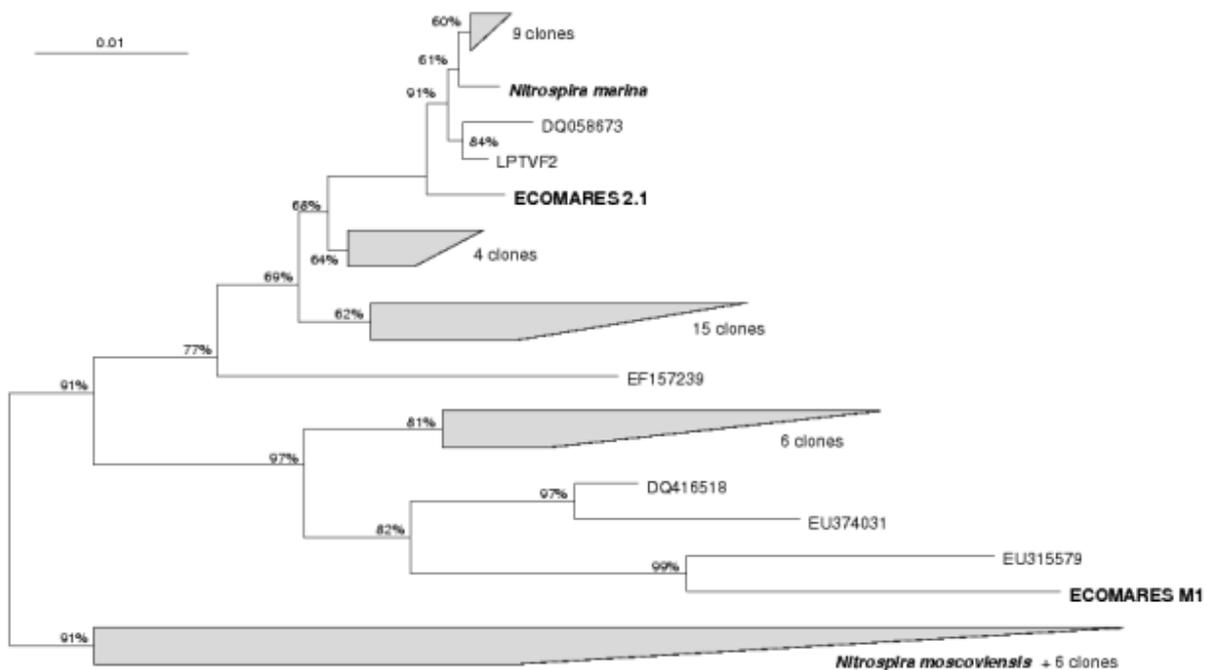


Abb. 9.3: Stammbaum (neighbour-joining) von *Nitrospira*. Die beiden Sequenzen aus der Ecomares-Anlage sind fett gedruckt, sowie die beiden einzigen beschriebenen Vertreter der Gattung *Nitrospira*.

Anreicherungen aus der Probenahme vom 12.06.2007:

Aus beiden Modulen der Anlage Büsum wurden am 12.06.2007 Füllkörper entnommen und die Ammoniak- und Nitritoxidanten im Labor unter verschiedenen Bedingungen (Substrat, Salzgehalt) kultiviert. Die Kulturen wurden mehrmals überimpft, bevor weitere Analysen erfolgten.

Ammoniak-oxidierende Bakterien:

Die DNA aus den Kulturen M1 marin (mit 0,3 mM Substrat angereichert), M2 marin (6 mM) und M1 terrestrisch (0,5 mM) wurde am 15.10.2008 mit dem Primerpaar 341GCf/907r amplifiziert und in einer DGGE eingesetzt. Dieses Primerpaar bindet an die 16S rRNA-Gene aller Bakterien. Die Sequenzierung der ausgeschnittenen Banden zeigte, dass neben AOB immer noch andere Bakterien in den Anreicherungen vorhanden waren (z.B. Planctomyceten, Rhodococcen, Actinomycetales). 16S rRNA-Gensequenzen von Vertretern von *Nitrosomonas marina*-ähnlichen AOB stammten aus beiden marinen Anreicherungen. Die terrestrische Anreicherung zeigte insgesamt weniger Banden, von denen aber keine reamplifiziert werden konnten. Eine Hauptbande lief jedoch auf der Höhe der anderen *Nm marina*-Banden.

Von denselben Kulturen wurden am 08.09.2008 und 20.10.2008 Zellen geerntet und für Untersuchungen im EM eingebettet. Die Ultradünnschnitte zeigten, dass sich in den Kulturen sowohl bekannte als auch unbekannte Zellen mit den für nitrifizierende Bakterien charakteristischen ICM (intracytoplasmatische Membranen) befanden. Abbildung 9.4 zeigt vermutlich vier Zellen einer *Nitrosomonas*-Art aus der Anreicherung AOB M1 terrestrisch (0,5 mM Substrat). Ungewöhnlicherweise sind die ICM Stapel einseitig dicker.



Abb. 9.4: Ultradünnschnitt von vier *Nitrosomonas*-ähnlichen Zellen mit einseitig dickeren ICM-Stapeln (Pfeil).

Die nächste Abbildung (9.5) zeigt eine große Kolonie von *Nitrospira*, die sich in der Mitte bereits auflöst. Das Detailbild zeigt eine kleine *Nitrosomonas*-Kolonie mit der bekannten gleichmäßigen Verteilung der ICM in der Zellperipherie und Carboxysomen (graue sechseckige Punkte, Anhäufung von RubisCo, dem Schlüsselenzym für die CO₂-Fixierung). Die Zellen stammen (wie auch bei Abb. 9.6) aus der Anreicherung AOB M1 0,3 mM. Abbildung 9.6 zeigt eine weitere potentielle Zelle von *Nitrosomonas* in Teilung. Im Cytoplasma hat sich der Stärke-ähnliche Speicherstoff Glycogen, erkennbar als dunkle granuläre Substanz, angehäuft.

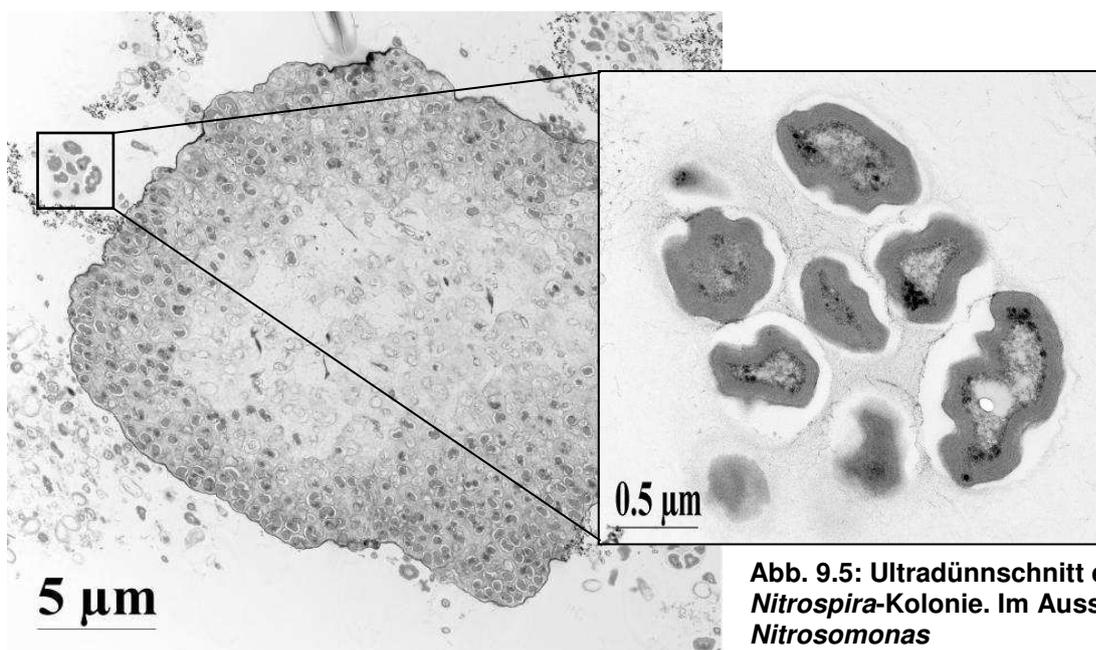


Abb. 9.5: Ultradünnschnitt einer großen *Nitrospira*-Kolonie. Im Ausschnitt *Nitrosomonas*

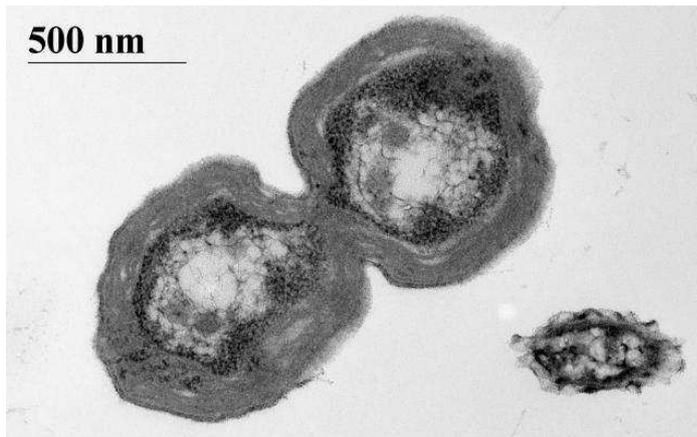


Abb. 9.6: Ultradünnschnitt einer potentiellen *Nitrosomonas*-Zelle bei der Teilung

Die Abbildungen 9.7 und 9.8 zeigen Zellen aus der Anreicherung AOB M2 marin 6mM. In Abbildung 9.7 finden sich *Nitrosomonas*-ähnliche Zellen im Längsschnitt, die eine labile Zellstruktur aufweisen. Abbildung 9.8 zeigt eine kleine Kolonie von *Nitrospira*, die sich ebenfalls in der AOB-Kultur befand und von den Ammoniakoxidanten mit Nitrit versorgt wurde.

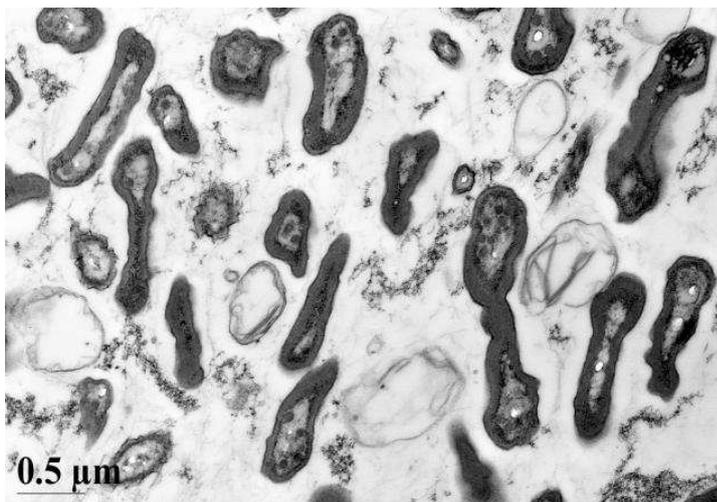


Abb. 9.7: Ultradünnschnitt von *Nitrosomonas*-ähnlichen Zellen

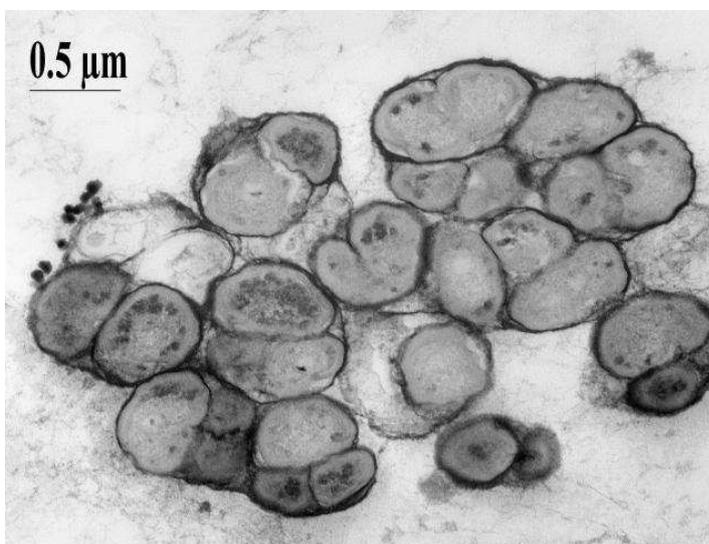


Abb. 9.8: Ultradünnschnitt einer *Nitrospira*-Kolonie

Um die Vertreter der AOB in den Kulturen besser von den Begleitorganismen zu trennen, wurden am 13.10.2008 und am 03.12.2008 Verdünnungsreihen in mineralischem Medium angelegt. Von den höchsten noch angewachsenen Verdünnungsstufen (10^{-x}) wurden wiederum Zellen in Kolben (300 ml) angezüchtet und deren DNA isoliert.

Von dieser und von der DNA aus den Ausgangskolben M1 und M2 marin wurden die Gensequenzen der AmoA mit Hilfe des Primerpaars AmoAf/AmoAr (Rotthauwe et al., 1997) amplifiziert und bei positivem Ergebnis kloniert. Sequenzabgleiche mit der Datenbank NCBI ergaben, dass die drei gepickten Klone aus dem Ausgangskolben M1 (0,3mM) jeweils Verwandte von *Nitrosomonas marina* sind, allerdings nur mit einer Übereinstimmung von 87%. 98%ig ist dagegen ihre Übereinstimmung mit der Sequenz eines Klons, der aus einer marinen Aquakultur stammt (Foesel et al., 2007). Ein ähnliches Ergebnis brachte der Abgleich der Sequenzen, die aus den anderen Kolben der Verdünnungsreihe (sowohl M1 als auch M2) stammten. Nur aus der Ausgangskultur M2 (6 mM) zeigte eine Sequenz eine 92%ige Ähnlichkeit zu einem anderen isolierten und beschriebenen Verwandten, *Nitrosomonas aestuarii*. Die geringen Sequenzübereinstimmungen mit beschriebenen Arten der Gattung Nitrosomonas lassen darauf schließen, dass es sich bei den AOB in den Anreicherungen aus Büsum um neue Arten handelt, deren Beschreibung im Rahmen von weiteren Arbeiten möglich ist. Die Artgrenze auf Ebene der 16S rRNA liegt im Allgemeinen bei 97%iger Sequenzübereinstimmung.

Nitrit-oxidierende Bakterien (NOB):

Bei der DGGE am 15.10.2008 wurden auch die amplifizierten 16S-Fragmente der NOB-Anreicherung M1 terrestrisch eingesetzt. Die nachfolgende Sequenzierung ergab hier, dass sich ein Vertreter von *Nitrobacter hamburgensis* oder *vulgaris* (beide 92% Ähnlichkeit, allerdings nur 250 Basenpaare zum Abgleich verfügbar) in der Kultur befindet. Durch das terrestrische Medium konnte dieser Nitritoxidant dominieren, was bedeutet, dass er auch in der Anlage selbst vorkommen muss. Durch spezifische PCR konnte ein *Nitrobacter*-Stamm auch aus Naturproben detektiert werden (s.u.), hier ergab die Sequenzierung, dass es sich um Vertreter der Art *Nitrobacter sp* Stamm 311, einem Isolat aus dem Atlantik, handelt.

Naturproben:

Einige Füllkörper (Modul 2) der Probenahme vom 12.06.2007 wurden direkt in Natriumchlorid eingefroren. Am 12.3.2008 wurden diese aufgetaut, die Zellen mit Hilfe von Glaskügelchen abgeschüttelt und die DNA isoliert. Zeitgleich wurde die DNA aus einer Probe vom Biofilterrand des Moduls 2 (28.07.2008) isoliert. Diese Proben bzw. deren amplifizierte 16S rRNA-Fragmente wurden in PCR Ansätzen mit verschiedenen spezifischen Primerpaaren eingesetzt (Tabelle 9.1). Auch wenn nicht in allen Fällen eine positive Reaktion zu beobachten war, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass der Zielorganismus sich nicht in den Proben befindet. Entweder passte das jeweilige Primerpaar nicht oder die DNA-Konzentrationen waren zu gering.

Tabelle 9.1: Auflistung der spezifischen Primerpaare zur Untersuchung von Naturproben aus der Anlage in Büsum. Ein Plus bedeutet erfolgreiche Amplifikation

Primerpaar	Autor	Zielorganismus	Füllkörper	Biofilter-rand
AmoAf/ AmoAr	Rotthauwe et al. 1997	Bakterielle AmoA	+	+
Arch21f/ Arch958r	DeLong 1992	16S Archaea		+
ArchAmoAf/ ArchAmoAr	Francis et al. 2005	Archaeale AmoA		
Ns60f/ kurz/ 662r	Alawi 2007/ Daims et al. 2000	<i>Nitrospira</i>	+	+
27f/ NscmaR	Lane 1991/ Alawi 2007	<i>Nitrosococcus oceani</i>		
341f/ Nspn347 2r	Muyzer et al. 1998/ Alawi 2007	<i>Nitrospina 347</i>		
Nb1000g F Deg2 R	Mobarry et al. 1996 Degrange&Bardin 1995	<i>Nitrobacter</i>	+	
NSV443r/ 27f	Mobarry et al. 1996/ Lane 1991	<i>Nitrosospira</i>	+	+
341f/ Amx820r	Muyzer et al. 1998/ Egli et al. 2001	Anammox- Planctomyceten		

Die direkte Sequenzierung einiger PCR Produkte ergab folgende Ergebnisse für die Füllkörper- (FK) und die Biofilterrandproben (BF):

Bakterielle AmoA: FK und BF: 92% *Nm aestuarii* AmoA
16S Archaea: BF: 97% *Nitrosopumilus maritimus*
16S Nitrobacter: FK: 99 % *Nitrobacter* sp. Stamm 311 (marin)
16S Nitrosospira: BF: 86% *Nitrosospira* sp. Nsp65

Mit dem β -AOB-spezifischen Primerpaar CTO189GC F/CTO654 R (Kowalchuk et al., 1997) wurden 16S rDNA-Amplifikate der FK und BF Proben aus Büsum amplifiziert. Die aus der DGGE resultierenden Banden (jeweils zwei pro Probe) wurden ausgeschnitten, reamplifiziert und sequenziert. Die Sequenzen zeigten eine Ähnlichkeit von 92% zu *Nitrosomonas marina* und von 96% zu *Nitrosomonas* sp Stamm 143. Ähnliche Sequenzen von dem Stamm 143 wurden ebenfalls in marinen RAS gefunden (Foesel et al., 2007) und auch in Phase I bereits detektiert.

Abbildung 9.9 zeigt den Stammbaum (neighbour-joining Methode) der AmoA-Sequenzen aus den Anreicherungen Büsum (Klone) und einer Naturprobe (FK Büsum). Klon M2 Büsum aus einer Anreicherung mit viel Substrat (6 mM) und die direkte Sequenz von den FK aus Büsum zeigen eine höhere Ähnlichkeit zu *Nitrosomonas aestuarii* als die anderen Sequenzen, die in ein Cluster mit den Klonen (hier ist nur eine Sequenz dargestellt) aus der israelischen marinen RAS stammen (Foesel et al., 2008). Da die AmoA-Sequenzen kürzer sind (um 300 bp) als die der 16S rRNA, ist es schwieriger, sie bekannten Arten zuzuordnen.

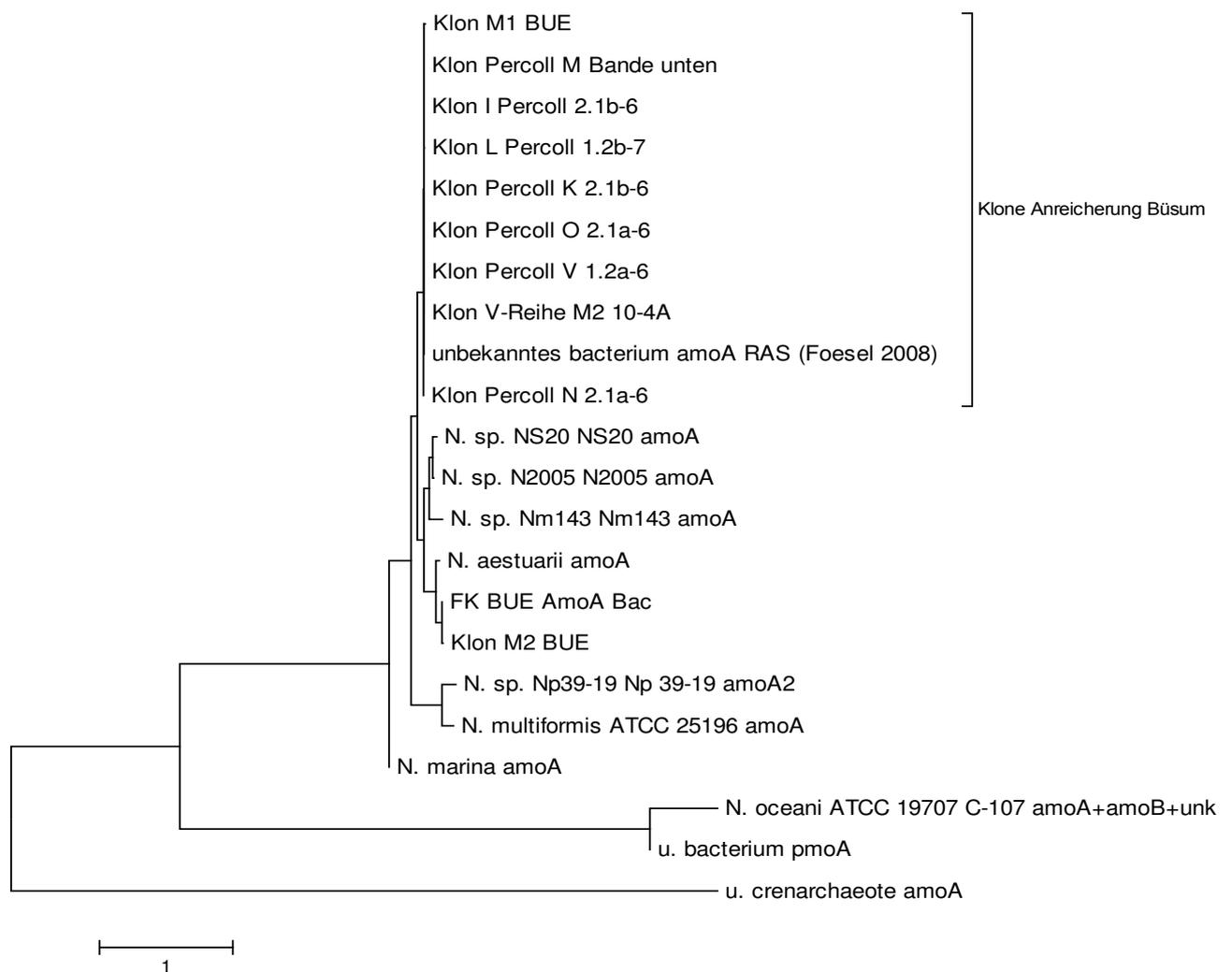


Abb 9.9: Stammbaum der AmoA-Sequenzen aus Anreicherungen Büsum (Klone) und einer Naturprobe (FK Büsum)

Anlage Strande:

Anreicherungen:

Am 14.06.2007 wurden dem Shrimp-Biofilter der Anlage in Strande Füllkörper entnommen und in verschiedene Medien (siehe Anreicherungen Büsum) überimpft. Die Anreicherungen wurde seitdem gefüttert und mehrmals überimpft. Die Zellen wurden im Sommer 2008 geerntet und DNA extrahiert. Eine DGGE mit *Nitrospira*-spezifischen Primern ergab, dass sich alle NOB-Anreicherungen, ob terrestrisch, marin oder

brackisch, in ihrem Bandenmuster nicht unterscheiden. Die Sequenzen ähneln zwischen 97 und 99% *Nitrospira marina* und einem Klon aus einer marinen RAS (Np 77; Foesel et al., 2007).

Naturproben:

Wie oben beschrieben (Naturproben BÜsum) wurde mit Proben aus dem Shrimp-Biofilter der Anlage in Strande verfahren (Proben vom 05.03.2009, FK und Biofilterrand). Die Tabelle 9.2 zeigt, mit welchem Primerpaar die in den Proben enthaltene DNA reagiert hat.

Tabelle 9.2: Auflistung der spezifischen Primerpaare zur Untersuchung von Naturproben aus der Shrimp-Anlage in Strande. Ein Plus bedeutet erfolgreiche Amplifikation.

Primerpaar	Autor	Zielorganismus	Füllkörper	Biofilter-rand
AmoAf/ AmoAr	Rotthauwe et al. 1997	Bakterielle AmoA	+	+
Arch21f/ Arch958r	DeLong 1992	16S Archaea	+	+
ArchAmoAf/ ArchAmoAr	Francis 2005	Archaeale AmoA	+	
Ns60f/ kurz/ 662r	Alawi 2008/ Daims et al. 2000	<i>Nitrospira</i>	+	+
27f/ NscmaR	Lane 1991/ Alawi 2008	<i>Nitrosococcus oceani</i>		
341f/ Nspn347 2r	Muyzer et al. 1998/ Alawi 2008	<i>Nitrospina</i> 347		
Nb1000g F Deg2 R	Mobarry et al. 1996 Degrange&Bardin 1995	<i>Nitrobacter</i>	+	
NSV443r/ 27f	Mobarry et al. 1996/ Lane 1991	<i>Nitrosospira</i>	+	+
341f/ Amx820r	Muyzer et al. 1998/ Egli et al. 2001	Anammox- Planctomyceten		

Die direkte Sequenzierung der PCR Produkte ergab folgende Ergebnisse für die Füllkörper- (FK) und die Biofilterrandproben (BF):

Bakterielle AmoA: FK und BF: 87% *Nm marina* Stamm 22, 98% AmoA Klon aus marinem RAS (Foesel et al., 2007; AM295563)

16S Archaea: FK und BF: 96% *Nitrosopumilus maritimus*

Archaeale AmoA: FK: 87% *Nitrosopumilus maritimus*, 98% Klon aus marinem Aestuarsediment (FJ165068)

16S Nitrospira: FK: 89% *Ns marina* Stamm 295,
BF: 92% Np77 Klon aus marinem RAS (Foesel et al., 2007)

16S Nitrobacter: FK: 97% *Nitrobacter sp.* Stamm 311

Im nächsten Stammbaum (Abb.9.11) sind die Sequenzen eingerechnet, die durch das Archaea-Primerpaar amplifiziert worden sind (neighbour-joining Methode mit bootstrap values). Die Archaeen aus Strande und Büsum sind unterschiedlich weit mit *Nitrosopumilus maritimus*, dem bisher einzigen beschriebenen Ammoniak-oxidierenden Archaeon, verwandt.

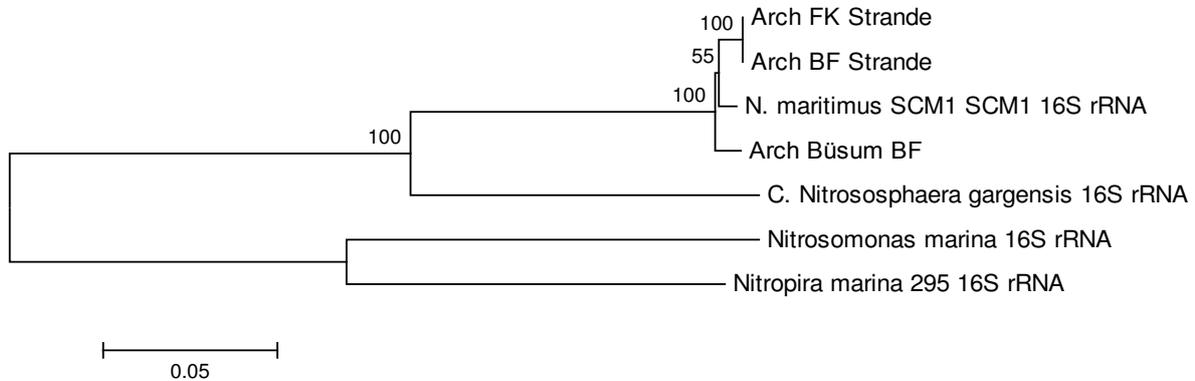


Abb. 9.10: Stammbaum basierend auf archaealer 16S rDNA mit Sequenzen aus Büsum und Strande

EM-Bilder von Naturproben aus Strande:

Nach einer Probennahme am 14.06.2007 aus der Shrimp-Anlage wurde der Biofilter von schwarzen FK eingebettet. Die beiden Abbildungen (9.11 und 9.12) zeigen AOB, die einen zentralen ICM-Stapel (intracytoplasmatische Membran) enthalten, wie er bei *Nitrosococcus oceani* beschrieben ist (Watson, 1965). Die Form der AOB aus Strande unterscheidet sich jedoch von *Nc oceani*, dessen Zellen rund sind.

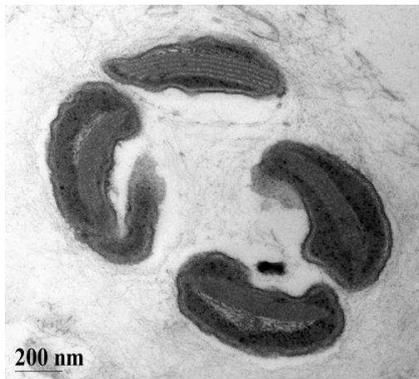
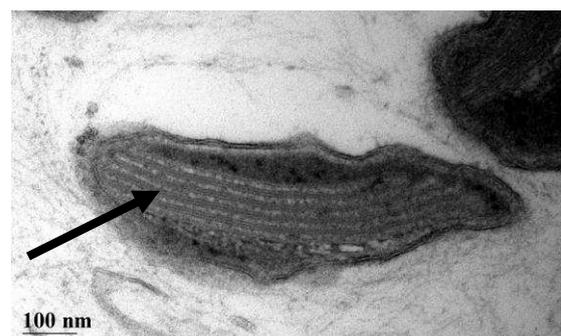


Abb. 9.11: Ultradünnschnitt eines unbekanntes AOB mit zentralen ICM-Stapeln

Abb. 9.12: Vergrößerter Ausschnitt einer Zelle mit zentralem ICM-Stapeln (Pfeil)



Von einem eingebetteten Biofilm desgleichen Probetages, aber von einem weißen FK, dessen Biofilm mit dem bloßem Auge als sehr dick empfunden wurde, wurden folgende Ultradünnschnitte mit Kolonien von *Nitrosospira* (Abb. 9.13) und *Nitrosomonas* (Abb. 9.14, mit peripherer ICM) erstellt. Vertreter von *Nitrosospira* wurden auch durch spezifische PCR detektiert.

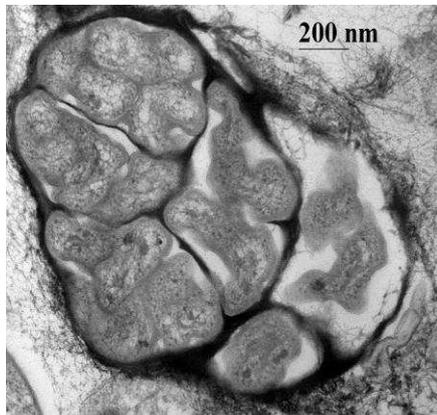


Abb. 9.12 (links): Kolonie von *Nitrosospira*



Abb. 9.14 (rechts): Kolonie von *Nitrosomonas* mit peripherer ICM

Beutel:

Wie in dem Kapitel *Quantifizierung der Nitrifikationsleistung der FK aus den Anlagen Strande und Büsum* bereits beschrieben, wurden am 15.05.2008 Beutel mit weißen und schwarzen neuen FK in den Biofilter der Shrimp-Anlage gehängt und insgesamt neunmal beprobt. Nach diesen Probenahmen wurde jeweils DNA von den FK isoliert. Hierfür wurden je 5 FK in Röhrchen mit Glaskügelchen, NaCl und Triton X 100 gegeben, mit Ultraschall behandelt und danach über Nacht heftig geschüttelt. Die DNA wurde mit einem Soil-DNA-Extraction-Kit der Firma MoBio isoliert.

Am 28.05.2008 wurden von der DNA der Beutelprobe vom 04.06. (weiße FK) und von einer Probe der „alten“ FK im Biofilter am 27.05. (weiße FK) 16S rRNA-Gensequenzen amplifiziert und kloniert. Jeweils zwölf Klone wurden sequenziert und in BLAST mit bekannten Sequenzen verglichen.

„alte“ FK :

FK vom 04.06.2008

- 4 *Nitrosospira*
- 1 β -AOB
- 2 Planctomycetes
- 1 Fibrobacteres
- 1 Actinobacterium
- 1 Nitratreduktor
- 1 Gamma Proteobacteria

- 3 Alpha Proteobacteria
- 2 Cytophaga
- 3 Planctomycetes
- 3 Bacterioidetes
- 1 Porphyrobacter

Die Ergebnisse deuten an, dass fast die Hälfte der Zellen auf den alten FK zu den Nitrifikanten gehört, wobei die Sequenzierung von nur 12 Klonen sicherlich nicht repräsentativ ist. Auf den FK, die seit zwei Wochen in dem Biofilter hingen, konnte unter den zwölf Klonen noch kein Nitrifikant identifiziert werden, obwohl schon eine geringe nitrifizierende Aktivität im Versuch festgestellt wurde (siehe Kapitel Nitrifikationsleistung). Die Ergebnisse einer β -AOB spezifischen DGGE (Primerpaar CTO189GC F/CTO654 R, Kowalchuk et al., 1997) zeigten, dass sich ein Vertreter von

Nitrosomonas marina in der Beutelprobe vom 19.06. befand (4 Wochen) und Vertreter von *Nitrospira sp.* und *Nitrosomonas marina* in der Beutelprobe vom 29.07. (10 Wochen). Eine *Nitrospira*-spezifische PCR mit dem Primerpaar 60f/662r mit anschließender Sequenzierung ergab, dass in der Beutelprobe mit schwarze FK vom 27.05. (2 Wochen) Vertreter der Gattung *Nitrospira* angeheftet waren. Die meiste Ähnlichkeit haben die Sequenzen mit Sequenzen von Klonen von Umweltproben aus Schwamm- und Korallen-assoziierten Bakterien, die nahe verwandt mit *Nitrospira marina* sind. Weitere phylogenetische Untersuchungen der Primärbesiedler der FK aus den Beutelproben stehen noch aus.

Fettsäureanalytik Büsum und Strande

Büsum:

Die Proben für die Fettsäureanalytik aus der Fischfarm Büsum stammten aus dem Modul II. Eine Markierung mit $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ als Substrat wurde im April 2008 in marinem und terrestrischem Mineralmedium bei einer Temperatur von 17 °C mit einer Nitritkonzentration von 3 mM durchgeführt. Aus Anreicherungen in marinem und terrestrischem Mineralmedium wurde eine Gesamtfettsäureanalyse durchgeführt.

Die Ergebnisse der Markierung Modul II (Abb. 9.16) zeigen, dass die für *Nitrospira* spezifischen Fettsäuren 16:1 cis 7 und 16:1 cis 11 mit Prozentanteilen von 6 bis 8 % an den Gesamtfettsäuren (FS) detektiert werden konnten. Zudem zeigte die Fettsäure 16:1 cis 7 einen Markierungsgrad (MG) von 19,6 und 21 % und für die Fettsäure 16:1 cis 11 konnte ein Markierungsgrad von 12,9 und 13,5 % detektiert werden. Die Aktivität für die Fettsäuren 18:1 cis 11 (*Nitrobacter*) und 16:1 cis 9 (*Nitrotoga*) ist im Biofiltersystem nicht relevant.

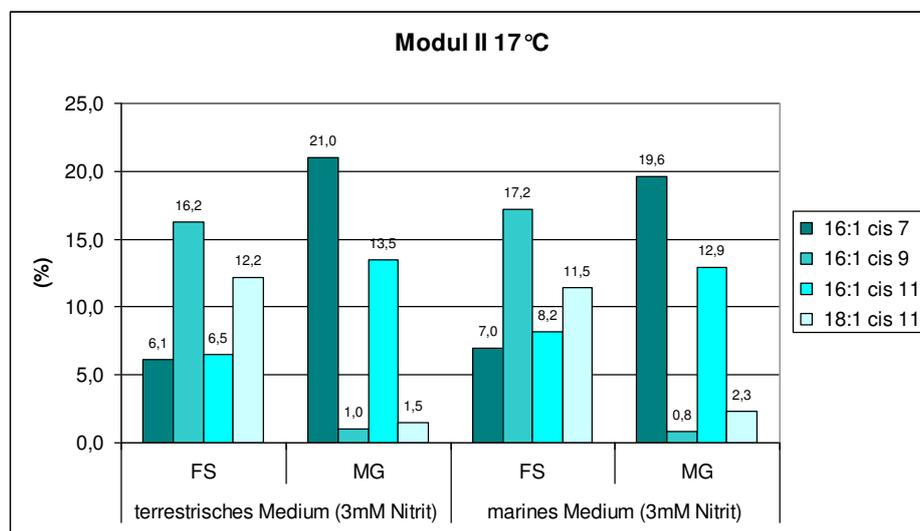


Abb. 9.15: Markierung der Proben aus dem Modul II bei 17°C mit 3 mM Nitrit. (FS = Prozentanteil an Gesamtfettsäuren; MG = Markierungsgrad in Prozent)

Gesamtfettsäureprofile aus Anreicherungen:

Die Anreicherungen aus dem Modul II zeigten sowohl im terrestrischem als auch im marinem Medium einen hohen Prozentanteil an den Gesamtfettsäuren der spezifischen Fettsäuren 16:1 cis 7 mit Prozentanteilen von über 40% und der Fettsäure 16:1 cis 11 mit Prozentanteilen von über 30 % (Tab 9.3).

Tabelle 9.3: Gesamtfettsäureprofile aus Modul II, Anreicherung in terrestrischem Medium und marinem Medium, Analyse im GC/MSD und GC/FID

Fettsäure	Modul II (1.2 terrestrisches Med.)		Modul II (2.1 marines Med.)	
	%-FID	%-MSD	%-FID	%-MSD
14:0	0,9	0,8	0,9	6,7
16:1 cis 7	43,1	41,4	41,9	38,9
16:1 cis 9	1,1	1,3	1,2	1,1
16:1 cis 10	0,7	0,8	2,0	1,8
16:1 cis 11	31,7	31,7	30,7	30,0
16:0	18,9	20,5	19,9	20,6
18:1 cis 11	0,7	0,7	0,9	0,5
18:1 cis 11 11 methyl	-	-	1,1	-
19:0 cyclo 9-10	-	-	1,4	0,2

Strande:

Die Proben für die Fettsäureanalytik aus der Fischfarm Strande stammten aus Tonne 1 (weiße Filterkörper) und Tonne 3 (schwarze Filterkörper) der Barramundi Biofilteranlage und der Shrimp Biofilteranlage (gemischte Filterkörper). In einem ersten Markierungsversuch im April 2008 mit $\text{NaH}^{13}\text{CO}_3$ wurden die Filterkörper in marinem Mineralmedium bei einer Temperatur von 28 °C und einer Nitritkonzentration von 3 mM inkubiert. In einer weiteren Versuchsreihe im Oktober 2008 wurden die Temperaturen und Nitritkonzentrationen erweitert. Hierzu wurden die Filterkörper bei 17 °C und 28 °C inkubiert und Nitritkonzentrationen von 0,3 mM bis 10 mM gewählt.

Markierung April 2008:

Die Ergebnisse der Markierung Biofiltersystem Marifarm (Abb. 9.17) zeigen, dass die für *Nitrospira* spezifischen Fettsäuren 16:1 cis 7 und 16:1 cis 11 mit Prozentanteilen von 3 bis 7 % an Gesamtfettsäuren (FS) detektiert werden konnten. Zudem zeigte die Fettsäure 16:1 cis 7 einen Markierungsgrad (MG) von 12,7 bis 20,5 % und für die Fettsäure 16:1 cis 11 konnte ein Markierungsgrad von 11,1 bis 15,7% detektiert werden. Die Aktivität für die Fettsäuren 18:1 cis 11 (*Nitrobacter*) und 16:1 cis 9 (*Nitrotoga*) ist im Biofiltersystem nicht relevant.

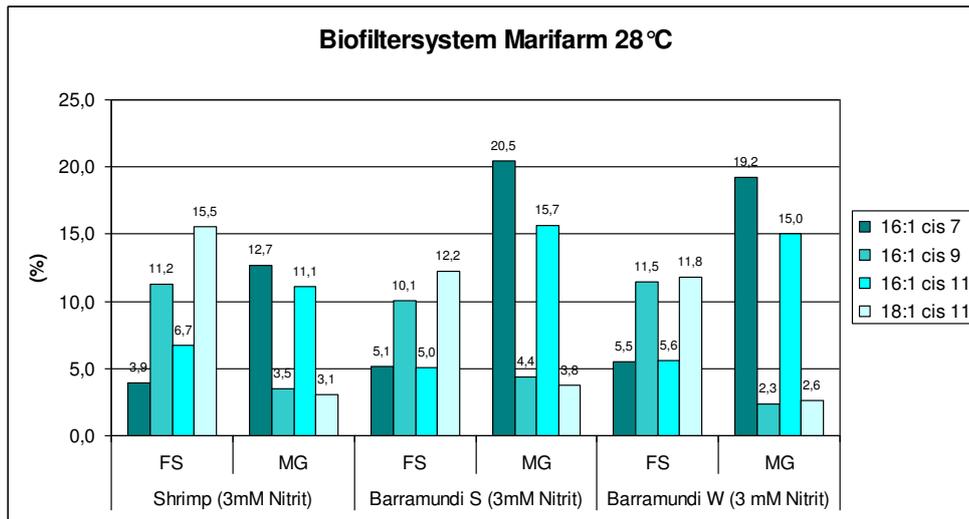


Abb. 9.16: Markierung der Proben aus Strande bei 28°C mit 3 mM Nitrit. (FS = Prozentanteil an Gesamtfettsäuren; MG = Markierungsgrad in Prozent, S = schwarz, W = weiß)

Markierung Oktober 2008:

Im zweiten Versuchsansatz der Barramundi Biofilteranlage (Abb. 9.18) zeigte sich, dass die Aktivität, gemessen als Markierungsgrad der für *Nitrospira* spezifischen Fettsäuren (16:1 cis 7 und 16:1 cis 11) mit der Nitritkonzentration steigt. Weiterhin war ein geringer Anstieg des Prozentanteils dieser Lipide an den Gesamtfettsäuren (FS) zu beobachten. Es konnten Markierungsgrade von über 40 % für die 10 mM-Ansätze detektiert werden.

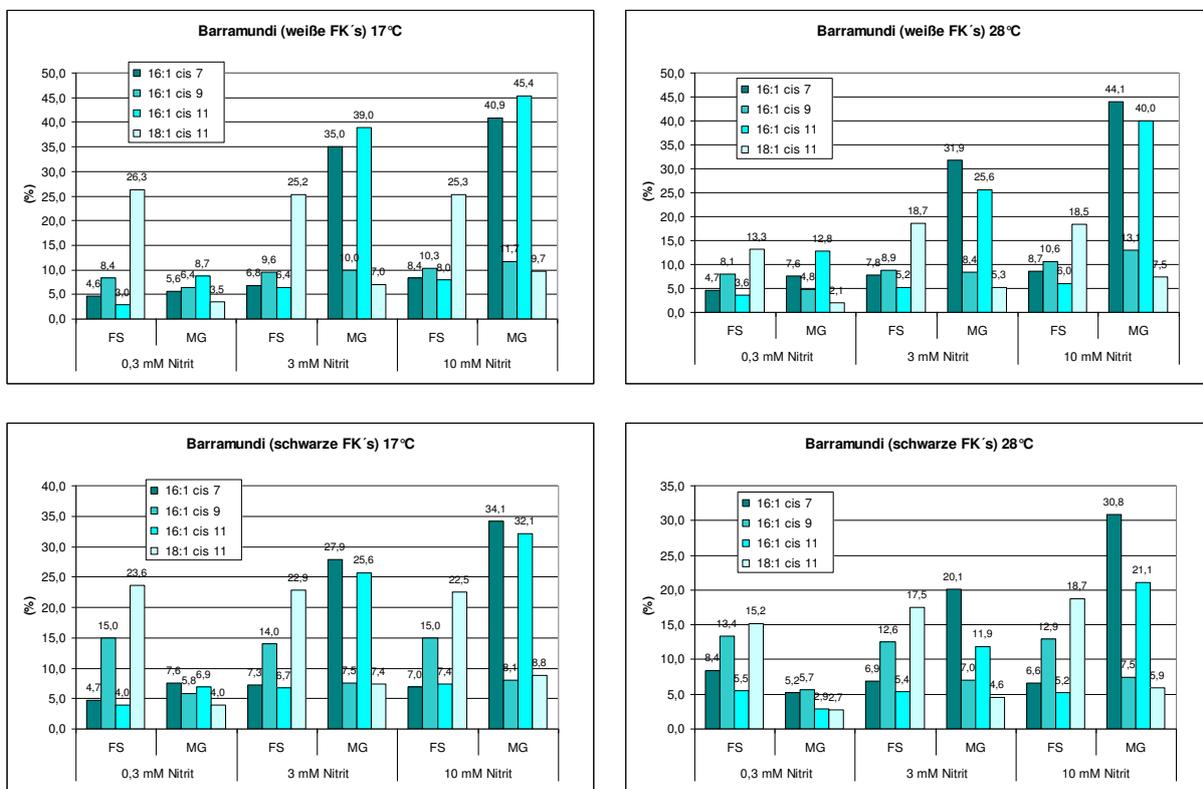


Abb. 9.17: Markierung der Proben Barramundi aus Strande bei 17°C und 28°C mit 0,3 bis 10 mM Nitrit. (FS = Prozentanteil an Gesamtfettsäuren; MG = Markierungsgrad in Prozent)

Im zweiten Versuchsansatz für die Shrimp Biofilteranlage (Abb. 9.19) zeigte sich, dass die Aktivität, gemessen als Markierungsgrad der für *Nitrospira* spezifischen Fettsäuren (16:1 cis 7 und 16:1 cis 11) mit der Nitritkonzentration steigt, wobei der Prozentanteil für die Fettsäure 16:1 cis 7 mit Prozentanteilen von über 35 % für die 10 mM Nitritkonzentrationen deutlich überwiegt. Weiter war ein Anstieg des Prozentanteils an den Gesamtfettsäuren (FS) zu beobachten.

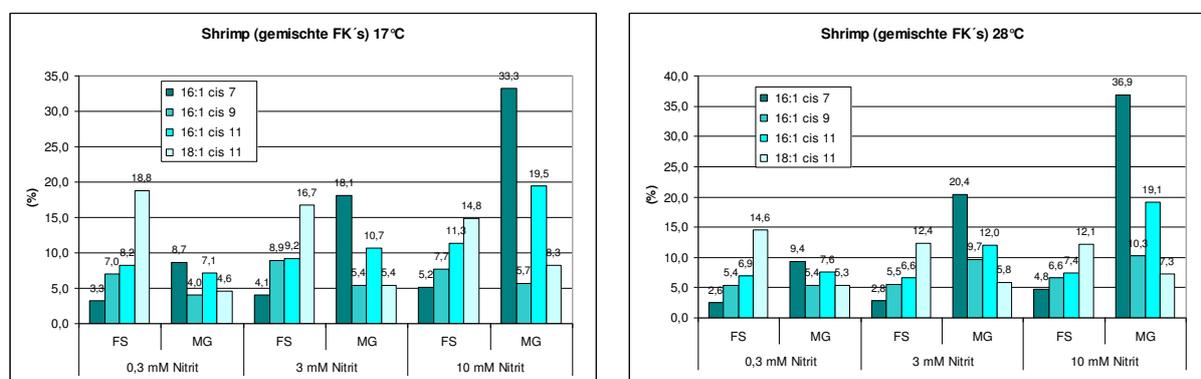


Abb. 9.18: Markierung der Proben Shrimp aus Strande bei 17°C und 28°C mit 0,3 bis 10 mM Nitrit. (FS = Prozentanteil an Gesamtfettsäuren; MG = Markierungsgrad in Prozent)

Die Untersuchungen der Biofilteranlage Modul II der marinen Fischfarm Büsum zeigen, dass bei der gewählten Temperatur und Nitritkonzentration eine hohe Aktivität der für *Nitrospira* spezifischen Hauptfettsäuren 16:1 cis 7 und 16:1 cis 11 detektiert werden konnte. Hierbei kam es zu kaum relevanten Unterschieden bei der Inkubation in terrestrischem oder marinem Medium. Weitere interessante Aspekte könnte eine Untersuchung bei verschiedenen Temperaturen und Nitritkonzentrationen liefern.

Die chemotaxonomischen Untersuchungen der Biofilteranlage der marinen Fischfarm Marifarm in Strande zeigen, dass bei den gewählten Temperaturen und Nitritkonzentrationen eine hohe Aktivität der für *Nitrospira* spezifischen Hauptfettsäuren 16:1 cis 7 und 16:1 cis 11 vorhanden war. Die Hauptfettsäuren für die autotrophen Organismen *Nitrobacter* (18:1 cis 11) und *Nitrotoga* (16:1 cis 9) sind nicht relevant. Besonders interessant ist der Aspekt, dass die für *Nitrospira* spezifischen Hauptfettsäuren auch bei niedrigen Temperaturen (17 °C) und hohen Nitritkonzentrationen (10 mM) eine hohe Abundanz aufweisen, obwohl die Fischfarm selbst bei einer Temperatur von 28 °C betrieben wird. Dies lässt Rückschlüsse auf eine hohe Aktivität zu und spricht für eine hohe Anpassungsfähigkeit von *Nitrospira*. Die unterschiedlichen Kombinationen für die spezifischen Fettsäuren legen den Verdacht nahe, dass es sich um mehrere *Nitrospira* Arten handelt. Die bekannte Art *Nitrospira marina* enthält 30% der spezifischen Fettsäure 16:1 cis 7 und 16% von 16:1 cis 11. In den Shrimp-Biofiltern überwiegt die Fettsäure 16:1 cis 7 deutlich, während in den Barramundi-Biofiltern hohe Prozentanteile der beiden Fettsäuren 16:1 cis 7 und 16:1 cis 11 detektiert werden konnten. Diese Vermutungen sollen noch auf 16S rRNA Ebene geklärt werden.

Die Organismen *Nitrobacter* und *Nitrotoga* haben keine herausragende Rolle im Biofiltersystem der marinen Fischfarm.

Zusammenfassung

Insgesamt erhielten wir durch unterschiedliche Primer und Methoden (PCR, DGGE, Klonierung) Sequenzen, die einen guten Überblick über die nitrifizierenden Bakterien in den Biofiltern zulassen. Obwohl sich die Aquakulturanlagen in Büsum und Strande in Salzgehalt und Temperatur deutlich voneinander unterscheiden, enthalten beide ähnliche Populationen an nitrifizierenden Bakterien.

Die Identifizierung von Zellen der Gattung *Nitrospira* in Biofilterproben im EM im Sommer 2007 bestätigte sich sowohl durch eine β -AOB spezifische DGGE (Strande) als auch durch spezifische PCR mit den Primerpaar 27f/NSV443r (Strande und Büsum). Insgesamt wurden in Büsum öfter AOB als *Nitrosomonas aestuarii* identifiziert als in Strande. Die Untersuchungen im EM ergaben weiterhin, dass sich in beiden Anlagen bisher noch nicht bekannte Arten von AOB befinden können.

Nitrosococcus wurde im EM in einer Probe aus M1 gefunden. Da bisher alle *Nitrosococcus oceani*-spezifischen PCR-Ansätze jedoch negativ verliefen, handelt es sich hier entweder um eine neue Art oder um *Nitrosococcus mobilis*.

Die dominierenden NOB in den Anlagen sind Vertreter von *Nitrospira*, wie auch schon im Bericht von Phase I erwähnt. Dies wurde durch Sequenzanalysen als auch durch die Fettsäureanalysen bestätigt. Der Prozentanteil an *Nitrospira*-spezifischen Fettsäuren an den Gesamtfettsäuren betrug 6-8% (Büsum) bzw. 3-7% (Strande). Wie viele verschiedene Arten von *Nitrospira* in den Filtern vorkommen, muss noch geklärt werden. Da die bisher gewonnenen Sequenzen (außer die der Klonierung der Anreicherungen Eco 2.1) nicht sehr lang sind (um 600 Basenpaare) ist eine genaue Abgrenzung untereinander schwierig. Bei den NOB ergaben die Untersuchungen am EM, dass in Strande mindestens zwei verschiedene Arten vorkommen. Ebenso stammen aus Büsum zwei sehr unterschiedliche *Nitrospira*-Sequenzen. Durch die Markierungen der Fettsäuren mit ^{13}C konnte auch eine hohe Aktivität dieser NOB in den Biofiltern nachgewiesen werden.

Vertreter von *Nitrobacter* konnten in einer terrestrischen NOB-Anreicherung aus Modul 1 (Büsum) detektiert werden (*Nb hamburgensis* bzw. *vulgaris*). *Nitrobacter*-spezifische PCR mit DNA aus Naturproben aus Strande wie auch Büsum verliefen ebenfalls positiv (*Nitrobacter sp.* Stamm 311). Viele negative Amplifikations-Versuche mit *Nitrobacter*-spezifischen Primern und EM-Aufnahmen deuten aber darauf hin, dass die Zellzahlen von *Nitrobacter* im Biofilter sehr gering sind. Auch die Ergebnisse der Fettsäureanalysen zeigten, dass die Aktivitäten von *Nitrobacter* (und auch von *Nitrotoga*) in beiden Anlagen nicht relevant sind.

Viele der Sequenzen von NOB als auch AOB aus beiden Anlagen sind den Sequenzen sehr ähnlich, die Bärbel Foesel 2007 aus einem marinen RAS in Israel gewonnen hatte. So scheint die Umwelt „Rezirkulationsanlage“ die Bakterien in eine Richtung zu selektieren, möglicherweise durch die hohen Substratkonzentrationen im marinen Milieu.

Durch die Verwendung von Archaea-spezifischen Primern, die zum einen Fragmente der 16S rDNA, zum anderen Fragmente der *AmoA* amplifizieren, wurde die Anwesenheit von Ammoniak-oxidierenden Archaeen in den Biofiltern beider Anlagen nachgewiesen. Da Archaeen bei der Ammoniak-Oxidation im Ozean eine große Rolle

spielen (Wuchter et al., 2006), ist diese Tatsache nicht überraschend. Wahrscheinlich sind die Zellzahlen der Ammoniak-oxidierenden Archaeen im Biofilter nicht von großer Bedeutung, da sie sich nur bei niedrigen Substrat-konzentrationen gegenüber Bakterien durchsetzen können (Hatzenpichler et al., 2008) Auch konnten bisher keine Archaeen im Biofilm der Biofilter im EM identifiziert werden. Der Einsatz von FISH mit einer Archaea-spezifischen RNA-Sonde könnte hier für Klärung sorgen.

Unter den Klonen der Beutelprobe vom 04.06.2008 befanden sich drei Vertreter der Ordnung Planctomycetales. Zu dieser Ordnung gehören auch die Bakterien, die mit Nitrit anaerob Ammoniak oxidieren. Dieser Prozess, Anammox genannt, wurde erst kürzlich entdeckt (Strous et al., 1999). Da die Anammox-Reaktion immer mehr als Alternative zur aeroben Nitrifikation diskutiert wird, wurden die Naturproben mit Anammox-spezifischen Primern untersucht, die PCR verliefen jedoch negativ. Es handelt sich bei den Sequenzen aus den Beutelproben demnach um andere Vertreter der Planctomycetales.

Fazit

In diesem Zwischenbericht sind die bisherigen Ergebnisse aus der Phase II des Projekts „Entwicklung neuartiger Trägermaterialien für die Wasseraufbereitung und Kreislaufführung in Marikultur-Produktionsanlagen der Fischzucht“ zusammengetragen worden. Es handelt sich dabei um Ergebnisse sehr unterschiedlicher Untersuchungen, die teils Licht in das Dunkel der „black box“ bringen konnten, teils aber auch neue Fragen aufwerfen. Im Folgenden werden noch einmal die Ergebnisse für jeden Teil diskutiert und, wo möglich, in Zusammenhang gebracht.

Durch die Teilnahme der Ecomares Group (und später der EAP) in dem Projekt war es möglich, die Entwicklungen in Aquakulturanlagen in Bezug auf Untersuchungen zur Nitrifikation über eine lange Zeit hinweg zu begleiten. Ereignisse wie die Senkung des pH-Wertes sind dabei unvorhergesehene wie auch interessante Aspekte. Die Ergebnisse der Versuche im Labor spiegelten jeweils die Belastungsniveaus in den Anlagen wieder, was bedeutet, dass die Aktivitätstests ein geeignetes Mittel sind, um das Nitrifikationspotential der Nitrifikanten in den Biofiltern zu beurteilen.

Wie die Aktivitätstests wurden auch die Hemmtests in AOB- und NOB-Tests unterteilt. In vielen Versuchen zur Nitrifikation in Aquakulturanlagen wird lediglich die Ammoniumkonzentration eingestellt und der Nitritabbau als dem Ammoniumabbau nachgeschaltet beobachtet (z.B. Lekang und Kleppe, 2000). Durch die Trennung der Nitrifikantengruppen wurde deutlich, dass die NOB ein bis zu dreimal so großes Nitrifikationspotential entwickeln können als die AOB im gleichen Filter und dass sie verzögerter auf einen Belastungsabfall und –anstieg reagieren.

In den Aktivitätstests waren die Abbauraten der weißen FK jeweils höher als die der schwarzen. Dieser (obgleich nicht signifikante) Unterschied zwischen den baugleichen weißen und recycelten FK kann nur durch die unterschiedlichen Kunststoffarten erklärt werden, da beide FK-Typen die gleiche Oberfläche aufweisen und die helle Farbe der nicht-recycelten FK eher eine Hemmung durch Licht verursachen würde als es bei den recycelten schwarzen FK der Fall wäre.

Auf der anderen Seite hatte das weiße HDPE-Granulat, aus dem die weißen FK hergestellt werden, in den Hemmtests stets eine weitaus größere Hemmwirkung auf die Nitrifikation als das recycelte HDPE-Granulat.

Auch der Aktivitätstest, in dem neue und gebrauchte FK der beiden Typen nach Inkubation in einem Hemmtest untersucht wurden, zeigte, dass sich entweder mehr Nitrifikanten auf den recycelten FK angesiedelt hatten, oder dass die Nitrifikanten auf den weißen FK gehemmt wurden. Der Unterschied in diesem Aktivitätstest fand sich jedoch nur bei den weißen neuen FK, nicht jedoch bei den bereits gebrauchten und gesäuberten weißen FK.

Nach einem Anheftungsversuch an der Uni Duisburg wurden fast dreimal so viele Zellen von *Nitrosomonas marina* strain 22 auf der selbst hergestellten Folie aus weißem HDPE-Granulat gezählt als auf der Folie aus recyceltem Granulat. Hier müssen allerdings auch noch die Ergebnisse aus dem nachfolgendem Aktivitätstest abgewartet werden. Einige der soeben genannten Versuche wurden nur einmal ausgeführt. Weitere Daten müssen die bisherigen Ergebnisse bestätigen.

Außer bei dem weißem und schwarzem HDPE gab es auch bei den anderen Kunststoffen Unterschiede in der Rangfolge der Anheftung und der Hemmwirkung.

An die werksfertige Folie PP recycelt plus Talkum (20%) zum Beispiel hatten sich in den ersten Versuchen im Vergleich zur PP-Folie mit Glasfaser (20%) und zu allen selbst hergestellten Folien die meisten Bakterien geheftet. In den Hemmtests wurde diese Folie nur in einem Vergleich mit ebenfalls werksfertiger PP-Folie (100%) eingesetzt und zeigte dort eine etwas stärkere Hemmwirkung als die weiße PP-Folie. Für die Hemmtests mit Granulaten stand nur ein recyceltes PP mit 70% Talkum zu Verfügung, das eigentlich zur Vermischung mit anderen Kunststoffen hergestellt wurde.

Das Granulat aus recyceltem PP und Glasfaser hemmte in den Granulat-Tests am wenigsten, in dem Anheftungsversuch jedoch schaffte es nur Platz drei mit großem Abstand zu PP recycelt plus Talkum und HDPE weiß.

Das HDPE mit der Trinkwasserzulassung allerdings war in allen Tests jeweils das Schlusslicht. Um eine Kontaminierung von Trinkwasser mit Bakterien zu verhindern, wurde diesem Kunststoff anscheinend ein effektives Biozid zugefügt.

Da die Hemmversuche in großer Zahl durchgeführt wurden, dürfte folgendes Ergebnis daraus gesichert sein: Nitrifikation wird im Beisein von verschiedenen Kunststoff-Granulaten unterschiedlich stark gehemmt. Möglicherweise jedoch beschleunigen hemmende Stoffe im Medium die Anheftung der Bakterien, da sie im Biofilmen geschützt sind als frei schwimmende Zellen (Stehr et al., 1995).

Unterschiede in der Wirkung der Kunststoffe auf das Verhalten der Bakterien könnten auch auf die verschiedenen Behandlungen der Kunststoffe zurückzuführen sein. In den oben genannten Versuchen wurden Granulate, extrudierte FK und erhitzte und geformte Folien aus Granulat eingesetzt. Möglicherweise verändert sich durch diese physikalischen Behandlungen das Migrationsverhalten von Stoffen aus den Kunststoffen. Weiterhin könnte die unterschiedliche Beschaffenheit der Oberfläche für die Anheftung von Bedeutung sein. Die AFM-Aufnahmen (Ausschnitt von 100 x 100 µm) der selbst hergestellten Folien aus HDPE weiß und - recycelt lassen jedoch keine Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit erkennen. Die Oberflächen der FK (Ausschnitt von 10 x 10 µm) scheinen sich eher zu unterscheiden.

Um die Anwendbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten wären natürlich Tests mit vielen fabrikfertigen FK aus unterschiedlichen Kunststoffen und Zuschlagsstoffen wünschenswert. Da eine Produktion einer Charge von FK jedoch sehr teuer ist, müssen wir versuchen, mit den vorhandenen Materialien und Versuchen zu einem Ergebnis zu kommen, welches, im besten Fall, zur Produktion eines neuen FK führt. Insgesamt sind also noch viele weitere Tests erforderlich und bereits in der Durchführung. Die Anheftungsversuche in Duisburg werden auch mit Nitrit-oxidierenden Bakterien wiederholt. Dazu werden von der Firma GEA 2H Water Technologies extrudierte Folien mit Zuschlagsstoffen zur Verfügung gestellt. Diese können dann in den Hemmtests eingesetzt werden, um eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten. Die Hemmtests werden weiter variiert, zum Teil mit Reinkulturen und verschiedenen Kunststoffkonzentrationen und mehr Aktivitätstests nach vorherigen Anheftungsphasen sind geplant.

Die Aktivitätstests mit verschiedenen Nitratkonzentrationen haben gezeigt, dass die Aktivität zumindest der Nitrit-oxidierenden Bakterien auf den FK durch Konzentrationen von bereits 1,5 mM Nitrat eingeschränkt wird. Dieser Wert wird nicht selten in RAS überschritten. Um diesen Punkt genauer zu analysieren und vor allem für Werte um Werte für Ammoniak-oxidierende Bakterien zu erhalten, sollen diese Versuche fortgeführt werden. Für die Überprüfung einer Hemmwirkung von Biofilterwasser könnte das Wasser der Anlage der GMA in Büsum in Betracht

gezogen werden. Diese wird momentan angefahren und weist daher noch einen geringen Nitratgehalt auf, der im Laufe des Betriebes steigen wird. Durch Nitrat-Hemmtests in gewissen Abständen könnte deutlicher werden, ob das Nitrat oder andere Komponenten im Biofilterwasser für eine Herabsetzung der nitrifizierenden Aktivitäten verantwortlich sind.

Um die hohen Nitratkonzentrationen in den Anlagen wieder loszuwerden, wurde der Einbau von Denitrifikationsstufen diskutiert. Versuche zur Denitrifikationskapazität der FK aus den Anlagen Büsum und Strande ergaben, dass denitrifizierende Bakterien in beiden Anlagen in genügend hoher Zellzahl vorhanden sind. Je nach Belastung kann sogar die C-Quelle im Biofilterwasser für eine vollständige Denitrifikation ausreichen. Die Füllkörper wurden als C-Quelle ausgeschlossen.

Die bisherige Charakterisierung der Mikroorganismen durch verschiedene Methoden zeigte, dass *Nitrospira* in den untersuchten Habitaten eine zentrale Rolle übernimmt. In Strande und auch in Büsum sind sie durch mehrere Arten vertreten, was durch die Fettsäureanalytik bestätigt wurde. Durch diese Methodik konnten auch die Anteile von *Nitrospira* an den Gesamt-Fettsäuren der Proben von den FK aus den Filtern ermittelt werden. Diese liegen in Büsum bei 6-8% und in Strande bei 3-7%. Die Gattung *Nitrospira* leistet einen wichtigen Beitrag in der Ökologie, was die Charakterisierung dieser Art unerlässlich macht. Die Isolierung eines Stamms aus der Anlage in Büsum ist bereits geglückt, Anreicherungen aus Strande werden dahingehend bearbeitet.

Bei den Ammoniak-oxidierenden Bakterien handelt es sich in beiden Anlagen überwiegend um *Nitrosomonas*-Arten (Verwandte von *Nm marina* bzw. *Nm aestuarii*). Ob weitere Gattungen wie *Nitrosospira* oder *Nitrosococcus* von Bedeutung bzw. überhaupt vorhanden sind, muss noch weiter untersucht werden. Gleiches gilt für die Archaeen. Hier sind nahe Verwandte des *Candidatus Nitrosopumilus maritimus* in den Biofiltern detektiert worden, jedoch dürften die hohen Substratkonzentrationen in den Anlagen verhindern, dass dieses Ammoniak-oxidierende Archaeon eine ähnlich wichtige Rolle wie im Ozean spielt.

Durch die Beutel, die in den Biofilter der Shrimps-Anlage in Büsum gehängt wurden, konnte durch regelmäßige Probennahmen die Steigerung der Aktivitäten der FK darin verfolgt werden. Auch wurde mittels molekularbiologischen Methoden versucht, die Erstbesiedler zu identifizieren. Bei der doch recht schnellen Zunahme der Aktivität (obgleich ungünstigerweise die Fütterung der Anlage eingestellt wurde und der Biofilter nicht mehr belastet wurde), fanden sich nach nur zwei Wochen Vertreter der Gattung *Nitrospira* auf den FK aus den Beuteln. Es ist zu beachten, dass dieser Versuch nichts mit der Start-Phase eines Biofilters zu tun hat. Daher laufen Besiedlung und Aktivitätssteigerung sehr schnell ab. Durch die Zusammenarbeit mit der GMA (Gesellschaft für marine Aquakultur mbH) in Büsum, die gerade erst Biofilter anlaufen lässt, können wir auch eine Start-Phase begleiten. Es werden bereits regelmäßig Proben genommen.

Bei der Optimierung der Betriebsparameter wurden Vorversuche mit verschiedenen Sauerstoffkonzentrationen durchgeführt. Es konnte durch die Art des Versuchsaufbaus aber nicht geklärt werden, inwieweit eine Absenkung der Sauerstoffkonzentration in den Biofiltern ohne Beeinträchtigung der Nitrifikation stattfinden kann, da in den Versuchsflaschen infolge der Nitrifikation eine starke Sauerstoffzehrung stattfand. Generell kommen Nitrifikanten mit viel geringeren

Sauerstoffkonzentrationen aus, als die in den Anlagen vorherrschenden. Darüber hinaus ist besonders *Nitrospira* im Labormaßstab empfindlich gegenüber starkem Rühren. Aus diesem Grund kann über eine geringere Lufteinströmung in die Biofilter nachgedacht werden, wobei eine gewisse Scherkraft immer vorhanden sein sollte. Da diese Thematik von großem Interesse ist, weil durch weniger Lufteinströmung Energie gespart werden kann, sollte diese Fragestellung auf jeden Fall weiterbearbeitet werden.

Literaturverzeichnis

- 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.** 2007. Diversität Nitrit oxidierender Bakterien in Böden des nordsibirischen Permafrostes und Sedimenten der Laptev-See. Diss Univ Hamburg.
- Aleem MIH, Alexander M.** 1960. Nutrition and physiology of *Nitrobacter agilis*. *Appl Microbiol* 8: 80-84.
- Al-Halbouni D, Traber J, Lyko S, Wintgens T, Melin T, Tacke D, Janot A, Dott W, Hollender J.** 2008. Correlation of EPS content in activated sludge at different sludge retention times with membrane fouling phenomena. *Water Res* 42: 1475-1488.
- Ballinger SJ, Head IM, Curtis TP, Godley AR.** 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.
- Beth S.** 2007. Biotechnologische Optimierung von Biofiltern im moving-bed Verfahren für die Meerwasseraquakultur. Diplomarbeit, FH Flensburg.
- Boland T, Latour RA, Stutzenberger FJ.** 2000. Molecular basis of bacterial adhesion. In: Yuehuei H & Friedman RJ (eds.) *Handbook of bacterial adhesion*: 29- 42.
- Brown RL.** 1971. Removal of Nitrate by an Algal System. *Water Poll Control Res Series*, Dept Water Resources, California.
- Burrell PC, Phalen CM, Hovanec TA.** 2001. Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria. *Appl Environ Microbiol* 67: 5791-5800.
- Butt WD, Lees H.** 1960. The biochemistry of the nitrifying organisms. *Biochem J* 76: 423-427.
- Camargo JA, Alonso A, Salamanca A.** 2005. Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates. *Chemosphere* 58 (9): 1255-1267
- Carmignani GM, Bennett JP.** 1977. Rapid start-up of a biological filter in a closed aquaculture system. *Aquaculture* 11: 85-88.
- Cavalli RO, Wasielesky W, Franco CS, Mirando K.** 1996. Evaluation of the short-term toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to *Peneaus paulensis* (Crustacea, Decapoda) broodstock. *Arq Biol Technol* 39: 567-575.
- Daims H, Nielsen P, Nielsen JL, Juretschko S, Wagner M.** 2000. Novel *Nitrospira*-like bacteria as dominant nitriteoxidizers in biofilms from wastewater treatment plants: diversity and in situ-physiology. *Water Sci Technol* 41: 85-90.
- Degrange V, Bardin R.** 1995. Detection and counting of *Nitrobacter* populations in soil by PCR. *Appl Environ Microbiol* 6: 2093-2098.
- DeLong EF.** 1992. Archaea in coastal marine environments. *Prot Natl Acad Sci USA* 89: 5685-5689.
- Diab S, Shilo M.** 1988. Effect of adhesion to particles on the survival and activity of *Nitrosomonas* sp and *Nitrobacter* sp. *Arch Microbiol* 150: 387-393.
- Dunne WM.** 2002. Bacterial Adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin Microbiol Rev* Apr: 155-166.
- Egli K, Fanger U, Alvarez PJ, Siegrist H, van der Meer JR, Zehnder AJ.** 2001. Enrichment and characterization of an anammox bacterium from a rotating biological contactor treating ammonium-rich leachate. *Arch Microbiol* 175:198-207.
- 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.** 2007. The State of World Fisheries and Aquaculture 2006. Rom, Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
- Fdz-Polanco F, Méndez E, Urueña MA, Villaverde S, Garcia PA.** 2000. Spatial distribution of heterotrophs and nitrifiers in a submerged biofilter for nitrification. *Wat Res* 34: 4081-4089.

- Fletcher M.** 1996. Bacterial attachment in aquatic environments: A diversity of surfaces and adhesion strategies. In: Fletcher M (ed.) Bacterial adhesion – molecular and ecological diversity. Wiley-Liss, NY: 1-24.
- Foesel BU.** 2007. Mikrobiologie der Stickstoffentfernung in den Biofiltern einer marinen Aquakultur mit geschlossenem Wasserkreislauf. Dissertation, Univers. Bayreuth.
- Foesel, BU, Gieseke A, Schwermer C, Stief P, Koch L, Cytryn E, de la Torre JR, van Rijn J, Minz D, Drake HL, Schramm A.** 2007. *Nitrosomonas* Nm143-like ammonia oxidizers and *Nitrospira marina*-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm. FEMS Microbiology Ecology 63 (2): 192-204.
- Francis, CA, Roberts KJ, Beman JM, Santoro AE, Oakley BB.** 2005. Ubiquity and diversity of ammonia-oxidizing archaea in water columns and sediments of the ocean. PNAS 102 (41): 14683-14688.
- Furumai H, Rittmann BE.** 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.
- Gould GW, Lees H.** 1960. The isolation and culture of the nitrifying organisms. Part 1. *Nitrobacter*. Can J Microbiol 6: 399-407.
- 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.
- Hatzenpichler RE, Lebedeva EV, Spieck E, Stoecker K, Richter A, Daims H, Wagner M.** 2008. A moderately thermophilic ammonia-oxidizing crenarchaeote from a hot spring. Proc Natl Acad Sci USA 105 (6): 2134-2139.
- Horowitz A, Samocha TM, Gandy RL, 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 TA, Delong EF.** 1996. Comparative analysis of nitrifying bacteria associated with freshwater and marine aquaria. Appl Environ Microbiol 62: 2888-2896.
- Hovanec TA, Taylor LT, Blakis A, Delong EF.** 1998. *Nitrospira*-like bacteria associated with nitrite oxidation in freshwater aquaria. Appl Environ Microbiol 64: 258-264.
- Hunze, M.** 2005. Simulation in der kommunalen Abwasserreinigung. Oldenbourg Industrieverlag. ISBN 978-3-8356-3073-4.
- Hutchinson W, Jeffrey M, O'Sullivan D, Casement D, Clarke S.** 2004. Recirculating Aquaculture Systems Minimum Standards for Design, Constructions and Management. Prepared for the Inland Aquaculture Association of South Australia Inc.
- 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.
- Keen GA, Prosser JI.** 1987. Interrelationship between pH and surface growth of *Nitrobacter*. Soil Biol Biochem 19: 665-672.
- Kim YH, Cho JH, Lee YW, Lee WK.** 1997. Development of a carrier for adhesion of nitrifying bacteria using a thermodynamic approach. Biotechnol Tech 11(11): 773-776.
- Kloep F, Röske I, Neu TR.** 2000. Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor. Water Research 34 (1): 311-319.
- Knief C, Lipski A, Dunfield PF.** 2003. Diversity and Activity of Methanotrophic Bacteria in Different Upland Soils. Appl Environ Microbiol 69: 6703-6714.
- Kobayashi M, Matsuo Y, Takimoto A, Suzuki S, Maruo F, Shoun H.** 1996. Denitrification, a novel type of respiratory metabolism in fungal mitochondrion. J Biol Chem 271: 16263-16267.
- Kowalchuk GA, Stephen JR, de Boer W, Prosser JI, Emberly TM, Woldendorp JW.** 1997. Analysis of ammonia oxidizing bacteria of the β subdivision of the class Proteobacteria in coastal sand dunes by denaturing gradient gel electrophoresis and sequencing of PCR-amplified 16S ribosomal DNA fragments. Appl Environ Microbiol 63 : 1489–1497.
- Lane DJ.** 1991. 16S/23S rRNA sequencing. In: E. Stackebrandt and M. Goodfellow (ed.), Nucleic acid techniques in bacterial systematics. John Wiley & Sons Ltd., London: 115–175.
- Larsen P, Nielsen JL, Svendsen TC, Nielsen PH.** 2008a. Adhesion characteristics of nitrifying bacteria in activated sludge. Water Res 42: 2814-2826.

- Larsen P, Nielsen JL, Otzen D, Nielsen PH.** 2008b. Amyloid-like adhesins produced by floc-forming and filamentous bacteria in activated sludge. *Appl Environ Microbiol* 74 (5): 1517-1526.
- Lebedeva EV, 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.
- Ling J, Chen S.** 2005. Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters. *Aquacult Eng* 33 (2): 150-162.
- Lipski A, Altendorf K.** 1997. Identification of heterotrophic bacteria isolated from ammonia-supplied experimental biofilters. *System Appl Microbiol* 20: 448-457.
- Lipski A, Spieck E, Makolla A, Altendorf K.** 2001. Fatty acid profiles of nitrite-oxidizing bacteria reflect their phylogenetic heterogeneity. *System Appl Microbiol* 24: 377-384.
- Losordo TM, Hobbs AO.** 2000. Using computer spreadsheets for water flow and biofilter sizing in recirculating aquaculture production systems. *Aquacult Eng* 23: 95-102.
- Mangold S, Harneit K, Rohwerder T, Claus G, Sand W.** 2008. Novel combination of atomic force microscopy and epifluorescence microscopy for visualization of leaching bacteria on pyrite. *Appl Environ Microbiol* 74 (2): 410-415.
- Manser R, Gujer W, Siegrist H.** 2005. Consequences of mass transfer effects on the kinetics of nitrifiers. *Water research* 39 (19): 4633-42.
- Marshall K.** 1996. Adhesion as a strategy for access to nutrients. In: Fletcher M (ed.) *Bacterial adhesion – molecular and ecological diversity*. Wiley-Liss, NY: 59-87.
- McCarty PL, Beck L, St.Amant P.** 1969. Biological denitrification of wastewaters by addition of organic materials. In: *Proceedings of the 24th Industrial Waste Conference*. Purdue University, Lafayette, Indiana: 1271-1285.
- Mobarry BK, Wagner M, Urbain V, Rittmann BE, Stahl DA.** 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. Microbiol Ecol Manual* 3.4.4: 1-27.
- 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.
- Park H-D, Whang L-M, Reusser, S R, Noguera DR.** 2006. Taking Advantage of Aerated-Anoxic Operation in a Full-Scale University of Cape Town Process. *Water Environment Research* 78 (6): 637-642
- Park H-D, und Noguera DR.** 2008. *Nitrospira* community composition in nitrifying reactors operated with two different dissolved oxygen levels. *Journ Microbiol Biotechnol* 18 (8): 1470-1474.
- Rotthauwe JH, Witzel KP, Liesack W.** 1997. The ammonia monooxygenase structural gene *amoA* as a functional marker: molecular fine-scale analysis of natural ammonia-oxidizing populations. *Appl Environ Microbiol* 63 (12): 4704-12.
- Sasser M.** 1990. Identification of bacteria through fatty acids analysis. In: *Methods on Phytobacteriology*. Klement Z, Rudolph K, Sands DC (eds). Budapest, Hungary. Akademiai Kiado: 199-204.
- Schmidt EL, Belser LW.** 1982. Nitrifying bacteria. In *Methods of soil analysis properties*. Miller, RH, Keeney DR, (eds). Madison: Am Soc Agron: 1027-1042.
- Schramm A, Beer D, van den Heuvel JC, 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.
- Schulz C, Herbst R, Langensiepen M, Ulrichs C.** (2005). Herausforderungen einer umweltgerechten Aquakultur. *Humboldt Spektrum* 1-2005 : 42 - 48.

- Scott G und Crunkilton RL.** 2000. Acute and chronic toxicity of nitrate to fathead minnows (*Pimephales promelas*), *Ceriodaphnia dubia*, and *Daphina magna*. *Appl Environ Toxicol Chem* 19: 2918-22.
- Sekoulov I.** 1988. Biofilmverfahren. In: Rheinheimer G, Hegemann W, Raff J, Sekoulov I (Eds). 1988. Stickstoffkreislauf im Wasser. R.Oldenbourg Verlag München: 246-247.
- Slieckers AO, Haijjer SCM, Stafsnes MH, Kuenen JG, Jetten MSM.** 2005. Competition and coexistence of aerobic ammonium and nitrite-oxidizing bacteria at low oxygen concentrations. *Appl Microbiol Technol* 68: 808-817.
- Stehr G, Zörner S, Koops HP.** 1995. Exopolymers: An Ecological Characteristic of a Floc-Attached, Ammonia-Oxidizing Bacterium. *Microbiol Ecol*, 30:115-126.
- Strous M, Gijs Kuenen J, Jetten MSM.** 1999. Key Physiology of Anaerobic Ammonium Oxidation. *Appl Environ Microbiol* 65 (7): 3248-3250.
- 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 JEM, Schreier SB, Sower KR, Schreier HJ.** 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.
- Teixera P, Azeredo J, Oliveira R, Chibowski E.** 1998a. Interfacial interactions between nitrifying bacteria and mineral carriers in aqueous media determined by contact angle measurements and thin layer wicking. *Coll Surf B: Biointerfaces* 12: 69-75.
- Teixera P, Oliveira R.** 1998b. The importance of surface properties in the selection of supports for nitrification in airlift bioreactors. *Bioproc Engin* 19: 143-147.
- Terada A, Yamamoto T, Hibiya K, Tsenuda S, Hirata A.** 2004. Enhancement of biofilm formation onto surface-modified hollow-fiber membranes and its application to a membrane-aerated biofilm reactor. *Water Sci Technol* 49 (11-12): 263-268.
- Tilak KS, Lakshimi SJ, Susan TA.** 2002. The toxicity of ammonia, nitrite and nitrate to the fish, *Catla catla* (Hamilton). *J Environ Biol* 23: 147-149.
- Van RijnJ.** 1996. The potential for integrated biological treatment systems in recirculating fish culture. *Aquaculture* 139: 181–201
- Verhagen FJ, Laanbroek HJ.** 1991. Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats. *Appl Environ Microbiol* 57: 3255-3263.
- Wanner O, Gujer E.** 1985. Competition in biofilms. *Water Sci Technol* 17: 27-44.
- Watson SW.** 1965. Characteristics of a marine nitrifying bacterium, *Nitrosocystis oceanus* sp. n. *Limnol Oceanogr* 10 (suppl): R274-R289.
- Watson SW, Bock E, Valois FW, Waterbury JB, Schlosser U.** 1986. *Nitrospira marina* gen. nov. sp. nov.: a chemolithotrophic nitrite-oxidizing bacterium. *Arch Microbiol* 144: 1-7.
- Wuchter C, Abbas B, Coolen MJL, Herford L, van Bleijswijk J, Timmers P, Strous M, Teira E, Herndl GJ, Middelburg JJ, Schouten S, Damste JSS.** 2006. Archaeal nitrification in the ocean. *Proc Natl Acad Sci USA* 103(33): 12317–12322.
- Zumft WG.** 1992. The denitrifying prokaryotes. In: Balows A, Trüper HG, Dworkin M, Harder W and Schleifer K-H (eds.). *The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, identification, applications.* 2nd edition (1). Springer- Verlag, New York: 554-582.
- Zumft WG.** 1997. Cell biology and molecular basis of denitrification. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 533-616.