

**Einfluss der Temperatur
auf die Ammoniakoxidantenpopulation eines
Biofilmreaktors und auf Reinkulturen von
*Nitrosomonas eutropha***

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Biologie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Simone Wiegel

aus Gödenstorf
(Landkreis Harburg)

Hamburg 2002

Genehmigt vom
Fachbereich Biologie der
Universität Hamburg
auf Antrag von Herrn Professor Dr. E. BOCK

Weitere Gutachter der Dissertation:
Herr Priv.-Doz. Dr. W. Sand

Tag der Disputation: 21. Juni 2002

Hamburg, den 31. Mai 2002



A handwritten signature in black ink, which appears to read "Udo Wienand".

Professor Dr. U. Wienand
Dekan

1	ZUSAMMENFASSUNG	1
----------	------------------------	----------

2	EINLEITUNG	3
----------	-------------------	----------

2.1	NITRIFIKATION	4
2.2	NITRIFIKATION VON ZENTRAT IN HAMBURG	5
2.3	BIOFILM	6
2.4	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DAS WACHSTUM	7
2.5	TEMPERATURABHÄNGIGKEIT DER NITRIFIKATION	7
2.6	STRESSPROTEINE	9
2.7	FUNKTION DES HSP70-CHAPERON- UND DES CHAPERONINSYSTEMS	11
2.8	REGULATION DER STRESSANTWORT	12
2.9	THERMOTOLERANZ	13
2.10	STRESSPROTEINE BEI AMMONIAK OXIDIERENDEN BAKTERIEN	13
2.11	PROBLEMSTELLUNG	14

3	MATERIAL UND METHODEN	15
----------	------------------------------	-----------

3.1	BAKTERIENSTÄMME	15
3.2	NÄHRMEDIEN	16
3.3	KULTURFÜHRUNG	17
3.3.1	STAMMKULTUREN	17
3.3.2	ZWISCHENKULTUREN	17
3.3.3	MASSENANZUCHT	17
3.4	REINHEITSKONTROLLE	17
3.5	ERNTEN VON BAKTERIENZELLEN	18
3.6	UNTERSUCHUNGEN DES NITRIFIKATIONSREAKTORS DER PILOTANLAGE	19
3.6.1	BESCHREIBUNG DES SYSTEMS	19
3.6.2	BETRIEBSPARAMETER VON NITRIFIKATIONSSTUFEN KOMMUNALER KLÄRANLAGEN	20
3.6.3	PROBENTRANSPORT UND -BEHANDLUNG	21
3.7	FIXIERUNG VON ZELLEN UND STANDORTPROBEN	21
3.8	ANALYTISCHE NACHWEISMETHODEN	21
3.8.1	BESTIMMUNG VON TEMPERATUR, SAUERSTOFF UND pH-WERT	21
3.8.2	BESTIMMUNG VON AMMONIUM	22
3.8.3	BESTIMMUNG VON NITRIT	22
3.8.4	BESTIMMUNG VON NITRAT	23
3.8.5	BESTIMMUNG VON PROTEIN (BIOFILM)	23
3.8.6	BESTIMMUNG VON PROTEIN (REINKULTUREN)	25
3.8.7	BESTIMMUNG VON KOHLENHYDRATEN	26
3.9	BESTIMMUNG DER ZELLZAHL	26
3.9.1	BESTIMMUNG DER GESAMTZELLZAHL VON ZELLSUSPENSIONEN	26
3.9.2	BESTIMMUNG DER ZAHL VERMEHRUNGSFÄHIGER AMMONIAKOXIDANTEN	26

3.9.3	BESTIMMUNG DER IF-ZELLZAHL VON AMMONIAKOXIDANTEN IM BIOFILM	27
3.10	MIKROSKOPISCHE UNTERSUCHUNGEN	29
3.10.1	LICHTMIKROSKOPIE	29
3.10.2	EPIFLUORESCENZMIKROSKOPIE NACH DAPI-FÄRBUNG	29
3.10.3	BESTIMMUNG RESPIRATIONSAKTIVER ZELLEN	29
3.10.4	PHASENKONTRASTMIKROSKOPIE	30
3.10.5	MIKROSKOPISCHE AUSWERTUNG	30
3.10.6	DOKUMENTATION MIKROSKOPISCHER PRÄPARATE	30
3.10.7	ERMITTLUNG DER ZELLGRÖßE	30
3.11	ISOLIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON AMMONIAKOXIDANTEN	30
3.11.1	ISOLIERUNG AUS DEM BIOFILM DES PILOTREAKTORS	30
3.11.2	SEROLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG	31
3.12	NITRITBILDUNG VON BIOFILMMATERIAL	31
3.12.1	BESTIMMUNG DES NITRIFIKATIONSPOTENTIALS	31
3.12.2	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE NITRITBILDUNG	31
3.13	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF NITROSOMONAS EUTROPHA (NM 14)	32
3.14	INDUKTION VON THERMOTOLERANZ	33
3.15	CHARAKTERISIERUNG DER STRESSREAKTION	34
3.15.1	INDUKTION VON STRESSPROTEINEN	34
3.15.2	HERSTELLUNG ZELLFREIER EXTRAKTE	34
3.15.3	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (PAGE)	34
3.15.4	FÄRBUNG VON GELEN	36
3.15.5	WESTERN-BLOTTING	37
3.15.6	DOKUMENTATION VON POLYACRYLAMIDGELEN UND BLOTMEMBRANEN	39
3.16	BERECHNUNGEN	40

4 ERGEBNISSE **43**

4.1	NITRIFIKATION IN DER PILOTANLAGE	43
4.1.1	BIOFILMBILDUNG	43
4.1.2	CHARAKTERISIERUNG DER BETRIEBSBEDINGUNGEN	45
4.1.3	BIOFILMMENGE UND -ZUSAMMENSETZUNG	47
4.1.4	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE NITRIFIKATION	49
4.1.5	ZAHLE DER AMMONIAKOXIDANTEN IM BIOFILM	52
4.1.6	TEMPERATURPROFIL VON BIOFILMMATERIAL	53
4.1.7	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE NITRITBILDUNG VON BIOFILMMATERIAL	54
4.1.8	EINFLUSS VON TEMPERATURSCHWANKUNGEN AUF DIE NITRITBILDUNG VON BIOFILMMATERIAL	56
4.1.9	CHARAKTERISIERUNG DER AMMONIAKOXIDANTENPOPULATION	58
4.2	DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF NITROSOMONAS EUTROPHA (NM 14) IN KURZZEITVERSUCHEN	62
4.2.1	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE NITRITBILDUNG	62
4.2.2	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DAS WACHSTUM	63
4.2.3	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE ZELLVERMEHRUNG	64

4.3	DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF NITROSOMONAS EUTROPHA (NM 14) IN VERSUCHEN VON 24 STUNDEN DAUER	65
4.3.1	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE ZELLMORPHOLOGIE	65
4.3.2	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE SPEZIFISCHE AKTIVITÄT, DEN ZELLERTRAGSKOEFFIZIENT UND DEN NUTZEFFEKT	67
4.4	DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF NITROSOMONAS EUTROPHA (NM 14) IN MEHRTÄGIGEN VERSUCHEN	68
4.4.1	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE NITRITBILDUNG	69
4.4.2	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF PROTEINGEHALT UND GESAMTZELLZAHL	71
4.4.3	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE MPN-ZELLZAHL	73
4.5	AUSWIRKUNGEN VON HITZESTRESS AUF NITROSOMONAS EUTROPHA	77
4.5.1	NACHWEIS EINER STRESSANTWORT	77
4.5.2	IDENTIFIKATION VON STRESSPROTEINEN	78
4.5.3	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE KONZENTRATION DER STRESSPROTEINE	79
4.5.4	INDUKTIONSVERLAUF VON STRESSPROTEINEN	81
4.5.5	THERMOTOLERANZ	84
4.5.6	FUNKTION VON STRESSPROTEINEN	85
4.6	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE AMMONIAKMONOOXYGENASE	86
5	DISKUSSION	89
5.1	NITRIFIKATION IN DER PILOTANLAGE	89
5.1.1	STICKSTOFFELIMINATION AUS ABWASSER MIT HOHEN AMMONIUMKONZENTRATIONEN	89
5.1.2	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE NITRIFIKATION DER PILOTANLAGE	91
5.2	DER EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF NITROSOMONAS EUTROPHA (NM 14)	93
5.2.1	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF WACHSTUM, AKTIVITÄT UND NUTZEFFEKT	93
5.2.2	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE ZELLMORPHOLOGIE	95
5.2.3	STRESSANTWORT BEI NITROSOMONAS EUTROPHA	95
5.2.4	EINFLUSS DER TEMPERATUR AUF DIE AMMONIAKMONOOXYGENASE	98
6	LITERATUR	101

1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss der Temperatur auf die Ammoniakoxidantenpopulation eines Abstromfließbettreaktors auf dem Klärwerk Köhlbrandhöft/Dradenau in Hamburg untersucht. Dieser Biofilmreaktor wurde in den Jahren 1995-1997 als Nitrifikationsstufe einer halbtechnischen Pilotanlage zur Stickstoffelimination aus dem Zentrat der Faulschlammentwässerung betrieben. Als Trägermaterial wurde kugelförmiges, geschäumtes Polystyrol verwendet. Die Nitrifikation sollte bei hohen Ammoniumkonzentrationen (ca. 10-50 mM) und hoher Betriebstemperatur ($>30\text{ }^{\circ}\text{C}$) ablaufen. Die Reaktortemperatur betrug in den Wintermonaten im Mittel $30\text{ }^{\circ}\text{C} - 35\text{ }^{\circ}\text{C}$, während sie bei hochsommerlichen Außentemperaturen auf $37\text{ }^{\circ}\text{C} - 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ stieg.

Beim Betrieb des Nitrifikationsreaktors konnte keine Abhängigkeit der Umsatzleistung der Anlage von der Betriebstemperatur festgestellt werden. Das im Labor ermittelte Nitrifikationspotential von Biofilmmaterial zeigte dagegen große, temperaturabhängige Schwankungen. Bei Betriebstemperaturen von $30\text{ }^{\circ}\text{C} - 35\text{ }^{\circ}\text{C}$ war das Nitrifikationspotential 2-4fach höher als die Umsatzleistung der Anlage und stellte somit eine Leistungsreserve dar. Bei Betriebstemperaturen von $37\text{ }^{\circ}\text{C} - 42\text{ }^{\circ}\text{C}$ war das Nitrifikationspotential jedoch bis zu 75 % reduziert und lag auf der Höhe der Umsatzleistung des Reaktors, die Leistungsreserve war nicht mehr vorhanden. Die hohen Temperaturen führten auch zu einer Abnahme der MPN-Zellzahl Ammoniak oxidierender Bakterien im Biofilm um 2-4 Zehnerpotenzen.

Die Biofilmpopulation hatte ein Aktivitätsoptimum von $28\text{ }^{\circ}\text{C} - 33\text{ }^{\circ}\text{C}$. Durch Temperaturen von $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ war die Aktivität nach 4 bzw. 2 Tagen vollständig gehemmt. Thermophile bzw. thermotolerante Stämme Ammoniak oxidierender Bakterien konnten in Biofilmmaterial nicht nachgewiesen werden.

Mit Hilfe der Immunofluoreszenzmethode wurde die Zusammensetzung der Population Ammoniak oxidierender Bakterien im Biofilm untersucht. Dabei wurden neun Stämme Ammoniak oxidierender Bakterien der Gattung *Nitrosomonas* nachgewiesen. *Nitrosomonas eutropha* Nm 14, ein an hohe Ammoniumkonzentrationen adaptierter Abwasserstamm, und das Eigenisolat *Nitrosomonas spec.* NmN1 wiesen die höchsten Zellzahlen auf. Wegen seines hohen Anteils an der Biofilmpopulation wurde *Nitrosomonas eutropha* Nm 14 für die anschließenden Laboruntersuchungen ausgewählt.

In Versuchen mit Reinkulturen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) war der Einfluss superoptimaler Temperaturen auf den Stoffwechsel dieses Bakteriums sowohl von der Höhe der Temperatur als auch von ihrer Einwirkungsdauer abhängig.

In Kurzzeitversuchen (8 h) waren die Aktivität der Zellen durch Temperaturen von $33\text{ }^{\circ}\text{C} - 42\text{ }^{\circ}\text{C}$, das Wachstum durch Temperaturen von $33\text{ }^{\circ}\text{C} - 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ und die Zellteilung lediglich bei $33\text{ }^{\circ}\text{C}$ gegenüber einer Kontrolle bei $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ gefördert.

Bei 24stündiger Inkubation war die spezifische Aktivität von *Nitrosomonas eutropha* durch Temperaturen von $28\text{ }^{\circ}\text{C} - 40\text{ }^{\circ}\text{C}$ wenig beeinflusst. Nur bei $43\text{ }^{\circ}\text{C}$ war sie deutlich herabgesetzt. Zellertragskoeffizient und Nutzeffekt nahmen dagegen mit steigender Temperatur stark ab.

Bei einwöchiger Inkubation bei Temperaturen von 37 °C – 43 °C wurden Nitritbildung, Proteinsynthese und Zellteilung im Versuchsverlauf zunehmend herabgesetzt, bis diese Prozesse vollständig gehemmt waren. Dabei wurden Wachstum und Vermehrung jeweils bereits nach kürzerer Inkubationszeit gehemmt als die Aktivität.

Temperaturen von 37 °C - 43 °C waren für *Nitrosomonas eutropha* letal. Absterbekurven waren zu Beginn der Inkubation durch eine sogenannte Schulter charakterisiert, auf die eine exponentielle Absterbephase folgte. Die Absterberate nahm mit steigender Temperatur zu, während die Länge der Schulter abnahm. Eine wichtige Ausnahme stellte jedoch die Inkubationstemperatur von 38 °C dar, bei der die Schulter mit 105 Stunden besonders ausgeprägt war.

Nitrosomonas eutropha (Nm 14) zeigte bei Temperaturen oberhalb des Optimums analog zu anderen Organismen eine typische Stressantwort mit einer Bildung von Hitzeschockproteinen (HSP). Durch Hitzestress wurde die Bildung von vier Proteinen mit einem Molekulargewicht von 74 kDa, 60 kDa, 17 kDa und 13 kDa induziert. Zwei der Proteine wiesen eine hohe Homologie zu bekannten Stressproteinen auf. Das 74 kDa Protein konnte immunologisch als Komponente des HSP70-Chaperonsystems identifiziert werden und wurde mit HSP74 bezeichnet. Das 60 kDa-Protein konnte im Immunoblot den Chaperoninen zugeordnet und als HSP60 identifiziert werden.

Die Induktion der Stressproteine war temperaturabhängig. Bei 38 °C wurde die größte Stressproteinmenge gebildet. Der Induktionsverlauf zeigte einen starken Anstieg der HSP60-Konzentration in den ersten beiden Inkubationsstunden. Die maximale Menge dieses Proteins wurde nach 44 Stunden erreicht.

Durch einen moderaten Hitzeschock von 38 °C konnte Thermotoleranz gegenüber der Letaltemperatur von 43 °C induziert werden. Maximale Thermotoleranz mit einer fast 100fachen Erhöhung der Zahl überlebender Zellen wurde durch einen Hitzeschock von 8 Stunden induziert.

Unter Hitzestress wurde außerdem eine Abnahme des Anteils der Ammoniakmonooxygenase (AMO) am Gesamtproteingehalt der Zellen gemessen, wobei die Konzentration der Untereinheit AmoA stärker abnahm als die von AmoB.

2 Einleitung

Die gesetzlichen Anforderungen für die Reinigung kommunaler Abwässer sind in den letzten Jahren stetig gestiegen. Während in den Anfängen der biologischen Abwasserreinigung das Hauptgewicht auf der Entfernung von Kohlenstoffverbindungen lag, werden heute zusätzlich Anforderungen an die Elimination von Stickstoff- und Phosphorverbindungen gestellt. Diese Verbindungen gehören in limnischen und marinen Oberflächengewässern meist zu den limitierenden Wachstumsfaktoren, so dass der Eintrag schon geringer Mengen zu unerwünschten Eutrophierungseffekten führen kann (LEMMER, 1996).

Im Deutschen Wasserrecht sind für den Eintrag von Stickstoffverbindungen in Oberflächengewässer Grenzwerte festgelegt. In der Allgemeinen Rahmenverordnungschrift über Mindestanforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Rahmen-AbwVwV) wurde 1989 erstmals für alle kommunalen Kläranlagen in der Bundesrepublik Deutschland ab einer Größe von 5.000 Einwohnergleichwerten (EGW) ein maximaler Ablaufwert für Ammoniumstickstoff von 10 mg/L vorgeschrieben (N.N., 1992), was eine biologische Reinigungsstufe zur Oxidation des Ammoniumstickstoffs obligatorisch machte. 1994 wurde mit der Änderung des Abwasserabgabegesetzes (AbwAG) zusätzlich auch für den Gesamtstickstoffgehalt ein Grenzwert von 18 mg/L festgelegt, der in einer 2-Stunden Mischprobe eingehalten werden musste (N.N., 1994). Seit 1998 gilt ein Grenzwert von 10 mg/L Gesamtstickstoff für den Jahresdurchschnitt. Gleichzeitig muss ein täglicher Durchschnittswert von weniger als 20 mg/L Gesamtstickstoff sichergestellt werden, sofern die Abwassertemperatur in der Nitrifikationsstufe mindestens 12 °C beträgt (N.N., 1998).

Die Verschärfung der Stickstoffgrenzwerte machte in vielen Kläranlagen Maßnahmen zur Verbesserung der Stickstoffelimination erforderlich. Zur Elimination von Stickstoffverbindungen wird heute überwiegend eine Abfolge von zwei bakteriellen Stoffwechselprozessen genutzt. Zunächst wird in der aeroben Nitrifikation Ammonium zu Nitrat oxidiert. Das Nitrat wird anschließend unter anaeroben Bedingungen in der Denitrifikation zu molekularem Stickstoff reduziert, der in die Atmosphäre abgegeben wird. Bei der biologischen Stickstoffelimination aus Abwasser stellt die Nitrifikation den geschwindigkeitslimitierenden Schritt dar. Hierzu trägt vor allem die äußerst geringe Wachstumsrate der lithoautotrophen Nitrifizierer bei. Die daraus resultierende geringe Zellkonzentration im Belebtschlamm erfordert ein hohes Schlammalter bzw. eine hohe Feststoffkonzentration, um die Leistung sicherzustellen. Außerdem können verschiedene Chemikalien im Abwasser, Temperatur- oder pH-Wert-Schwankungen zu einer Herabsetzung der Nitrifikationsleistung in Abwasserreinigungsanlagen führen (EIGHMY und BISHOP, 1989).

Bei Kläranlagen mit Schlammfäulungsstufen fällt bei der Faulschlammmentwässerung Abwasser mit sehr hohen Ammoniumkonzentrationen an. Dieses sogenannte Trübwasser wird üblicherweise in den Zulauf der Kläranlage eingeleitet und im Hauptstrom der Anlage mitbehandelt. Der Stickstoffeintrag durch das Trübwasser kann bis zu 30 % des Gesamteintrags in die Kläranlage ausmachen. Durch eine getrennte Behandlung dieses Teilstroms vor der Einleitung in den Hauptstrom kann die Stickstoffelimination eines Klärwerks insgesamt verbessert werden (GÜNNER, 1997). Auch in verschiedenen anderen Bereichen fallen Ab-

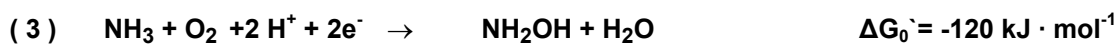
wässer mit hohen Ammoniumkonzentrationen an, so z.B. bei der Intensivtierhaltung landwirtschaftlicher Großbetriebe die Gülle (WILLERS et al., 1998; RIM und HAHN, 2000) und bei der Herstellung von Düngemitteln, Sprengstoffen und bei der Lebensmittelverarbeitung (PIERSING und WIESMANN, 1996; VREDENBREGT et al., 1997). Daher gewinnen Verfahren zur effektiven Stickstoffelimination aus Abwasser mit hoher Ammoniumkonzentration zunehmend an Interesse.

2.1 Nitrifikation

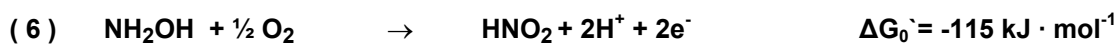
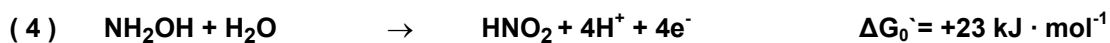
Die Nitrifikation verläuft in zwei Stufen und wird durch phylogenetisch voneinander unabhängige, lithoautotrophe Bakteriengruppen katalysiert. Diese Organismen können anorganische Stickstoffverbindungen als einzige Energiequelle und Kohlendioxid als Kohlenstoffquelle für ihr Zellwachstum nutzen. Ammoniak wird in der ersten Stufe zu Nitrit oxidiert. Diese Reaktion wird von den Ammoniak oxidierenden Bakterien katalysiert. Die Oxidation von Nitrit zu Nitrat führen die Nitritoxidenten durch.

Die Ammoniakoxidanten werden in fünf morphologisch definierte Gattungen unterteilt. Vergleichende 16S rRNA Analysen zeigten, dass die Gattungen *Nitrosomonas* (einschließlich *Nitrosococcus mobilis*), *Nitrospira*, *Nitrosolobus* und *Nitrosovibrio* einen monophyletischen Ast in der beta-Subdivision der Proteobakterien bilden, während die Gattung *Nitrosococcus* einem separaten Zweig der gamma-Subdivision zuzuordnen ist (WOESE et al., 1984; WOESE et al., 1985; HEAD et al., 1993; PURKHOLD et al., 2000)

Die Ammoniakoxidation verläuft in zwei Schritten. Im ersten Schritt wird durch die Ammoniakmonooxygenase (AMO) die Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin katalysiert (3). Die endergone Ammoniakoxidation (1) wird dabei durch eine exergone Reduktion von Sauerstoff (2) ermöglicht, bei der zwei Elektronen verbraucht werden (WOOD, 1988).



Im zweiten Schritt wird Hydroxylamin im periplasmatischen Raum durch die Hydroxylaminoxidoreduktase (HAO) zu Nitrit oxidiert (4) (ANDERSSON und HOOPER, 1983).



Von den insgesamt vier freigesetzten Elektronen (4) werden zwei für die Aktivierung des Sauerstoffs benötigt (2). Die beiden verbleibenden Elektronen können zur Energiegewin-

nung über die Atmungskette (5) oder zur Regeneration von Reduktionsäquivalenten genutzt werden (BOCK et al., 2001).

Die Ammoniakmonooxygenase (AMO) ist ein membrangebundenes Protein, das aus zwei Untereinheiten, dem 27 kDa AmoA-Protein und dem 41 kDa AmoB-Protein, im Verhältnis 1:1 aufgebaut ist. Die native AMO hat kein einheitliches Molekulargewicht, da Monomere, Dimere und Trimere der Untereinheiten auftreten (PINCK, 2001). Die AmoA enthält vermutlich das aktive Zentrum des Enzyms (HYMAN und WOOD, 1985; HYMAN und ARP, 1992). Die Gene für die AmoA (*amoA*) und AmoB (*amoB*) befinden sich in einem Operon (MC TAVISH et al., 1993). In dem Operon wurde als drittes Gen *amoC* detektiert, das möglicherweise für ein Chaperon codiert (KLOTZ et al., 1997).

Die Nitritoxidanten werden in vier Gattungen gegliedert: *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* und *Nitrospina*. Trotz ihres relativ einheitlichen Grundstoffwechsels stellen sie eine polyphyletische Gruppe dar. Die Arten der Gattung *Nitrobacter* gehören zu den alpha-Proteobakterien, die der Gattung *Nitrococcus* zu den gamma- und die Vertreter der Gattung *Nitrospina* zu den delta-Proteobakterien (TESKE et al., 1994), während Vertreter der Gattung *Nitrospira* einem eigenen Zweig zugeordnet wurden (EHRICH et al., 1995).

Die Nitritoxidation verläuft in einer einstufigen Reaktion und kann vereinfacht durch Gleichung (7) wiedergegeben werden (WATSON et al., 1989).



Neben der lithoautotrophen Nitrifikation gibt es auch eine heterotrophe Nitrifikation. Einige Bakterien und niedere Pilze sind in der Lage, neben Ammoniak und Nitrit auch organische Stickstoffverbindungen zu oxidieren. Dabei handelt es sich um eine Kooxidation der organischen Stickstoffverbindungen, die von den Organismen nicht zum Energiegewinn genutzt werden kann. Zudem sind die beteiligten Organismen auf organische Verbindungen als Kohlenstoffquelle angewiesen (ALEXANDER, 1960; FOCHT UND VERSTRAETE, 1977; JENSEN, 1951). Die heterotrophe Nitrifikation trägt aufgrund der nur geringen Umsatzraten in den meisten Biotopen nur sehr marginal zur Gesamtleistung der Nitrifikation bei (KILHAM, 1986).

2.2 Nitrifikation von Zentrat in Hamburg

Im Hamburger Klärwerksverbund Köhlbrandhöft/Dradenau, der mit einer Größe von 2,1 Mio. EGW zu den größten Abwasserreinigungsanlagen Deutschlands gehört, werden bei der Faulschlammmentwässerung täglich etwa 4000 m³ Trübwasser, das sogenannte Zentrat, erhalten. Die Ammoniumkonzentration des Zentrats ist mit 75-120 mM etwa 200fach höher als die des Kläranlagenzulaufs. Das Zentrat hat eine Temperatur von 50-55 °C, die eine Folge der verwendeten Entwässerungstechnik des Faulschlammes ist. Aufgrund der hohen Ammoniumkonzentration lagen gute wirtschaftliche Voraussetzungen für eine getrennte Behandlung dieses Abwassers vor.

Daher wurde durch die Hamburger Stadtentwässerung GBR der Einsatz verschiedener biologischer und chemischer Verfahren zur Stickstoffelimination aus Zentrat geprüft. In den zunächst im Labormaßstab durchgeführten Versuchen lieferte ein biologisches Verfahren zur Stickstoffelimination die besten Ergebnisse. Dabei waren ein neuentwickelter Biofilm-

reaktor zur Nitrifikation und ein konventioneller Belebtschlammreaktor zur Denitrifikation miteinander verbunden. Im Rahmen eines vom BMBF geförderten Projektes wurde dieses Verfahren zwischen 1995 und 1998 durch die Hamburger Stadtentwässerung im halbertechnischen Maßstab unter Klärwerksbedingungen als sogenannte Pilotanlage betrieben (Abb. 1).

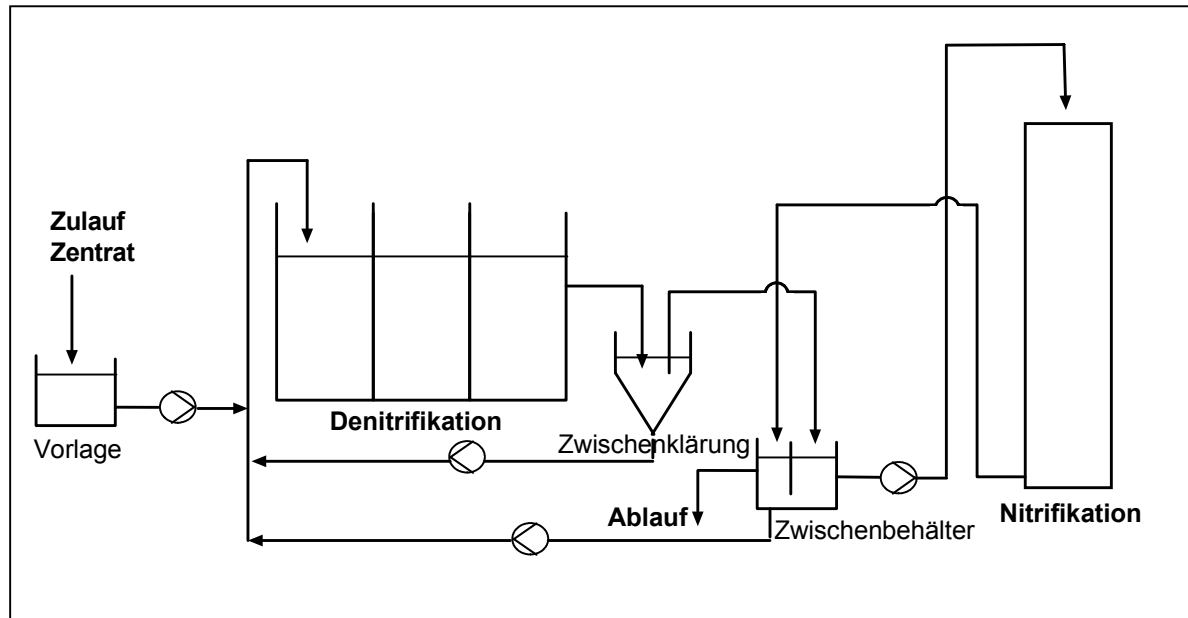


Abb. 1: Prinzipskizze der Pilotanlage zur biologischen Stickstoffelimination aus Zentrat.

Die Nitrifikation wurde in einem Abstromfließbettreaktor durchgeführt. Die Bakterien waren auf geschäumten Polystyrolkugeln in einem Biofilm immobilisiert. Die Sauerstoffversorgung erfolgte durch ein Schlauchsystem unter Verwendung von reinem Sauerstoff. Die Nitrifikation verlief nur bis zur Stufe des Nitrits. Die Nitritoxidation war somit gehemmt.

Ziel der Pilotversuche war es, in der Nitrifikationsstufe 90 % des Ammoniumstickstoffs zu oxidieren und mittels der vor- oder nachgeschalteten Denitrifikationsstufe mindestens 80 % der anorganischen Stickstofffracht zu eliminieren.

2.3 Biofilm

Der Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage wurde mit einem Biofilmverfahren betrieben. Ein Biofilmverfahren gewährleistet eine hohe Biomassekonzentration und damit eine hohe Nitrifikationsleistung pro Kubikmeter Reaktorvolumen (ROSTRON et al., 2001). Ein Biofilm ist definiert als eine komplexe Ansammlung von Mikroorganismen, die auf einer Oberfläche immobilisiert und in eine polymere organische Matrix eingebettet sind, die von den Organismen selbst erzeugt wird (CHARACKLIS und MARSHALL, 1990; FLEMMING, 1995).

Die Biofilmmatrix wird von den sogenannten extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS) gebildet, die zu mehr als 90 % aus Wasser bestehen (SCHAULE, 1992). Die EPS haben einen Anteil von 60-95 % der Trockensubstanz des Biofilms. Sie bestehen überwiegend aus Polysacchariden, aber auch Proteine, Lipide und Nukleinsäuren wurden als Komponenten von EPS gefunden (COSTERTON et al., 1995).

2.4 Einfluss der Temperatur auf das Wachstum

Die Temperatur ist für das Wachstum und die Stoffwechselleistung aller biologischen Systeme ein äußerst wichtiger Faktor. Bei steigenden Temperaturen erhöht sich zunächst die Geschwindigkeit der ablaufenden biochemischen Reaktionen in der Zelle. Die Gleichung von ARRHENIUS (1889) (8) beschreibt diese Beziehung für chemische Reaktionen, wobei k die Reaktionsrate, A eine empirisch ermittelte Konstante, E die Aktivierungsenergie, R die Gaskonstante und T die absolute Temperatur darstellen.

$$(8) \quad k = A e^{(-E/RT)}$$

Die Temperaturabhängigkeit des Wachstums von Bakterien kann durch eine Temperaturoptimumskurve beschrieben werden. Diese ist charakteristisch für jeden Organismus, wobei Temperaturminimum ($T_{\min}$), Temperaturoptimum (T_{opt}) und Temperaturmaximum ($T_{\max}$) die Kardinalpunkte darstellen. $T_{\min}$ ist die niedrigste Temperatur, bei der noch Wachstum erfolgen kann. Mit zunehmender Temperatur steigt die Wachstumsrate bis zum Temperaturoptimum an (RATKOWSKY et al., 1982). T_{opt} ist dabei als die Temperatur definiert, bei der die Wachstumsrate den maximalen Wert erreicht. Diese Temperatur markiert den Wendepunkt, bei dem der wachstumsfördernde Einfluss der Temperatur in einen hemmenden umschlägt. Oberhalb von T_{opt} bewirken eine zunehmende Denaturierung von Proteinen und die thermische Instabilisierung von Nukleinsäuren und anderer essentieller Strukturen der Zelle eine Hemmung des Wachstums (QUINLAN, 1980). Temperaturen oberhalb von T_{opt} werden auch als superoptimale Temperaturen bezeichnet. Aufgrund der meist irreversiblen Schädigungen fällt die Wachstumsrate bei superoptimalen Temperaturen rasch ab, bis kein Wachstum mehr möglich ist. Die höchste Temperatur, bei der Wachstum und Vermehrung erfolgen, wird als $T_{\max}$ bezeichnet (INGRAHAM und MARR, 1996). Temperaturen oberhalb von $T_{\max}$ führen somit zum Absterben der Zellen und sind daher letale Temperaturen. Die Kinetik des Absterbens wird üblicherweise durch eine Absterbekurve dargestellt. Nach VAN UHDE (1984) ist kurzzeitig auch in einen Temperaturbereich oberhalb von $T_{\max}$ Wachstum möglich. Denn diese Temperaturen induzieren die Bildung von Schutzmechanismen (LINDQUIST, 1986).

2.5 Temperaturabhängigkeit der Nitrifikation

Bakterien können in der Regel über einen Temperaturbereich von etwa 30 °C wachsen. Hinsichtlich ihrer Wachstumstemperaturen kann man verschiedene Gruppen unterscheiden. Psychrophile Organismen sind charakterisiert durch ein Temperaturoptimum unterhalb von 20 °C. Das Temperaturoptimum mesophiler Organismen liegt zwischen 20 °C und 42 °C. Zu dieser Gruppe gehören die meisten der bisher bekannten Bakterien. Thermotolerante Organismen haben ein Temperaturoptimum unterhalb von 40 °C, können aber bis zu einer Temperatur von etwa 50 °C wachsen. Thermophile Bakterien haben ein Temperaturoptimum oberhalb von 40 °C und ein Temperaturmaximum von etwa 70 °C. Als extrem thermophile Organismen bezeichnet man diejenigen, deren Temperaturoptimum oberhalb von 65 °C liegt. Hyperthermophile Organismen haben ein Temperaturoptimum oberhalb von 80 °C (STETTER, 1990). Das höchste bisher bekannte Temperaturmaximum hat *Pyrolus fumarii* mit 113 °C (BLÖCHEL et al. 1997).

Fast alle bisher beschriebenen Ammoniak- und Nitritoxidanten haben ein Temperaturoptimum zwischen 25 °C und 30 °C und sind daher den mesophilen Organismen zuzurechnen (BOCK et al., 1986 und 2001; BUSWELL et al., 1954; HARMS et al., 1976; KOOPS und MÖLLER, 1992; SHARMA und AHLERT, 1977). Für nitrifizierende Mischpopulationen aus Belebtschlamm kommunaler Kläranlagen wurden wiederholt Temperaturoptima von 25-35 °C angegeben (ANTONIOU et al., 1990; BERGERON, 1978; BORCHARD, 1966; DROZD, 1976; ESSER, 1978; HAJEK, 1984; HUANG und HOPSON, 1974; KOOPS et al., 1991; NEUFELD et al., 1986; PAINTER und LOVELESS, 1983; SI-SALAH et al. 1991; WATSON et al., 1989).

Nur wenige Autoren beschreiben eine Anreicherung von Ammoniakoxidanten aus thermophilen Standorten bei hohen Temperaturen (GOLOVACHEVA, 1976; KOOPS und MÖLLER, 1992). Aus Proben eines Moskauer Heizungssystems wurde ein thermotoleranter Ammoniakoxidant mit einem Temperaturmaximum von etwa 48 °C isoliert (LEBEDEVA, pers. Mitt.), der der Art *Nitrosomonas nitrosa* zugeordnet werden konnte (KOOPS, pers. Mitt.). Auch aus Material von heißen Quellen des Garga-Flusses am Baikalsee (Standorttemperatur bis 59 °C) konnten Ammoniakoxidanten bei 48 °C angereichert werden (LEBEDEVA, pers. Mitt.), die auch noch bei 55 °C wachsen (KOOPS, pers. Mitt.). Außerdem gelang bei 55 °C eine Anreicherung von Ammoniakoxidanten aus heißen Quellen des Yellowstone Nationalparks, die eine Temperatur von bis zu 100 °C aufwiesen (KOOPS, pers. Mitt.).

Nitritoxidanten konnten aus Proben von thermophilen Standorten ebenfalls nur selten angereichert oder isoliert werden. Aus dem oben genannten Moskauer Heizungssystem wurde der thermotolerante Organismus *Nitrospira moscoviensis* isoliert, der ein Temperaturoptimum von 37 °C aufweist (EHRICH et al., 1995). Aus dieser Probe wurden noch zwei weitere Stämme der Gattung *Nitrospira* isoliert, die optimal bei 42°C bzw. 37°C wachsen. Aus den heißen Quellen des Garga-Flusses am Baikalsee konnte bei 55 °C ein thermophiler Nitritoxidant der Gattung *Nitrospira* angereichert werden (SPIECK, pers. Mitt.), der nicht bei 27 °C wächst (LEBEDEVA, pers. Mitt.). Außerdem konnten aus den heißen Quellen des Yellowstone Nationalparks auch Nitritoxidanten angereichert werden, die bei 48 °C bzw. 55 °C wachsen (SPIECK, pers. Mitt.).

Für nitrifizierende Anreicherungskulturen spezieller Kläranlagen wurden vereinzelt Temperaturoptima von mehr als 35 °C angegeben. WILLERS et al. (1998) und HELLINGA et al. (1998) untersuchten die Temperaturabhängigkeit der Nitrifikation von Abwässern mit hohen Ammoniumkonzentrationen. Die Nitrifikationssysteme wurden mit Material aus mesophilen Standorten beimpft und über längere Zeit bei Betriebstemperaturen von 35 °C betrieben. Die Autoren ermittelten dabei im Kurzzeitversuch ein Temperaturoptimum von etwa 40 °C für die Ammoniakoxidation.

2.6 Stressproteine

In allen Biotopen können Organismen zeitweilig Stress ausgesetzt sein. Mögliche Stressfaktoren sind Temperatur, UV-Licht, Austrocknung, Alkalisierung bzw. Ansäuerung, Sauerstoff bzw. Anaerobiosis, Nährstoffmangel, Salinität, Schwermetalle und verschiedene Chemikalien. Durch diese Stressfaktoren können essentielle Strukturen der Zellen (Proteine, Nukleinsäuren, Membransysteme) irreversibel geschädigt werden, was ein effektives Schutzsystem erforderlich macht (GLATZ et al., 1999). Die Temperatur ist dabei der Stressfaktor mit dem breitesten Spektrum. Im terrestrischen Bereich der Erde wurden Temperaturen von $-88\text{ }^{\circ}\text{C}$ bis $+55\text{ }^{\circ}\text{C}$ ermittelt. Die höchste Temperatur der Erde wurde mit bis zu $+350\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Tiefseequellen im mehreren tausend Metern Tiefe gemessen (GROß, 1997). Die Temperatur kann außerdem in einem Biotop große Schwankungen aufweisen, die an extremen Standorten im Tagesverlauf mehr als $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ und innerhalb eines Jahres über $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ betragen können (FOOTMAN, 2001, N.N., 2000).

Alle Organismen reagieren auf eine plötzliche Erhöhung ihrer Umgebungstemperatur mit der transient verstärkten Synthese einer Reihe hochkonservierter Proteine. Diese als Hitzeschockantwort bezeichnete Reaktion auf Stressbedingungen ist universell verbreitet und stellt eins der am höchsten konservierten genetischen Systeme dar (LINDQUIST und CRAIG, 1988). Eine Hitzeschockantwort konnte bisher bei allen daraufhin untersuchten Organismen festgestellt werden: bei Archaeobakterien, Eubakterien, Pilzen, Pflanzen, Tieren und auch beim Menschen (LINDQUIST, 1986; LINDQUIST und CRAIG, 1988; NOVER, 1991; WATSON, 1990).

Erstmals wurden Temperatureffekte bei Untersuchungen der Chromosomen von *Drosophila buskii* entdeckt (RITOSSA, 1962). Gut zehn Jahre später wurden aus den Speicheldrüsen von *Drosophila melanogaster* nach sprunghafter Temperaturerhöhung neusynthetisierte Proteine isoliert. Diese Proteine wurden später Hitzeschockproteine (HSPs) genannt (TISSIERES et al., 1974). Da die Bildung der sogenannten Hitzeschockproteine auch durch andere Stressfaktoren induziert wird, werden sie heute meist als Stressproteine bezeichnet (WATSON, 1990).

Viele der durch Stressbedingungen induzierbaren Proteine können funktionell den sogenannten molekularen Chaperonen zugeordnet werden (LINDQUIST, 1992; HARTL, 1996). Diese sind definiert als Proteine, die andere Proteine bei der Ausbildung ihrer Tertiärstruktur unterstützen, wobei sie weder Informationen über die Struktur der Proteine enthalten noch ein Teil des funktionalen Proteins sind. Die molekularen Chaperone ermöglichen dabei die Ausbildung der korrekten Tertiärstruktur von Proteinen. Denaturierte Proteine können durch Stressproteine disaggregiert und renaturiert werden (KADRI et al., 1998). Falls eine Renaturierung nicht möglich ist, werden die irreversibel geschädigten Proteine markiert und durch spezielle Proteasen abgebaut, die häufig ebenfalls durch Stressbedingungen induziert werden (BECKER und CRAIG, 1994; LINDQUIST, 1992; PARSELL und LINDQUIST, 1993).

Molekulare Chaperone sind auch unter optimalen Wachstumstemperaturen essentiell an der Proteinbiosynthese beteiligt und daher konstitutiv in den Zellen nachweisbar (ANG et al., 1986; BUKAU und WALKER, 1989; FAYET et al., 1989; LINDQUIST, 1992; WATSON, 1990). Wie durch in vitro-Untersuchungen gezeigt werden konnte, liegen zwar in der Primärstruktur der Proteine bereits alle Informationen für die korrekte Tertiärstruktur des funktionalen Proteins vor (ANFINKSEN, 1973). In der Zelle ist aber unter optimalen Wachstumsbedingun-

gen die Konzentration an Proteinen so hoch (z.B. 340 µg/mL Protein bei *E. coli*, KADRI et al., 1998), dass aufgrund der vielen möglichen inter- und intramolekularen Wechselwirkungen die Wahrscheinlichkeit für eine korrekte Faltung des Proteins gering ist. Außerdem tendieren partiell gefaltete Proteine zur Bildung unlöslicher Aggregate (GARGEROV et al., 1992). Daher sind auch unter optimalen Wachstumsbedingungen Chaperone zur Ausbildung der funktionalen Tertiärstruktur erforderlich.

Zur Beschreibung von Stressproteinen wird zunächst das Molekulargewicht durch denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese bestimmt. Daher werden Stressproteine nach anerkannter Konvention mit der Abkürzung HSP und ihrer Größe bezeichnet, so wird z.B. ein 70 kDa großes Stressprotein HSP70 benannt (WATSON, 1990). Die Stressproteine wurden zunächst hinsichtlich ihrer Größe in verschiedene Familien eingeordnet: Die HSP100-, HSP90-, HSP70-, HSP60- und HSP20-Familie (LINDQUIST, 1986). Innerhalb der Familien waren deutliche Sequenzhomologien zwischen Stressproteinen verschiedener Herkunft nachweisbar (PARDUE, 1988). Da in den letzten Jahren zunehmend Informationen über die Funktion der Stressproteine ermittelt werden konnten, erfolgt die Einteilung heute überwiegend aufgrund ihrer Funktion, wobei die alte Einteilung in den Grundzügen beibehalten wurde. Stressproteine werden daher in folgende Klassen eingeteilt: die HSP100-Familie, die HSP90-Chaperone, das HSP70-Chaperonsystem, die Chaperonine (HSP60-Chaperone) und die sogenannten kleinen Stressproteine mit einem Molekulargewicht <20 kDa (MIERNYK, 1999).

In der **HSP100-Familie** sind oligomere ATPasen mit einer Größe von 84-104 kDa zusammengefasst. In *E. coli* wurden HSP100-Proteine als Untereinheiten einer ATP-abhängigen Protease (CIP = caseolytic protease) nachgewiesen und als CIPA, CIPB, CIPC und CIPX bezeichnet (SQUIRES et al., 1991; HOSKINS et al., 1998). HSP100/CIP-Einheiten bilden ringförmige Molekülstrukturen und fungieren auch als Chaperone, da sie unter ATP-Verbrauch eine Konformationsänderung von Proteinen ermöglichen können (BOSTON et al., 1996; HOSKINS et al., 1998). Das HSP100/CIP Chaperonsystem fördert vor allem die Auflösung von Aggregaten denaturierter Proteine und leitet so ihre Renaturierung ein (MOGK et al., 1999; MOTOHASHI et al., 1999; ZOLKIEWSKI, 1999).

HSP90-Chaperone haben eine Größe von 82-96 kDa. Das ATP-abhängige HSP90-Chaperonsystem bindet bei der Proteinbiosynthese transient an bereits hochstrukturierte Proteine und verhindert deren Aggregation. Dabei kann das HSP90 allein als Chaperon fungieren oder im Zusammenspiel mit dem HSP70-Chaperonsystem wirken (MIERNYK, 1999).

HSP70-Chaperone sind die am höchsten konservierten Stressproteine (LINDQUIST, 1986). Bei Prokaryoten bilden sie zusammen mit zwei Co-Chaperonproteinen eine funktionelle Einheit, die als HSP70-Chaperonsystem bezeichnet wird (BUKAU und HORWICH, 1998). Dies Chaperonsystem verhindert vor allem die Aggregatbildung neusynthetisierter und denaturierter Proteine.

Die als **Chaperonine** bezeichneten HSP60-Chaperone sind die am besten untersuchten Chaperone (BOSTON et al., 1996). Sie sind aus oligomeren Strukturen zusammengesetzt, die ein vom Zytosol abgeschlossenes Kompartiment für die Faltung von Proteinen zur Verfügung stellen. Für die Proteinfaltung benötigen sie Energie aus der ATP-Hydrolyse (HARTL, 1996; MIERNYK, 1999).

In der heterogene Klasse der sogenannten **kleinen Stressproteine** (small HSPs = smHSPs) sind Stressproteine mit einem Molekulargewicht unterhalb von 20 kDa zusammengefasst, die größtenteils ebenfalls Chaperone sind. Im Unterschied zu den anderen Chaperonsystemen ist die Aktivität der smHSPs ATP-unabhängig. Eine verbreitete Eigenschaft der smHSPs ist die Bildung großer Komplexe.

2.7 Funktion des HSP70-Chaperon- und des Chaperoninsystems

Die Funktionsweise des HSP70 Chaperonsystems mit der funktionellen Kopplung zum Chaperoninsystem wurde bisher hauptsächlich an *E. coli* untersucht. Bei diesem Organismus sind alle Proteine des HSP70-Chaperonsystems in einem gemeinsamen Operon codiert (BACHMANN, 1990; TILLY et al., 1983; ZEILSTRA-RYALLS et al., 1991). DnaK (=HSP70) ist die zentrale Komponente des Chaperonsystems, zu dem außerdem das chaperonaktivierende Protein DnaJ und der Nukleotidaustauschfaktor GrpE gehören.

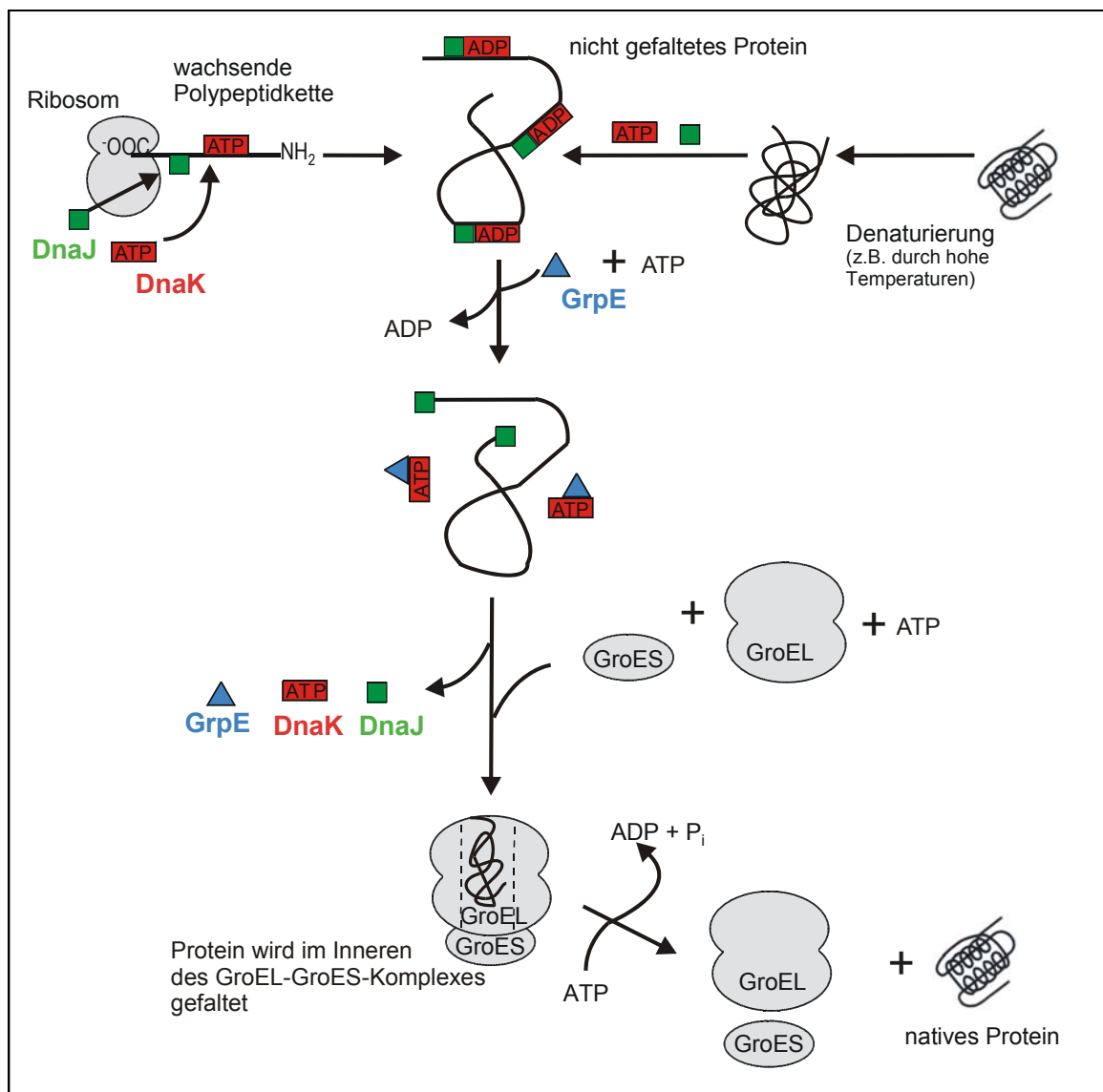


Abb. 2 Die Funktion von DnaK, DnaJ, GrpE, GroEL und GroES bei der Faltung von neu synthetisierten und denaturierten Proteinen von *E. coli* (nach ADAMS, 1994).

Der Reaktionszyklus des HSP70-Chaperonsystems von *E. coli* ist in Abb. 2 dargestellt. DnaJ bindet an hydrophobe Bereiche nicht gefalteter Proteine. Dabei kann es sich um einen gerade synthetisierten Polypeptidstrang aus der Proteinbiosynthese handeln oder um ein durch Stressbedingungen denaturiertes Protein. Die Interaktion von DnaJ mit dem Polypeptidstrang ermöglicht die Bindung von DnaK, das mit ATP assoziiert ist. DnaK, DnaJ und das nicht gefaltete Protein bilden einen Komplex. Die Hydrolyse von ATP führt zu einem ADP-DnaK-Komplex mit einer hohen Affinität zum nicht gefalteten Protein. Für die Freisetzung des Proteins wird der Nukleotidaustauschfaktor GrpE benötigt. Dieser induziert die Dissoziation des ADP vom Komplex und ermöglicht damit die erneute Bindung von ATP. Da der ATP-DnaK-Komplex nur noch eine geringe Affinität zum Protein besitzt, wird dieses dann freigesetzt. Ein nicht gefaltetes Protein kann diesen Zyklus mehrmals durchlaufen, bis die korrekte Tertiärstruktur erreicht ist oder das Protein an die Chaperone weitergegeben wird.

Das Chaperoninsystem von *E. coli* besteht aus zwei miteinander verbundenen Ringen aus jeweils 7 Untereinheiten des GroEL-Proteins (60 kDa), die mit einer weiteren Ringstruktur aus ebenfalls 7 Untereinheiten des kleineren GroES-Proteins (10 kDa) assoziieren können. Die GroEL-Proteine formen einen Zylinder in dessen Hohlraum denaturierte oder noch nicht gefaltete Proteine transient binden können (Abb. 2). Der Kofaktor GroES verschließt den Hohlraum für kurze Zeit. Durch ATP-Hydrolyse wird die Konformation von GroEL in der Bindungshöhle verändert. Die neuentstandene Oberfläche begünstigt die Ausbildung der nativen, funktionellen Proteinstruktur und minimiert die Gefahr falscher inter- oder intramolekularer Wechselwirkungen (Abb. 2).

2.8 Regulation der Stressantwort

Die Bildung von Stressproteinen erfolgt im Rahmen einer organismusspezifischen Stressantwort. Diese wird in der Regel durch denaturierte oder unvollständig gefaltete Proteine induziert, die unter verschiedenen Stressbedingungen entstehen (HIGHTOWER, 1980). Die Regulation der Stressantwort erfolgt bei Prokaryoten überwiegend auf transkriptionaler Ebene (MAGER und DE KRUIJFF, 1995). Bei *E. coli* und vielen anderen gram-negativen Bakterien spielt das σ^{32} -Regulon eine zentrale Rolle in der Stressreaktion der Zellen (GROSSMAN et al., 1987; ZHOU et al., 1988). Mittels des alternativen σ^{32} -Faktors wird die Transkription von Chaperonen, Proteasen und anderen Stressproteinen initiiert. Unter Stressbedingungen wird die Konzentration von σ^{32} in der Zelle kurzzeitig stark erhöht, was eine verstärkte Transkription dieser Stressgene zur Folge hat (YURA und NAKAHJAKI, 1999; YURA et al., 2000).

Es besteht eine hohe Korrelation zwischen der Temperatur, die die maximale Konzentration von Stressproteinen induziert und der Temperatur des natürlichen Biotops (LINDQUIST, 1986; LINDQUIST und CRAIG, 1988). Temperaturen, die die Hitzeschockantwort auslösen, können auch am natürlichen Standort auftreten. Die maximale Konzentration von Stressproteinen vieler Organismen wird bei Temperaturen erhalten, die 10 – 15 °C über dem Temperaturoptimum liegen (LINDQUIST, 1986). Bei *Drosophila* beispielsweise wird die maximale Bildung von Hitzeschockproteinen bei 37 °C induziert (LINDQUIST, 1980). Bei thermophilen Bakterien (Temperaturoptimum: 50 °C) wird die Hitzeschockantwort bei 60 °C induziert, während für Fische arktischer Gewässer bereits 5-10 °C Hitzeschocktemperaturen darstel-

len. Beim Menschen wird eine Hitzeschockantwort durch Fiebertemperaturen induziert (LI und LASZLO, 1985; HASDAY und SINGH, 2000).

2.9 Thermotoleranz

Die Fähigkeit zur transienten, nicht vererbaren Adaptation an Hitzestress wird als Thermotoleranz bezeichnet. Der Begriff wurde erstmalig von HENLE und DETHLEFSEN (1978) im Zusammenhang mit der hyperthermischen Behandlung von Krebs eingeführt. Dieses Phänomen ist bei allen Organismen verbreitet (NOVER, 1991; WATSON, 1990).

Thermotoleranz führt zu einer erhöhten Überlebensrate von Organismen bei letalen Temperaturen, wenn zuvor durch einen kurzzeitigen moderaten Hitzeschock oder langsames Erhitzen die Bildung von Hitzeschockproteinen induziert wurde. Die Hitzeschockproteine sind für die Ausprägung von Thermotoleranz erforderlich. Dies konnte zunächst durch Untersuchungen an menschlichen Zellkulturen belegt werden, wobei Funktion und Beteiligung der verschiedenen Hitzeschockproteine noch unbekannt waren (CARPER et al., 1987; GERNER und SCHNEIDER, 1975). Auch von Mikroorganismen ist schon seit langem bekannt, dass die Vorinkubationstemperatur die Fähigkeit von Zellen beeinflusst, einen starken Hitzeschock zu überleben (ELLIKER und FRAZIER, 1938).

Bei *E. coli* konnte gezeigt werden, dass die Stressproteine HSP70 und HSP60 für das Wachstum bei hohen Temperaturen essentiell sind (ANG et al., 1986; BUKAU und WALKER, 1989). Ob eine direkte Dosis-Effekt-Beziehung zwischen der Synthese dieser Proteine und der Ausprägung der Thermotoleranz vorliegt, konnte bisher nicht eindeutig bewiesen werden (PARSELL und LINDQUIST, 1993; SCHLESINGER, 1986).

2.10 Stressproteine bei Ammoniak oxidierenden Bakterien

Ammoniak oxidierende Bakterien sind gegenüber verschiedenen Stressfaktoren, wie z.B. hohen Salzkonzentrationen, Schwermetallen, Licht, pH-Wert- und Temperaturschwankungen, in ihren natürlichen Biotopen äußerst sensitiv und werden bereits durch geringe Veränderungen der Bedingungen stark in ihrer Stoffwechselleistung herabgesetzt (HOOPER und TERRY, 1973; PAINTER, 1986; SHARMA und AHLERT, 1977).

Dies ist besonders in der Abwasserreinigung problematisch, da auch bei unterschiedlicher Abwasserzusammensetzung eine stabile Nitrifikationsleistung aufrecht erhalten werden muss, um die gesetzlich festgelegten Ablaufwerte für Stickstoffverbindungen im Klärwerksablauf einzuhalten.

Über Stressproteine bei Ammoniak oxidierenden Bakterien liegen bislang erst wenige Ergebnisse von Untersuchungen an *Nitrosomonas europaea* vor. IIZUMI und NAKAMURA (1997 und 1999) fanden, dass die Gene des HSP70-Chaperonsystems (DnaK, DnaJ und GrpE) in einem gemeinsamen Operon vorliegen. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des DnaK-Proteins zeigte hohe Sequenzhomologien zu entsprechenden Proteinen anderer Spezies aus der Klasse der beta-Proteobakterien (74,4% zu *Burkholderia cepacia*) und gamma-Proteobakterien (69,3% zu *Haemophilus influenzae*, 73,9% zu *E. coli*). DUNCAN et al. (2000) konnten das Chaperonin GroEL immunologisch nachweisen.

2.11 Problemstellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war, den Einfluss der Temperatur auf Wachstum und Stoffwechselaktivität Ammoniak oxidierender Bakterien zu bestimmen.

Zunächst wurde die Nitrifikationsaktivität der Ammoniak oxidierenden Population eines Nitrifikationsreaktors untersucht. Die Nitrifikation wurde bei Temperaturen von mehr als 30 °C und damit in einem Temperaturbereich betrieben, der weit über den üblichen Temperaturen großtechnischer Nitrifikationsstufen lag. Daher sollte vor allem der Einfluss der Betriebstemperatur auf die Aktivität der Ammoniakoxidantenpopulation aufgeklärt werden. Außerdem sollte untersucht werden, inwieweit Zellzahl und Populationszusammensetzung der Ammoniakoxidanten durch die Betriebstemperatur beeinflusst wurden.

Am Beispiel von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14), eines in hoher Zellzahl im Biofilm nachweisbaren Ammoniakoxidanten, sollten die Auswirkungen der im Nitrifikationsreaktor gemessenen Temperaturen auf verschiedene Stoffwechselprozesse weiter charakterisiert werden. In Laborversuchen mit Reinkulturen sollte dabei zunächst der Einfluss dieser Temperaturen auf die Nitritbildung, das Wachstum und die Vermehrung dieses Stammes untersucht werden.

Organismen zeigen bei letalen Temperaturen eine typische Stressantwort mit einer Bildung von Hitzeschockproteinen. Daher sollte auch der Frage nachgegangen werden, inwieweit diese Stressreaktion bei *N. eutropha* vorliegt mit dem Ziel, die Stressproteine zu charakterisieren und ihre Induktion und Funktion zu beschreiben.

3 Material und Methoden

3.1 Bakterienstämme

Für die Untersuchungen wurden folgende Stämme Ammoniak oxidierender Bakterien verwendet :

Art	Stamm	Herkunft (isoliert von)
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	Nm 14	Gelsenkirchen, kommunale Kläranlage (Koops)
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	Nm 23	Gelsenkirchen, kommunale Kläranlage (Koops)
<i>Nitrosomonas eutropha</i>	Nm 53	Elbe, schlickiges Sediment (Koops)
<i>Nitrosomonas europaea</i>	Nm 50*	Neotype-Strain ATCC 25978 (Watson)
<i>Nitrosomonas nitrosa</i>	Nm 90*	Chemische Werke Hüls, Belebtschlamm (Harms)
<i>Nitrosomonas ureae</i>	Nm 60	Este, Sediment (Sowitzki)
<i>Nitrosomonas spec.</i>	Nm P34x	Hamburg, kommunale Kläranlage Köhlbrandhöft/Dradenau, Belebtschlamm (Schmidt-Wilckerling)
<i>Nitrosomonas spec.</i>	Nm N1	Hamburg, Nitrifikationsreaktor (Wiegel)
<i>Nitrosomonas spec.</i>	Nm N2	Hamburg, Nitrifikationsreaktor (Wiegel)

*= Typ-Stamm

Die beiden Bakterienstämme *Nitrosomonas spec.* N1 und N2 wurden im Rahmen dieser Arbeit in Reinkultur gebracht. Die anderen eingesetzten Bakterienstämme wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Harms (Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik, Abteilung für Mikrobiologie) zur Verfügung gestellt.

3.2 Nährmedien

Die Bakterien wurden auf folgenden Nährmedien mit Komponenten des Reinheitsgrades “pro analysi” (Fa. Merck) angezogen.

Medium Ia

NH ₄ Cl	10,0 mM	0,535 g
KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,054 g
KCl	1,0 mM	0,074 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,2 mM	0,049 g
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	1,0 mM	0,147 g
NaCl	10,0 mM	0,584 g
Spurenelementlösung (KRÜMMEL und HARMS, 1982)		1,0 mL
Kresolrotlösung	0,5 % (w/v)	1,0 mL
Aqua deion.		ad 1000 mL

Medium Ib

Medium Ib entsprach in der Zusammensetzung dem Nährmedium Ia, jedoch wurde das CaCl₂ x 2 H₂O durch 5g/L CaCO₃ ersetzt.

Medium Ib-Agar

Die Zusammensetzung des Medium Ib-Agars entsprach dem Nährmedium Ia, jedoch wurden 20 g/L CaCO₃ statt CaCl₂ x 2 H₂O eingesetzt und außerdem 12 g/L Agar zugegeben.

Medium IIa

Medium IIa entsprach in der Zusammensetzung dem Nährmedium Ia, jedoch betrug die Ammoniumkonzentration 25 mM NH₄CL (= 1,338 g/L). Außerdem wurde das Medium mit 0,1 M (= 23,8 g/L) HEPES (N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-ethanesulfonic acid, Fa. Gerbu) gepuffert. Dazu wurde eine 1 M HEPES-Stammlösung hergestellt, die durch Zugabe von konz. NaOH auf einen pH-Wert von pH 7,9 eingestellt und vom übrigen Medium getrennt autoklaviert wurde. Nach Zugabe der HEPES-Stammlösung zum Medium stellte sich ein pH-Wert von pH 7,8 ein.

Alle Nährmedien wurden im Autoklaven bei 0,5 bar Überdruck und 112 °C für 30 min sterilisiert.

3.3 Kulturführung

3.3.1 Stammkulturen

Stammkulturen wurden in Reagenzröhrchen mit je 13 mL Nährlösung Ib angezogen. Die Kulturen wurden zwei Wochen bei 28 °C und anschließend bei Raumtemperatur dunkel inkubiert. Die Stammkulturen wurden alle 8-12 Wochen auf frisches Medium überimpft.

3.3.2 Zwischenkulturen

Die Anzucht der Zwischenkulturen erfolgte in 300 mL-Erlenmeyerkolben mit je 150 mL Nährlösung Ia dunkel bei 28 °C. Die Zwischenkulturen wurden mit je 5 mL einer Stammkultur beimpft. Der pH-Wert der Kulturen konnte anhand des Farbumschlags des zugesetzten Indikators Kresolrot abgeschätzt werden. Bei wachsenden Kulturen wurde der pH-Wert regelmäßig durch Zugabe von 5 %iger (w/v) NaHCO_3 -Lösung aus einem Tropftrichter auf einen pH-Bereich von pH 7,0–8,0 eingestellt.

3.3.3 Massenanzucht

Zur Massenanzucht wurden Kulturen in 3 L-Erlenmeyerkolben mit je 1,5 L Nährlösung Ia oder in 10 L-Steilbrustflaschen mit 5 L Nährlösung Ia angezogen. Sie wurden jeweils mit etwa 100 mL einer gut wachsenden Zwischenkultur beimpft. Der pH-Wert wachsender Kulturen wurde durch sterile Zugabe von 10 %iger (w/v) NaHCO_3 -Lösung aus einem Tropftrichter in einem Bereich von pH 7,0–8,0 gehalten. Die Kulturen wurden zur Sicherstellung der Sauerstoffversorgung bei hohen Zelldichten auf einem Magnetrührer (IkaMag® Reo, Fa. IKA) gerührt.

Für die immunologische Charakterisierung wurden Zellen in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit 50 mL Nährlösung Ia als Standkultur angezogen. Diese Kulturen wurden direkt mit 10-12 mL einer Stammkultur beimpft. Der pH-Wert wurde durch sterile Zugabe von 5 %iger (w/v) NaHCO_3 -Lösung eingestellt.

3.4 Reinheitskontrolle

Die Kulturen wurden regelmäßig mikroskopisch auf Kontaminanten überprüft. Außerdem wurde die Reinheit der Kulturen durch Überimpfen auf Hefewasser-Medium geprüft. Dazu wurden je 0,1 mL der Kulturen zu 5 mL Hefewasser-Bouillon in Reagenzröhrchen gegeben. Die Reinheitsansätze wurden 3 Wochen bei 28 °C inkubiert. Eine Trübung des Mediums zeigte eine Verunreinigung durch heterotrophe Mikroorganismen an. Kontaminierte Kulturen wurden nicht für weitere Untersuchungen verwendet.

Hefewasser-Bouillon

Bacto-Pepton (Fa. Difco)		1,000 g
Hefeextrakt (Fa. Gibco)		1,000 g
Fleischextrakt „Lab Lemco“ (Fa. Oxoid)		1,000 g
NaCl	10,0 mM	0,584 g
Aqua deion.		ad 1000 mL

Der pH-Wert wurde mit Natronlauge auf pH 7,3 – 7,5 eingestellt.

3.5 Ernten von Bakterienzellen

Zellen aus Massenanbauten wurden nach Bildung von jeweils 7-9 mM Nitrit geerntet. Aus den Ansätzen der Temperaturversuche erfolgte die Zellernte nach definierten Inkubationszeiten. Dazu wurden die Zellen bei 20 °C für 30 min bei 11.634 x g (Centrikon H-401, Rotor KA 12500, Fa. Kontron) in 500 mL-Bechern abzentrifugiert. Die Zellen wurden einmal in 0,02 M Tris-HCl (pH 8,0) gewaschen und 30 min bei 17.387 x g (Centrikon H-401, Rotor JA 8.24, Fa. Kontron) sedimentiert. Anschließend wurden sie in 1-2 mL 0,02 M Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen.

Die Kulturen für die immunologische Charakterisierung von Isolaten wurden bis zur Bildung von etwa 5-7 mM Nitrit angezogen. Die Ernte der Zellen erfolgte durch Zentrifugation in 30 mL-Zentrifugenröhrchen bei 20 °C für 30 min mit 12.074 x g (Centrikon H-401, Rotor JA 8.24, Fa. Kontron). Das Zellsediment wurde in 500 µl 0,02 M Tris-HCl (pH 8,0) aufgenommen und tropfenweise mit 0,5 n HCl-Lösung versetzt, bis die aus dem Impfmateri- al verbliebenen CaCO₃-Kristalle vollständig aufgelöst waren. Anschließend wurden die Zellen in 1,5 mL Reaktionsgefäßen nochmals 20 min bei 18.500 x g (Biofuge, Fa. Heraeus) sedimentiert und in 50–100 µl PBS-Puffer (Phosphate buffered saline) aufgenommen .

PBS-Puffer (KELETI und LEDERER (1974) in der Modifikation von SOWITZKI (1986))

Stammlösung (10fach)

Na ₂ HPO ₄	11,5 g
KH ₂ PO ₄	2,0 g
KCl	2,0 g
Aqua deion.	ad 1000 mL

Arbeitslösung

Stammlösung	100 mL
NaCl	8,0 g
Aqua deion.	ad 1000 mL
pH 7,2	

3.6 Untersuchungen des Nitrifikationsreaktors der Pilotanlage

3.6.1 Beschreibung des Systems

Der Nitrifikationsreaktor der halbtechnischen Pilotanlage bestand aus einem 6 m hohen Edelstahlrohr mit einem Durchmesser von 0,5 m. Abb. 3 zeigt eine schematische Darstellung der Anlage. Im Reaktor befanden sich etwa 1,3 m³ Trägermaterial. Als Trägermaterial diente geschäumtes Polystyrol einer mittleren Korngröße von 1-2 mm. Auf der Polystyrol-oberfläche waren die Ammoniakoxidanten in einem Biofilm immobilisiert. Zentrats wurde über einen Verteilerboden von oben in den Reaktor geleitet. Durch die Strömungsrichtung des Abwassers von oben nach unten wurde das Trägermaterial um 30-40 % zu einem Fließbett expandiert, wobei der Expansionsgrad durch die Zulaufgeschwindigkeit reguliert wurde. Im unteren Bereich des Reaktors erfolgte über Schläuche ein Eintrag von reinem Sauerstoff im sogenannten HypOx®-Verfahren der Firma Bräutigam Abwassertechnik. Der Ablauf wurde in einem Zwischenbehälter geführt und von dort mittels einer Rezirkulationspumpe teilweise in den Reaktor zurückgeleitet. Durch einen Bypass konnte Trägermaterial vom unteren Rand des Fließbetts zur Abtrennung überschüssiger Biomasse entnommen und anschließend wieder in den Reaktor zurückgeführt werden. Dabei wurde das Trägermaterial hohen Scherkräften ausgesetzt, durch die ein Teil des Biofilms abgetrennt wurde.

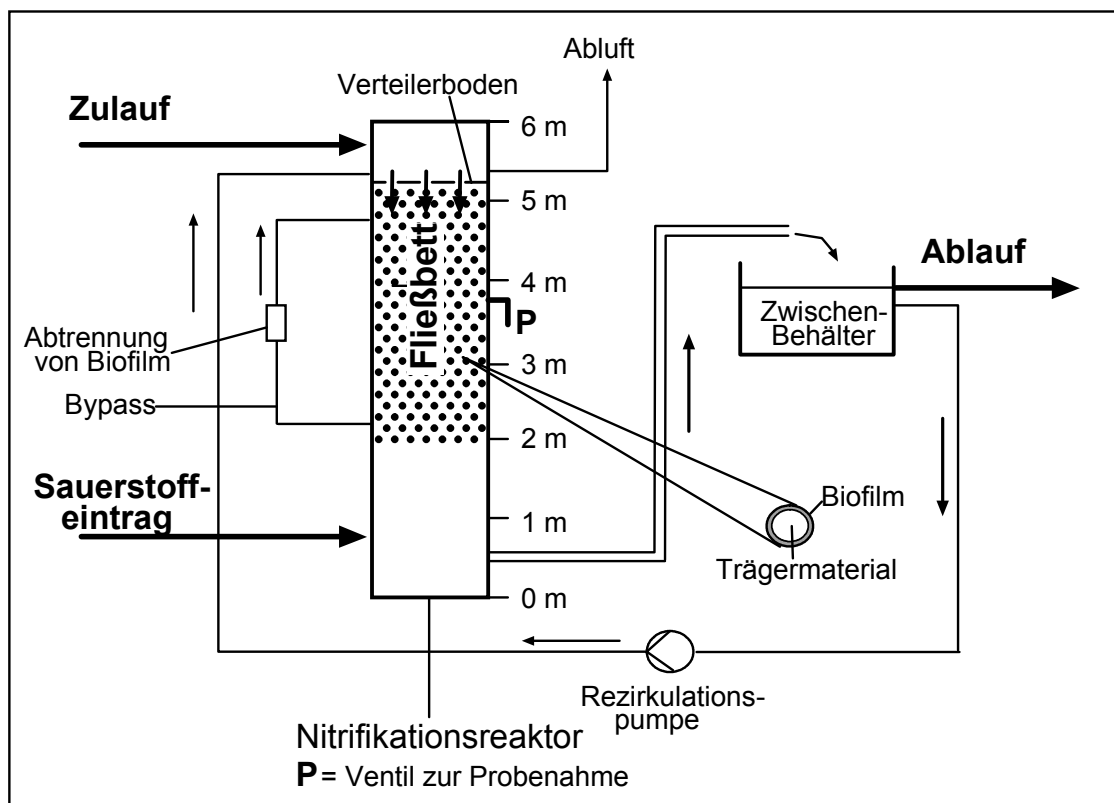


Abb. 3 Prinzipskizze des Abstromfließbettreaktors zur Nitrifikation von Trübwasser aus der Faulschlammmentwässerung (nach: Günner, 1997, modifiziert)

Der Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage wurde mit verschiedenen Einstellungen betrieben, die im wesentlichen drei Betriebsphasen zuzuordnen waren (Tab. 1). In der ersten Phase wurde der Sauerstoffeintrag verbessert (Optimierungsphase 1). Dabei wurde über die Zulaufmenge des Zentrats ein Reaktorablaufwert von 100 mg/L Ammoniumstickstoff (entspricht 7,1 mM Ammonium) eingestellt. In der anschließenden sogenannten Hochlastphase wurde die Pilotanlage mit einem hohen Zentratsdurchsatz von 750 L/h (20-50 mM Ammonium) betrieben. In der dritten Phase, der Optimierungsphase 2, wurde die Zentratzufuhr soweit vermindert, dass erneut ein Ablaufwert von 100 mg/L Ammoniumstickstoff erreicht wurde. Während dieser Phase wurden Sauerstoffeintrag und Laugendosierung optimiert. Die Nitrifikation verlief in der Pilotanlage nur bis zum Nitrit. Lediglich in den ersten Wochen nach Inbetriebnahme des Reaktors (Optimierungsphase 1) wurde kurzzeitig Nitratbildung nachgewiesen. Anschließend war Nitrit in allen Betriebsphasen im Reaktorablauf das einzig nachweisbare Reaktionsprodukt. Nitrat war nicht vorhanden.

Tab. 1 Betriebsphasen des Nitrifikationsreaktors der Pilotanlage zur Stickstoffelimination aus Zentrat (nach BRÄUTIGAM, 1997)

Zeitraum [Monat/Jahr]	Betriebsphase	Betriebsziel
09/95 – 02/96	Optimierungsphase 1	Ablaufwert von 100 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$
03/96 – 09/96	Hochlastphase	Zentratsdurchsatz von 750 L/h
10/96 – 03/97	Optimierungsphase 2	Ablaufwert von 100 mg/L $\text{NH}_4^+\text{-N}$

3.6.1.1 Probenahme

Zwischen November 1995 und März 1997 wurden in 2-8wöchigem Abstand insgesamt 30 Proben aus dem Nitrifikationsreaktor entnommen. Die Probenahme erfolgte aus einem Ventil in 3,85 m Reaktorhöhe und damit aus dem mittleren Bereich des expandierten Bettes. Bei der Probenahme wurden jeweils etwa 500 mL des bewachsenen Trägermaterials entnommen. Dieses Material wird im Folgenden auch als Biofilmmaterial bezeichnet. Aus demselben Probenahmeventil wurden auch die Wasserproben des Pilotreaktors genommen.

3.6.2 Betriebsparameter von Nitrifikationsstufen kommunaler Kläranlagen

Neben dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage wurden vergleichend auch die Betriebsparameter von den großtechnischen Nitrifikationsstufen der kommunalen Kläranlagen Köhlbrandhöft/Dradenau in Hamburg und der Kläranlage Lüneburg untersucht.

Im Klärwerksverbund Köhlbrandhöft/Dradenau (2.100.000 EGW) wurde die Nitrifikationsstufe im Klärwerk Dradenau im Belebtschlammverfahren betrieben. Aus der oxidischen Zone des Belebungsbeckens Nord (Zone 2) wurden mit einem Schöpfer oberflächennah Proben entnommen (07.05., 22.05., 09.07.1997).

Das Klärwerk Lüneburg (325.000 EGW) verfügte im Untersuchungszeitraum (1997) noch nicht über eine separate Nitrifikationsstufe. Seit Mitte der siebziger Jahre des vorigen Jahrhunderts wurde dort eine Tropfkörperanlage betrieben, die eine große Nitrifikationsaktivität

aufwies. Diese Anlage bestand aus zwei mit einem Festbett aus Lavagestein gefüllten Tropfkörpern von je 2.500 m³. Die Tropfkörper wurden kontinuierlich über Drehsprenger mit Abwasser aus der Zwischenklärung nach der aeroben biologischen Reinigungsstufe beschickt. Die Proben wurden aus dem Zulauf am Drehsprenger genommen (08.07. und 07.08.1997).

3.6.3 Probentransport und -behandlung

Das Material für Lebendzellzahlbestimmungen und Temperaturversuche sollte keinen starken Temperaturveränderungen ausgesetzt werden. Daher wurden die Proben aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage während des Transportes auf ca. 25-35 °C temperiert.

Der Transport der Proben für die biochemischen Untersuchungen erfolgte auf Eis. Von wässrigen Proben wurde ein Teil sofort nach der Entnahme durch sterile 0,2 µm Membranfilter (Celluloseacetat, Fa. Nalgene) filtriert. Für serologische Untersuchungen wurde ein weiterer Teil der Proben fixiert (wie unter 3.7 beschrieben).

Als Bezugsgröße für die im Biofilm des Nitrifikationsreaktors der Pilotanlage bestimmten Parameter wurde das Volumen des Trägermaterials verwendet. Daher wurde bei jeder Probenahme auch die Dichte des bewachsenen Trägermaterials erfasst. Dazu wurden 5-10 g des feuchten Trägermaterials mit aufgewachsenem Biofilm in einen 100 mL-Messzylinder gegeben und soweit mit Aqua deion. aufgefüllt, bis alle Kugeln des Trägermaterials aufschwammen. Anhand der Skalierung des Zylinders wurde das Volumen abgelesen. Aus Masse (m) und Volumen (V) wurde nach Gleichung (9) die Dichte (ρ) ermittelt.

(9)

$$\rho [mg / L] = \frac{m [mg]}{V [L]}$$

3.7 Fixierung von Zellen und Standortproben

Für biochemische Analysen wurden Proben durch Lagerung bei –20 °C konserviert.

Für Gesamtzellzahlbestimmungen aus Biofilmmaterial und Reinkulturen wurden die Proben durch Zugabe von Natriumacetat (0,3 M) gepufferter Formaldehyd-Lösung mit pH 7,2 fixiert. Die Formaldehyd-Endkonzentration betrug 2 %. Die Proben wurden im Dunkeln bei Raumtemperatur aufbewahrt (WARD, 1982; NEHLS, 1990).

3.8 Analytische Nachweismethoden

3.8.1 Bestimmung von Temperatur, Sauerstoff und pH-Wert

Die Temperatur wurde mit einem elektronischen Thermometer (S 56810, Fa. AMA) bestimmt. Der Sauerstoffgehalt und die Sauerstoffsättigung wurden mit einem Sauerstoffmessgerät (Oxi 91, Fa. WTW) und der pH-Wert mit einem pH-Meter (pH 523, Fa. WTW) ermittelt.

3.8.2 Bestimmung von Ammonium

Der Ammoniumgehalt wurde nach Umsetzung des Ammoniumions mit einer stark alkalischen Tetrajodomercurat(II)-Lösung (Neßler-Reagenz) zu einem Farbstoffkomplex ($[\text{NHg}_2]\text{J}$) photometrisch bestimmt (APHA, 1995).

Tartrat-Lösung

Natrium-Kalium-Tartrat	50 g
Aqua deion.	100 mL
Neßler A-Lösung (Fa. Merck)	5 mL

Nach der Herstellung wurde die Tartratlösung für mehrere Stunden im Dunkeln aufbewahrt und vor Gebrauch durch ein Faltenfilter filtriert.

In ein Reagenzröhrchen mit 5 mL Aqua deion. wurden nacheinander 100 μL Tartratlösung, 100 μL Probe, 100 μL Neßler A-Lösung (Fa. Merck) und 100 μL 27%ige NaOH (Neßler B-Lösung, Fa. Merck) pipettiert, wobei die Ansätze zwischen den einzelnen Schritten jeweils gut durchmischt wurden. Nach einer Inkubationszeit von 5 min wurde die Extinktion des Farbstoffkomplexes in einem Spektralphotometer (Novaspec 4049, Fa. LKB) bei 425 nm in Küvetten von 1 cm Schichtdicke gegen einen ammoniumfreien Blindwert gemessen.

Eine Eichkurve wurde im Bereich von 2-10 mM Ammonium aufgenommen.

3.8.3 Bestimmung von Nitrit

Die Nitritbestimmung wurde nach BREMNER (1965) durchgeführt. Nitritionen bilden mit Sulfanilsäure ein Diazoniumsalz, das mit N-(1-Naphthyl)-ethylendiamindihydrochlorid zu einem roten Farbstoff umgesetzt wird (Azokupplung).

Reagenz A (Diazotierungsreagenz)

Sulfanilamid	0,5 % (w/v)
HCl	2,4 n

Reagenz B (Kupplungsreagenz)

N-(1-Naphthyl)-ethylendiamindihydrochlorid	0,3 % (w/v)
HCl	0,12 n

3.8.3.1 Qualitativer Nitritnachweis

Für einen qualitativen Nachweis von Nitrit wurde eine Mischung von jeweils gleichen Teilen der Reagenzien A und B eingesetzt. In die Vertiefungen einer Mikrotiterplatte wurden jeweils 100 μL Probe gegeben und mit einem Tropfen der Reagenzienmischung versetzt. Bei sofortigem Auftreten einer dunkelvioletten Färbung wurde der Nachweis positiv gewertet. In Zweifelsfällen wurde das Ergebnis durch den quantitativen Nitritnachweis überprüft.

3.8.3.2 Quantitative Nitritbestimmung

Die Nitritkonzentration wurde nach der Modifikation von HARMS (unveröffentlicht) bestimmt. In ein Reagenzröhrchen mit 5 mL Aqua deion. wurden 10 μ L Probe pipettiert. Anschließend wurden 0,2 mL Reagenz A zugegeben und gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur erfolgte die Zugabe von 0,2 mL Reagenz B und 5 mL Aqua deion. Die Ansätze wurden nochmals gut durchmischt und 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem Spektralphotometer (PU 8610, Fa. Philips) bei 543 nm in einer 1 cm-Durchflussküvette (Durchflussvolumen 3 mL) gegen einen nitritfreien Blindwert.

Eine Eichkurve wurde im Bereich von 1 bis 10 mM Nitrit aufgenommen.

3.8.4 Bestimmung von Nitrat

Die Nitratkonzentration wurde durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) nach der Methode von MEINCKE und BERGMANN (unveröffentlicht), wie bei SCHMIDT (1997) beschrieben, durchgeführt.

Laufmittel

Tetrabutylammoniumhydrogensulfat-Puffer (5 mM, pH 7,3)	90 % (v/v)
Methanol	10 % (v/v)

50 μ L Probe wurde durch einen Autosampler (Autosampler 460, Fa. Kontron) auf die HPLC-Trennsäule (125 x 4,6 mm Hypersil 125 5 C 18, Fa. Bischoff) übertragen. Bei einem durchschnittlichen Druck von 70 bar wurde mittels der HPLC-Pumpe 420 (Fa. Kontron) ein Laufmittelstrom von 1 mL/min erzeugt. Die Nitrationen wurden durch einen nachgeschalteten UV-Detektor aufgrund der Änderung der Absorption bei 225 nm bei einer Retentionszeit von 6,5 min detektiert. Nach Eichung des Systems konnte durch Integration der Peakflächen die Nitratkonzentration errechnet werden.

3.8.5 Bestimmung von Protein (Biofilm)

Die Bestimmung des Proteingehaltes von Biofilmmaterial aus dem Nitrifikationsreaktor erfolgte nach der Methode von LOWRY (1951). In alkalischer Lösung bildet sich ein Komplex aus Cu^{2+} -Ionen und jeweils zwei Peptidbindungen. Dieser unterstützt die Reduktion von Molybdat bzw. Wolframat, die in Form ihrer Heteropolymersäuren eingesetzt werden (Folin-Ciocalteus Phenolreagenz), durch vornehmlich Tyrosin, Tryptophan und in geringerem Maße auch Cystein, Cystin und Histidin des Proteins. Dabei wird vermutlich Cu^{2+} im Kupfer-Protein-Komplex zu Cu^+ reduziert, das dann mit dem Folin-Ciocalteus Phenolreagenz reagiert. Nach RAUNKJAER et al. (1994) liefert diese Methode für Proteinbestimmungen im Abwasserbereich die verlässlichsten Ergebnisse.

Lösung A

NaOH	0,5 n
Na ₂ CO ₃	8 % (w/v)
Aqua deion.	

Lösung B

CuSO ₄ x 2H ₂ O	0,05 M
CuSO ₄ x 5H ₂ O	0,05 M
Aqua deion.	

Lösung C

Natrium-Kalium-Tartrat	2 % (w/v)
Aqua deion.	

Lösung A/B/C

Lösung A	90 % (v/v)
Lösung B	5 % (v/v)
Lösung C	5 % (v/v)

Folin-Ciocalteus Phenolreagenz (Fa. Merck)

Etwa 0,1 g bewachsenes Trägermaterial wurde in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 1 mL 0,5 n NaOH versetzt und unter Schütteln 2 Stunden bei 56 °C hydrolysiert (Thermomixer 5436, Fa. Eppendorf). Von jeder Probe wurden drei Parallelansätze untersucht. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Ansätze in einer Tischzentrifuge (Biofuge 13, Fa. Heraeus) zur Abtrennung fester Bestandteile 10 min bei 14.926 x g zentrifugiert. Die Ansätze wurden in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration 1:2 bis 1:5 mit 0,5 n NaOH verdünnt und die Proteinbestimmung mit drei Parallelen aus dem Überstand durchgeführt.

Zu 500 µL Probe wurden 500 µL des A/B/C-Reagenzes pipettiert und gut durchmischt. Nach Inkubation von 15 min bei Raumtemperatur wurde 1,5 mL des Folin-Reagenzes zugegeben, die Ansätze wurden sofort gut durchmischt und für 45 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Extinktion des gebildeten tiefblauen Farbstoffkomplexes mit einem Spektralphotometer (Novaspec 4049, Fa. LKB) bei einer Wellenlänge von 540 nm in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke gegen einen proteinfreien Blindwert gemessen.

Eine Eichkurve wurde mit Eichstandards (BSA-Proteinstandard, Fa. Sigma) im Bereich von 25 µg/mL bis 300 µg/mL BSA aufgenommen.

3.8.6 Bestimmung von Protein (Reinkulturen)

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zellsuspensionen und in zellfreien Extrakten erfolgte photometrisch nach der Methode von BRADFORD (1976), modifiziert von SPECTOR (1978).

Coomassie Brilliant Blue G-250 ist ein Triphenylmethanfarbstoff. Durch Komplexbildung mit Proteinen in saurem Milieu wird der Farbstoff in seiner unprotonierten, anionischen Sulfonat-Form stabilisiert, was das Absorptionsmaximum von 465 zu 595 nm verschiebt. Der Farbstoff bindet dabei recht unspezifisch an kationische und nichtpolare, hydrophobe Seitenketten der Proteine, wobei Wechselwirkungen mit Arginin die größte Bedeutung haben.

Lysispuffer

NaOH	0,15 n
NaCl	0,45 % (w/v)
Aqua deion.	

Bradford-Reagenz

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Fa. Serva)	0,04 % (w/v)
Ethanol	0,50 % (v/v)
o-Phosphorsäure	8,50 % (v/v)
Aqua deion.	

Sedimentierte Zellen wurden in 500 µL Lysispuffer aufgenommen und zur Hydrolyse in einem Heizblock (Thermostat 5320, Fa. Eppendorf) 5 min bei 95 °C inkubiert. Nach Abkühlen auf Eis wurden die Ansätze in einer Tischzentrifuge (Biofuge 13, Fa. Heraeus) zur Abtrennung partikulärer Bestandteile 10 min bei 14.926 x g zentrifugiert. Das Sediment wurde verworfen und die Proteinbestimmung aus dem Überstand durchgeführt.

Zu 100 µL Probe wurden 2 mL Bradford-Reagenz pipettiert und 30 s gut durchmischt. Nach Inkubation von 30 min bei Raumtemperatur wurde die Extinktion mit einem Spektralphotometer (Novaspec 4049, Fa. LKB) bei einer Wellenlänge von 595 nm in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke gegen einen proteinfreien Blindwert gemessen. Von jeder Probe wurden drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

Eine Eichkurve wurde mit Eichstandards (BSA-Proteinstandard, Fa. Sigma) im Bereich von 25 µg/mL bis 200 µg/mL BSA aufgenommen.

3.8.7 Bestimmung von Kohlenhydraten

Die Bestimmung von Kohlenhydraten des Biofilms erfolgte nach der Methode von DUBOIS et al. (1956), modifiziert nach LIU et al. (1973). Kohlenhydrate bilden in Gegenwart von Phenol in Schwefelsäure gelb-braun gefärbte Verbindungen, die spektralphotometrisch gemessen werden.

Phenol-Lösung

Phenol	10 % (w/v)
Aqua deion.	

Schwefelsäure (95-97 %)

Etwa 0,1 g bewachsenes Trägermaterial wurden in 1 mL A. deion. gegeben und mit 1 mL Phenol-Lösung versetzt. Dann wurden 5 mL Schwefelsäure zugegeben und die Ansätze zum Abkühlen 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Feststoffe 10 min bei 4.000 x g abzentrifugiert (Varifuge RF, Fa. Heraeus). Die Extinktion des Überstandes wurde mit einem Spektralphotometer (Novaspec 4049, Fa. LKB) bei einer Wellenlänge von 485 nm in einer Küvette von 1 cm Schichtdicke gegen einen kohlenhydratfreien Blindwert gemessen. Von jeder Probe wurden drei Parallelbestimmungen durchgeführt.

Eine Eichkurve wurde mit Glucose im Bereich von 6,25 µg/mL bis 100 µg/mL aufgenommen.

3.9 Bestimmung der Zellzahl

3.9.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl von Zellsuspensionen

Die Zahl suspendierter Zellen wurde im Lichtmikroskop mit einer Helber-Zählkammer mit einer Tiefe von 0,02 mm bestimmt. Die Zählung erfolgte bei 400facher Vergrößerung im Durchlicht. Zur statistischen Absicherung wurden in Abhängigkeit von der Zellzahl von jeder Probe 4-6 Kammerfüllungen ausgewertet, so dass insgesamt mindestens 400 Zellen gezählt wurden (SCHALLENBERG et al., 1989).

3.9.2 Bestimmung der Zahl vermehrungsfähiger Ammoniakoxidanten

Die Zahl vermehrungsfähiger Zellen der Ammoniakoxidanten wurde mit der MPN (= **most probable number**)-Methode bestimmt (COLLINS und LYNE, 1970).

Die Zellen des Biofilms mussten zunächst vereinzelt werden. 0,1-0,25 g bewachsenes Trägermaterial wurden in einem 20 mL PS-Schraubdeckelröhrchen (Fa. Greiner) mit 10 mL sterilem PBS-Puffer versetzt und mit einem Ultra-Turrax (T25, Fa. IKA) dreimal 30 sec. bei 11.000 Upm homogenisiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit PBS-Puffer in dezimaler Reihe verdünnt (SCHMIDT UND BELSER, 1965). Pro Verdünnungsstufe wurden 10 Reagenzröhrchen (13,5 ml Medium Ib) mit jeweils 0,5 mL Probe beimpft. Die Röhrchen wurden 8 Wochen (Biofilmproben) bzw. 12 Wochen (Temperaturversuche mit Reinkultu-

ren) bei 28 °C inkubiert und durch qualitativen Nitritnachweis auf Wachstum geprüft (SOWITZKI, 1992). Bei hoher Nitritkonzentrationen im Ausgangsmaterial wurde eine quantitative Nitritbestimmung durchgeführt.

Aus der Zahl der positiven Röhrchen wurde nach CORNISH und FISHER (1937) mit dem PC-Programm „Most probable number calculator“, Vers. 4.03 (© Albert J. Klee-Risk Reduction Engineering Laboratory, United States Environmental Protection Agency, Cincinnati, Ohio, 1995) die wahrscheinliche Zellzahl der Ammoniak oxidierenden Bakterien ermittelt. Die Standardabweichung wurden nach LOYER und HAMILTON (1984) berechnet.

3.9.3 Bestimmung der IF-Zellzahl von Ammoniakoxidanten im Biofilm

Die Zellzahl verschiedener Stämme Ammoniak oxidierender Bakterien im Biofilm aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage wurde mit der Immunofluoreszenz (IF)-Färbetechnik auf Polycarbonatfiltern bestimmt. Dabei wurde die als „Sandwich“-Methode bezeichnete indirekte Markierung verwendet (BOHLOOL und SCHMIDT, 1980). Die Präparate wurden unter dem Fluoreszenzmikroskop ausgezählt.

Für die Untersuchungen wurden zehn polyklonale Antiseren gegen Ammoniak oxidierende Bakterien eingesetzt. Acht Antiseren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Harms (Institut für Allgemeine Botanik, Abteilung für Mikrobiologie) zur Verfügung gestellt. Zwei weitere Antiseren wurden für diese Arbeit durch die Fa. Eurogentec hergestellt. Die Seren wurden vor ihrer Verwendung mit PBS-Puffer bis zu der Stufe verdünnt, bei der im homologen System noch maximale Fluoreszenz zu erzielen war (=spezifisches Antiserum, YOSHIOKA et al., 1982). Dadurch konnten unspezifische Antikörperreaktionen minimiert werden. Alle verwendeten Puffer wurden frisch hergestellt und durch 0,2 µm Membranfilter (Cellulosemischester, Fa. Schleicher & Schüll) filtriert.

PBS-Puffer (wie unter 3.5 beschrieben)

Gelatine-Lösung (2 %)

Die Gelatine wurde in Aqua deion. verflüssigt und nach Einstellung des pH-Wertes auf pH 10,5 für 10 min bei 110 °C hydrolysiert. Danach wurde der pH-Wert erneut auf pH 10,5 eingestellt. Die Gelatine-Lösung wurde in Reagenzröhrchen portioniert und bis zur Verwendung bei –20 °C gelagert.

CB-Puffer (Carbonat-Bicarbonat-Puffer) nach DAWSON et al. (1969)

Stammlösungen

A) $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times 10 \text{ H}_2\text{O}$	0,5 M
Aqua deion.	
B) NaHCO_3	0,5 M
Aqua deion.	

Arbeitslösung

400 mL der Stammlösung A wurden mit ca. 600 mL Stammlösung B vermischt, bis ein pH-Wert von 9,6 erreicht war.

3.9.3.1 Probenvorbereitung

Zunächst war eine Vereinzelung der Zellen erforderlich, wobei die Zellintegrität nicht beeinträchtigt werden durfte. Dazu wurden 0,03-0,05 g des bewachsenen Trägermaterials in ein 20 mL PS-Schraubdeckelröhrchen (Fa. Greiner) überführt und mit 10 mL PBS-Puffer (vgl. 3.5) versetzt. Zunächst wurde das Material dreimal bei 11.000 Upm mit einem Ultra-Turrax (T25, Fa. IKA) für jeweils 30 s homogenisiert. Das Homogenat wurde anschließend insgesamt 2,5 min mit Ultraschall behandelt (Low-Intensity, 30 sec.-Intervall, Biorupter UCD 130, Fa. Tosho Denki Co., ltd, Japan). Verbliebene Zellaggregate wurden durch 10 min Zentrifugation bei 600 x g (Varifuge RF, Fa. Heraeus) sedimentiert. Der Überstand wurde auf Eis gelagert. Das Sediment wurde erneut in 5 mL PBS-Puffer resuspendiert und insgesamt 5 min mit Ultraschall behandelt (s.o.). Anschließend wurden die Homogenate vereinigt.

3.9.3.2 Herstellung von IF-Präparaten

Mit 100-300 µL des Homogenats wurden IF-Präparate auf Polycarbonatfiltern nach SOWITZKI (1986) hergestellt. Der feuchte Filter wurde auf einen Objektträger gelegt, mit einem Tropfen Fluoprep (Eindeckflüssigkeit für die Immunofluoreszenz, Fa. bioMerieux) versehen und mit einem Deckglas abgedeckt. Die fertigen Präparate konnten im Dunkeln bei 4 °C einige Tage gelagert werden.

3.9.3.3 Auswertung von IF-Präparaten

Die Auswertung der IF-Präparate erfolgte durch Epifluoreszenzmikroskopie mithilfe eines Zeiss Universal Mikroskops, ausgerüstet mit einer HBO 50 Quecksilberhochdrucklampe, einem Auflichtkondensor III RS und einem Ölimmersionsobjektiv Planapo 63/1,4 unter der Verwendung der folgenden Filterkombination:

Erregerfilter: BP 450-490

Farbteiler: FT 510

Sperrfilter: LP 515-565

Für die Auszählung wurde ein Netzkular (Fa. Zeiss) verwendet, das mit einem Objektmikrometer (Fa. Zeiss) geeicht worden war. Die Auswertung erfolgte durch Einstufung der Fluoreszenz von 0 = keine Fluoreszenz bis 4+ = maximale Fluoreszenz (ZAMBON et al., 1984). Es wurden nur Zellen gezählt, die eine Fluoreszenzintensität von 4+ oder 3+ aufwiesen. Pro Filter wurden mindestens 400 Zellen (SCHALLENBERG et al., 1989) bzw. bei geringer Zelldichte 100-200 Felder (SCHMIDT, 1974, WARD und CARLUCCI, 1985) ausgezählt. Von jeder Probe wurden mindestens zwei Filter ausgewertet.

3.10 Mikroskopische Untersuchungen

3.10.1 Lichtmikroskopie

Unbewachsenes Trägermaterial und Trägermaterial mit Biofilm wurden zunächst lichtmikroskopisch bei geringer Vergrößerung (8fach) mit einem Stereomikroskop (SV8, Fa. Zeiss) charakterisiert.

3.10.2 Epifluoreszenzmikroskopie nach DAPI-Färbung

Die Biofilmstruktur wurde nach Anfärbung der Zellen mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) nach PORTER und FEIG (1980) untersucht. DAPI ist ein interkalierender DNA-Farbstoff, der durch Anregung mit UV-Licht blau fluoresziert.

DAPI- Färbelösung

4',6'-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	0,01 % (w/v)
Formaldehyd	2,0 % (v/v)
Aqua deion.	

PBS-Puffer (wie unter 3.5. beschrieben)

Bewachsenes Trägermaterial wurde 20 min im Dunkeln in der DAPI-Färbelösung inkubiert. Überschüssiger Farbstoff wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer entfernt. Anschließend wurden mit einer Rasierklinge Querschnitte des Biofilms angefertigt. Diese wurden sofort auf einen Objektträger gelegt, mit einem Tropfen Fluoprep (Eindeckflüssigkeit für die Immunofluoreszenz, Fa. bioMerieux) versehen und mit einem Deckglas abgedeckt.

3.10.3 Bestimmung respirationsaktiver Zellen

Die Verbindung 5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid (CTC) ist in ihrer oxidierten Form farblos, nicht fluoreszierend und wasserlöslich. Durch Reduktion zu einem Formazan geht CTC in eine rotfluoreszierende, wasserunlösliche, kristalline Verbindung über. In Zellen kann CTC als terminaler Elektronenakzeptor fungieren. Die intrazellulär ausgefällten, rotfluoreszierenden Formazankristalle zeigen die Atmungsaktivität der Zellen an (SEVERIN et al., 1985). Die Bestimmung wurde nach RODRIGUEZ et al. (1992) durchgeführt.

PBS-Puffer (wie unter 3.5. beschrieben)

CTC- Lösung

5-Cyano-2,3-ditolyltetrazoliumchlorid (CTC)	5 mM
PBS-Puffer	

DAPI- Färbelösung (wie unter 3.10.2 beschrieben)

Bewachsenes Trägermaterial wurde 4 Stunden im Dunkeln bei 28 °C in der CTC-Lösung inkubiert. Danach wurde der Biofilm einmal mit PBS-Puffer gewaschen und wie oben mit DAPI gefärbt und weiterbehandelt.

3.10.4 Phasenkontrastmikroskopie

Zur morphologischen Einordnung von Isolaten wurden Zellen aus exponentiell wachsenden Kulturen verwendet. Zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf die Zellmorphologie wurden Zellen eingesetzt, die 24 Stunden bei verschiedenen Temperaturen inkubiert worden waren. Nach dem Abernten (vgl. 3.5) wurde das Material bis zur mikroskopischen Analyse maximal 48 Stunden dunkel bei 4 °C in PBS-Puffer gelagert. Eine 3 %ige Agarlösung (Agar Noble, Fa. Difco) wurde in dünner Schicht auf einen fettfreien Objektträger aufgetragen. Nach dem Erstarren des Agars wurden die Zellen auf der Agaroberfläche immobilisiert (WATSON, 1971).

3.10.5 Mikroskopische Auswertung

Die Auswertung der Präparate erfolgte mit einem Zeiss Universal Mikroskop. Für fluoreszenzmikroskopische Auswertungen wurde eine HBO 50 Quecksilberhochdrucklampe, ein Auflichtkondensor III RS und ein Ölimmersionsobjektiv Neofluar 10/0,3 oder ein Ölimmersionsobjektiv Neofluar 25/0,8 verwendet. Folgender Filterkombination wurde eingestellt:

Erregerfilter: BP 365 Farbteiler: FT 395 Sperrfilter: LP 397

Die Auswertung der Phasenkontrastpräparate erfolgte im Phasenkontrastmikroskop mit dem Objektiv Ph 3, Planapo 63 (Fa. Zeiss).

3.10.6 Dokumentation mikroskopischer Präparate

Die fotografische Dokumentation der mikroskopischen Präparate erfolgte mit einer Kleinbild-Aufsetzkamera (M35, Data Back, Fa. Yashica), die mit einem automatischen Belichtungsgerät (MC 63, Fa. Zeiss) verbunden war. Für die Aufnahmen fluoreszenzmikroskopischer Präparate wurden Fabdiafilme (Kodak Ektachrome, ISO 200/24°) verwendet. Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen wurden auf Schwarzweißfilmen (Ilford PanF, 50 ISO) dokumentiert.

3.10.7 Ermittlung der Zellgröße

Die Zellgröße wurde aus Phasenkontrastaufnahmen ermittelt. Die Negative wurden mit einem Scanner (ScanMaker 35t plus, Fa. Microtek) digitalisiert. Nach definierter Vergrößerung der eingescannten Negativflächen wurden die Zellen mit einem Lineal vermessen. Aus diesen Werten konnten die Zellgrößen errechnet werden. Zur statistischen Absicherung der Ergebnisse wurden mindestens 500 Zellen vermessen.

3.11 Isolierung und Charakterisierung von Ammoniakoxidanten

3.11.1 Isolierung aus dem Biofilm des Pilotreaktors

Die Isolierung von Ammoniak oxidierenden Bakterien aus dem Biofilmmaterial des Pilotreaktors erfolgte mit der Plattenmethode (HARMS et al., 1976). Anreicherungskulturen wurden mit 5 mL eines ausnitrifizierten MPN-Röhrchens der höchsten positiven Verdünnungsstufe oder 0,1 mg bewachsenem Trägermaterial beimpft und stehend bei 33 °C inkubiert. Das

Wachstum der Kultur wurde anhand der Nitritbildung verfolgt. Nach Bildung von 5-7 mM Nitrit wurde auf Ib-Agar ausplattiert. Nach 4-6 Wochen erfolgte die Abimpfung von isoliert stehenden Kolonien auf Stammkulturröhrchen. Nitrifizierende Isolate wurden anschließend mikroskopisch auf Einheitlichkeit überprüft und nochmals ausplattiert. Bei einheitlicher Koloniemorphologie und negativem Hefewassertest (3.4) wurden die Isolate als Reinkultur angesehen.

3.11.2 Serologische Charakterisierung

Die serologische Charakterisierung von isolierten Stämmen erfolgte mit der Immunofluoreszenzmethode durch Kreuzreaktionstests auf Objektträgern mit insgesamt 9 spezifischen Antiseren gegen Ammoniak oxidierende Bakterien wie bei SOWITZKI (1986) und NEHLS (1990) beschrieben. Sieben Antiseren wurden freundlicherweise von Herrn Dr. H. Harms (Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik, Abteilung für Mikrobiologie) zur Verfügung gestellt.

Zwei Antiseren gegen Eigenisolate wurden durch die Firma Eurogentec durch Immunisierung von Kaninchen mit ganzen Zellen nach dem Immunisierungsprotokoll von SOWITZKI (1986) gewonnen. Auch die Vorbereitung der Zellsuspensionen erfolgte nach SOWITZKI (1986).

3.12 Nitritbildung von Biofilmmaterial

3.12.1 Bestimmung des Nitrifikationspotentials

Zur Ermittlung der maximal möglichen Nitrifikationsleistung von Biofilmmaterial aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage wurden etwa 0,5 g bewachsenes Trägermaterial in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit 50 mL Medium IIa überführt und 9,5 Stunden in einem Longitudinal-Schüttelwasserbad (SBK 25, 120 Schwingungen/min, Amplitude = 5 cm, Fa. Salvis) bei 33 °C inkubiert.

Nach 1,5 Stunden Vorinkubationszeit wurde die erste Probe und dann im Abstand von 60 min weitere Proben entnommen. In den Proben wurde zur Erfassung der Stoffwechselleistung jeweils die Nitritkonzentration bestimmt, wie in 3.8.3.2 beschrieben. Das Nitrifikationspotential wurde aus der linearen Rate der Nitritzunahme errechnet.

3.12.2 Einfluss der Temperatur auf die Nitritbildung

Zur Ermittlung des Temperatureinflusses auf die Nitritbildung von Biofilmproben wurden etwa 0,25 g Trägermaterial mit Biofilm in 100 mL-Erlenmeyerkolben mit 50 mL Medium IIa überführt und in Longitudinal-Schüttelwasserbädern (SBK 25, 120 Schwingungen/min, Amplitude = 5 cm, Fa. Salvis) bei Temperaturen von 28 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C und 40 °C für eine Woche inkubiert.

In regelmäßigen Abständen wurde die Nitritbildung der Ansätze als Maß für die Stoffwechselleistung erfasst. Die Probenahme erfolgte in den ersten 10 Versuchsstunden im Abstand von zwei Stunden, danach im Abstand von 24 Stunden.

3.13 Einfluss der Temperatur auf *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14)

Der Einfluss der Temperatur auf die Physiologie, Morphologie und die Zusammensetzung des Zellproteins von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) wurde durch Inkubationsversuche in statischer Kultur untersucht. Die Inkubation der Ansätze erfolgte in Longitudinal-Schüttelwasserbädern (SBK 25, Fa. Salvis) bei verschiedenen Temperaturen. Die Versuchstemperaturen wurden regelmäßig kontrolliert. Die Abweichung betrug maximal $\pm 0,2$ °C. Der Sauerstoffeintrag erfolgte durch die mechanische Schüttelbewegung (120 Schwingungen/min, Amplitude = 5 cm). Die Sauerstoffkonzentration betrug mindestens 6 mg/L O₂. Bei jeder Versuchstemperatur wurden drei Parallelansätze inkubiert. Jeder Versuch wurde dreimal durchgeführt.

Die Versuche wurden jeweils mit exponentiell wachsenden Zellen aus einer Massenzucht bei 50 mM NH₄Cl, pH-Wert von pH 7,8 mit $1-3 \times 10^6$ Zellen/mL oder $1-1,5 \times 10^7$ Zellen/mL durchgeführt. Zum Konstanthalten des pH-Wertes wurde HEPES-Puffer in einer Konzentration von 0,1 M zugesetzt.

Die Anzuchtsuspension wurde ohne Zentrifugation direkt in die Versuche eingesetzt, um Stressbedingungen jeder Art vor Versuchsbeginn zu vermeiden. Zur Gewährleistung der Zellzahl wurden die Anzuchten jeweils dann für die Versuche eingesetzt, wenn sie 1-3 mM Nitrit (für die Versuche mit einer Zellzahl von $1,0-3,0 \times 10^6$ Zellen/mL) bzw. 5-7 mM Nitrit (für die Versuche mit einer Zellzahl von $1,0-1,5 \times 10^7$ Zellen/mL) gebildet hatten.

Unter sterilen Bedingungen wurden nacheinander in eine 2 L-Schottflasche gegeben:

HEPES-Stammlösung	1 M, pH 7,9	200 mL
Medium IIa (ohne NH ₄ Cl)	doppelt konzentriert	200 mL
NH ₄ Cl-Stammlösung	5000 mM	20 mL
Massenzucht	$1,0-3,0 \times 10^6$ Zellen/mL	
	bzw. $1,0-1,5 \times 10^7$ Zellen/mL	ad 2000 mL

Nach Durchmischung wurden jeweils 100 mL der Zellsuspension in 300 mL-Erlenmeyerkolben, bzw. 400 mL in 1 L-Erlenmeyerkolben überführt. Die Versuchsansätze wurden bei Temperaturen von 28–52 °C in Schüttelwasserbädern inkubiert. Die Dauer der Versuche betrug mindestens 72 und höchstens 166 Stunden. Der pH-Wert sank im Versuchsverlauf auf minimal pH 7,3.

In den Kolben wurden in regelmäßigen Abständen die Nitritbildung, der Proteingehalt, die Gesamtzellzahl und die MPN-Zellzahl bestimmt (Tab. 2).

Tab. 2 Parameter zur Untersuchung des Temperatureinflusses auf *Nitrosomonas eutropha* (Nm14), x = 4-8 Stunden

Bestimmung	Probenahmezeitpunkt [Inkubationsstunden]	Probenvolumen u. –aufarbeitung	Analyse	Methode (beschrieben unter)
Nitritkonzentration	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, (24 + x), 48, (48 + x), 72, (72 + x) usw.	0,5 mL, auf Eis gekühlt (0 °C)	Photometrische, quantitative Nitritbestimmung	0
Proteingehalt	0, 8, 16, 24, 48, 72, 96 usw.	25 mL, zentrifugiert	Proteinbestimmung	3.8.6
Gesamtzellzahl	0, 8, 16, 24, 48, 72, 96, usw.	0,45 mL, mit 20 % Formaldehyd fixiert	Bestimmung der Gesamtzellzahl	3.7 3.9.1
MPN-Zellzahl	0, 24, 48, 72, 96 usw.	5 mL	Bestimmung der MPN-Zellzahl	3.9.2

Zur Ermittlung des Proteingehaltes wurden 25 mL Zellsuspension in 50 mL Zentrifugenröhrchen 30 min bei 20 °C bei 17.387 x g (Centrikon H-401, Rotor JA 8.24, Fa. Kontron) zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellsediment mit 1,5 mL PBS-Puffer gewaschen und nochmals für 20 min in einer Tischzentrifuge (Biofuge 13, Fa. Heraeus) sedimentiert. Das gesamte Zellsediment wurde für die Proteinbestimmung (beschrieben in 3.8.6) verwendet.

3.14 Induktion von Thermotoleranz

Ammoniakoxidanten aus einer Massenzucht wurden, wie unter 3.13 beschrieben, zur Induktion von Hitzeschockproteinen bei einer superoptimalen Temperatur inkubiert. Um zu prüfen, ob durch Hitzeschockproteine die Überlebensfähigkeit bei Letaltemperaturen erhöht war, wurden die Kulturen anschließend bei einer letalen Temperatur inkubiert. Als Kontrolle dienten Ansätze, die ohne vorherige Induktion von Hitzeschockproteinen nur bei der Letaltemperatur inkubiert worden waren. In regelmäßigen Abständen wurden in den Kolben die Lebendzellzahlen mit der MPN-Methode (beschrieben in 3.9.2) bestimmt. Thermotoleranz konnte aus dem Vergleich der Absterberaten der Kulturen ohne bzw. nach Induktion von Hitzeschockproteinen abgeleitet werden.

In weiteren Versuchen wurde die Abhängigkeit der Thermotoleranz von der Induktionszeit der Hitzeschockproteine untersucht. Dazu wurde die Bildung der Stressproteine durch unterschiedliche Inkubationszeiten der Ansätze bei einer ausgewählten, superoptimalen Temperatur induziert. Anschließend wurden die Kulturen 48 Stunden bei einer Letaltemperatur inkubiert und danach in den Kolben die Lebendzellzahl mit der MPN-Methode bestimmt (beschrieben in 3.9.2). Die Thermotoleranz wurde durch den Vergleich der Überlebenszellzahl von Ansätzen nach bzw. ohne vorherige Induktion von Stressproteinen charakterisiert.

3.15 Charakterisierung der Stressreaktion

3.15.1 Induktion von Stressproteinen

Zur Induktion der Hitzeschockantwort wurden exponentiell wachsende Kulturen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14), wie unter 3.13 beschrieben, mit HEPES gepuffert und mit 50 mM Ammonium versetzt. Jeweils 400 mL der Suspension wurde in 1L Erlenmeyerkolben bei Temperaturen von 28 °C, 33 °C, 35 °C, 37 °C, 38 °C, 40 °C und 43 °C 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet (wie in 3.5 beschrieben) und die Proteine aus dem Zytoplasma analysiert.

Zur Untersuchung der Bedeutung der Inkubationszeit für die Bildung von Stressproteinen wurden in weiteren Versuchen jeweils 10 Ansätze bei 38 °C und 40 °C inkubiert. Nach 0,5, 1, 2, 4, 8, 16, 24, 48, 72 und 120 Stunden wurden die Zellen eines Ansatzes jeder Temperaturstufe geerntet und die Zusammensetzung der Zytoplasmaproteine analysiert.

3.15.2 Herstellung zellfreier Extrakte

Zur Charakterisierung der löslichen Proteine des Zytoplasmas wurden zellfreie Extrakte nach NEHLS (1995) hergestellt.

Zunächst wurde das Zellsediment in 100-400 µL Aqua deion. (MilliQ) aufgenommen. Die Zellsuspension wurde insgesamt 15 min mit Ultraschall behandelt (hohe Intensität, 30 s Intervall, Biorupter UCD-130, Fa. Tosho Denki Co. Ltd., Japan). Die Abtrennung ganzer Zellen und grober Zelltrümmer erfolgte durch anschließende Zentrifugation (3 min bei 14.926 x g, Biofuge 13, Fa. Heraeus). Danach wurde Material für die Proteinbestimmung abgenommen. Die löslichen Zytoplasmaproteine wurden bei – 20 °C gelagert.

3.15.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Proteine des Zytoplasmas wurden durch die eindimensionale SDS-PAGE nach der Methode von LAEMMLI (1970) modifiziert nach NEHLS (1995) analysiert. Es wurde ein diskontinuierliches System mit einer Polyacrylamidkonzentration von 12 % (w/v) im Trenngel und von 4 % (w/v) im Sammelgel verwendet. Die Gele (7 cm x 8 cm x 0,75 cm) wurden mit Hilfe des Mini-Protean II Systems (Fa. Bio-Rad) hergestellt.

ProtogelTM (Fa. National Diagnostics, Manville, New Jersey, USA)

Acrylamid	30,0 % (w/v)
N,N-Methylen-Bisacrylamid	0,8 % (w/v)

Tris-Puffer, pH 8,8

Tris-HCl (pH 8,8)	1,5 M
Aqua deion. (MilliQ)	

Tris-Puffer, pH 6,8

Tris-HCl (pH 6,8)	0,5 M
Aqua deion. (MilliQ)	

SDS-Lösung

SDS (Natriumdodecylsulfat)	10,0 % (w/v)
Aqua deion. (MilliQ)	

Laufpuffer

Tris	26 mM
Glycin	192 mM
SDS	0,1 % (w/v)
Aqua deion. (MilliQ), pH 8,3 - 8,6	

Trenngel (12 % Acrylamid)

Protogel™	4,0 mL
Tris-Puffer, pH 8,8	2,5 mL
SDS-Lösung	0,1 mL
Aqua deion. (MilliQ)	3,35 mL

Sammelgel (4 % Acrylamid)

Protogel™	0,52 mL
Tris-Puffer, pH 8,8	1,0 mL
SDS-Lösung	0,04 mL
Aqua deion. (MilliQ)	2,4 mL

Die Polymerisation von Trenngel und Sammelgel erfolgte nach Zugabe von je 5 µL TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, Fa. Bio-Rad) und 50 µL einer 10%igen Ammoniumpersulfat-Lösung (Fa. Bio-Rad).

Die angegebene Menge war ausreichend für zwei Gele. Die Gelkassetten wurden mit dem Trenngel befüllt und mit wassergesättigtem Isobutanol überschichtet, um eine ebene Oberfläche zu erhalten. Nach einer Polymerisationszeit von 30 min wurde das Isobutanol durch Waschen mit A. deion. entfernt. Danach wurde das Sammelgel aufgetragen und Gelkämme eingesetzt. Nach 30minütiger Polymerisation wurden die Gelkassetten in die Elektrophoresekammer (Mini-Protean II-Kammer, Fa. Bio-Rad) eingesetzt und die Kammer mit dem Laufpuffer befüllt.

Probenpuffer

Glycerin	10,0 % (w/v)
SDS	2,0 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	1,0 % (w/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
Tris-HCl (pH 6,8)	0,625 M
Aqua deion. (MilliQ)	

Die Proben wurden vor der Elektrophorese mit Probenpuffer so verdünnt, dass jede Gel-tasche 5 µg Protein (für Blots) bzw. 20 µg Protein (für Coomassie-Färbung) enthielt. Vor Auftragen der Proben in die Geltaschen wurden sie 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Auf jedes Gel wurde ein Molekulargewichtsmarker aufgetragen (SDS-Page standards, low range, Fa. Bio-Rad), der sich aus folgenden Proteinen zusammensetzte: Phosphorylase b (M_r : 97.400), Rinderserumalbumin (M_r : 66.200), Ovalbumin (M_r : 45.000), Carbonsäure-Anhydrase (M_r : 31.000), Trypsin-Inhibitor (M_r : 21.500) und Lysozym (M_r : 14.400).

Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Stromstärke von 20 mA pro Gel (Spannungsquelle: EPS 500/400, Fa. Pharmacia) durchgeführt.

3.15.4 Färbung von Gelen

Die Gele wurden mit Coomassie-Blau (Fa. Serva) nach der Methode von WEBER und OSBORN (1969) gefärbt.

Färbelösung

Coomassie Brilliant Blue R250	0,07 % (w/v)
Ethanol (96 %)	40 % (v/v)
Essigsäure (100 %)	20 % (v/v)
Aqua deion. (MilliQ)	

Entfärber

Wie Färbelösung, jedoch ohne Coomassie Brilliant Blue.

Zur Färbung wurden die Gele bei Raumtemperatur über Nacht in der Färbelösung inkubiert. Danach wurden sie solange im Entfärber inkubiert, bis der Hintergrund entfärbt war. Dabei wurde die Entfärberlösung mehrfach gewechselt. Die Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit Aqua deion. gestoppt.

3.15.5 Western-Blotting

Die immunologische Identifizierung von Stressproteinen und der Ammoniummonooxygenase (AMO) erfolgte mit polyklonalen Antikörpern. Die gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden durch die als Western-Blotting bezeichnete Methode nach TOWBIN et al. (1979) auf eine Blotmembran transferiert. Zum Nachweis von Stressproteinen wurde eine Nylonmembran (Porengröße 0,45 μm , Biotodyne, Fa. Pall Bio Support), zum Nachweis der AMO eine Cellulosenitratmembran (Porengröße 0,2 μm , Fa. Biometra) verwendet. Der Elektrottransfer erfolgte im Semi-Dry-Verfahren horizontal in einem diskontinuierlichen Puffersystem. Der Aufbau zur elektrophoretischen Übertragung ist in Abb. 4 dargestellt.

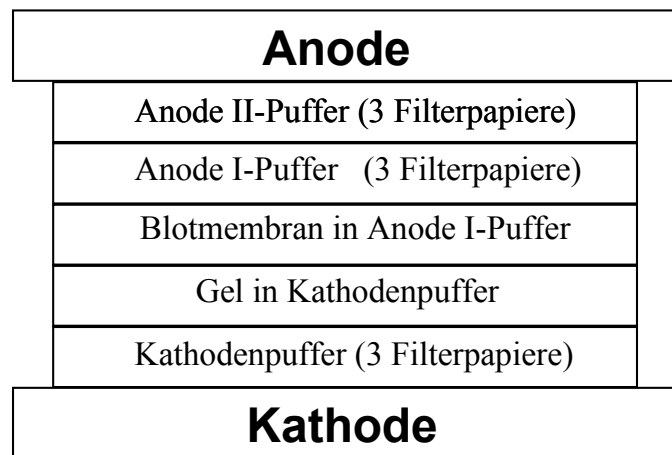


Abb. 4 Aufbau für den elektrophoretischen Transfer von Proteinen.

Die Proteine wurden für eine Stunde bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² (Spannungsquelle: EPS 500/400, Fa. Pharmacia) nach KYHSE-ANDERSON (1984), modifiziert nach SOWITZKI (1992) auf die Blotmembran transferiert (Blotgerät Pegasus, Fa. Phase). Zur Kontrolle des Blottransfers wurde eine Färbung des Gels durchgeführt.

Kathodenpuffer

Tris-HCl (pH 9,4)	25 mM
6-Aminohexansäure	40 mM
Ethanol	20 % (v/v)
Aqua deion. (MilliQ)	

Anode I-Puffer

Tris-HCl (pH 10,4)	30 mM
Ethanol	20 % (v/v)
Aqua deion. (MilliQ)	

Anode II-Puffer

Tris-HCl (pH 10,4)	300 mM
Ethanol	20 % (v/v)
Aqua deion.(MilliQ)	

3.15.5.1 Immunofärbung der Blotmembran I (Stressproteine)

Stressproteine wurden auf der Blotmembran durch indirekte Immunofärbung mit spezifischen polyklonalen Antiseren identifiziert. Folgende Antikörper aus Kaninchen wurden eingesetzt.

anti-HSP 60	Fa. StressGen, Can.
anti-GroES	Fa. StressGen, Can.
anti-DnaK (entspricht HSP 70)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Bill Ashraf (Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, Großbritannien)
anti-DnaJ (entspricht HSP 20)	freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Bill Ashraf (Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, Großbritannien)

Zur Kontrolle der Seren wurden parallel zu den Zelllysaten die Hitzeschockproteine HSP 60 aus *Synechococcus* sp., GroES, (Fa. StressGen, Can), DnaK und DnaJ (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Herrn Dr. Bill Ashraf, Department of Biomedical Sciences, University of Bradford, Großbritannien) auf Blotmembranen transferiert.

Phosphat-Puffer (SOWITZKI, 1992)

NaCl	0,13 M
Na ₂ HPO ₄	0,01 M
Aqua deion. (MilliQ)	
pH 7,4	

Blocking-Puffer

Magermilchpulver in Phosphat-Puffer	5 % (w/v)
--	-----------

Substratlösung

Imidazol	0,1 % (w/v)
3,3'-Diaminobenzidin	0,01 % (w/v)
Wasserstoffperoxid in Phosphat-Puffer	0,015 % (v/v)

Zunächst wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Blotmembran durch 30 min Inkubation in Blocking-Puffer gesättigt. Dann wurde die Membran eine Stunde mit dem spezifischen Antiserum (1:1000 verdünnt mit Blocking-Puffer) inkubiert. Nicht-gebundene Antikörper wurden durch Waschen der Membran (3 x 15 min) mit Phosphat-Puffer entfernt. Zur Detektion der gebundenen Antikörper wurde Anti-Rabbit IgG-Peroxidase-Konjugat-Lösung (Fa. Sigma) 1:1000 verdünnt mit Blocking-Puffer zur Membran gegeben und 30 min inkubiert. Zur Entfernung nicht-gebundener Antikörper wurde die Membran nochmals 3 x 10 min mit Phosphat-Puffer gewaschen. Die Banden wurden durch Inkubation in frisch angesetzter Substratlösung für 1-10 min sichtbar gemacht. Bei ausreichender Farbtintensität der Banden wurde die Reaktion durch Waschen mit Aqua deion. gestoppt.

3.15.5.2 Immunofärbung der Blotmembran II (AMO)

Auch der immunologische Nachweis der AMO erfolgte durch indirekte Immunofärbung. Dazu wurden spezifische polyklonale Antikörper gegen die Untereinheiten AmoA und AmoB von *Nitrosomonas eutropha* N904 verwendet (PINCK et al., 2001), die freundlicherweise von Herrn Prof. Dr. E. Bock (Universität Hamburg, Institut für Allgemeine Botanik, Abteilung für Mikrobiologie) zur Verfügung gestellt wurden. Die sekundären Antikörper waren mit Alkalischer Phosphatase gekoppelt. Die Durchführung des immunologischen Nachweises erfolgte wie bei PINCK et al. (2001) beschrieben.

3.15.6 Dokumentation von Polyacrylamidgelen und Blotmembranen

Die Gele wurden mit einem Geltrocknungssystem (Gel air-drying System, Fa. Bio-Rad) zwischen zwei Cellophanfolien eingespannt und 24 Stunden bei Raumtemperatur getrocknet. Blotmembranen wurden zwischen saugfähigem Papier einige Stunden im Dunkeln getrocknet.

Die Dokumentation der getrockneten Gele und Blots erfolgte durch Scannen (ScanMaker E6, Fa. Microtek). Für densitometrische Auswertungen wurden aus den Scans mit dem Programm ScanPack II (Fa. Biometra) Densitogramme erstellt. Aus den Migrationsstrecken der Proteine des Proteinstandards wurden die relativen Molekulargewichte der Stressproteine berechnet. Aus den Peakflächen einer Proteinbande auf verschiedenen Spuren eines Gels waren vergleichende Aussagen zur relativen Proteinmenge bei verschiedenen Inkubationstemperaturen und -zeiten möglich.

3.16 Berechnungen

3.16.1.1 Spezifische Aktivität

Die **spezifische Aktivität a** ist die Menge an Substrat, die von den Mikroorganismen bezogen auf eine definierte Proteinkonzentration, in einem bestimmten Zeitintervall umgesetzt wird (10).

$$(10) \quad a \left[\frac{\mu \text{ mol}}{\text{g} \cdot \text{h}} \right] = \frac{S [\mu \text{ mol}]}{P [\text{g}] \cdot \Delta t [\text{h}]}$$

a = spezifische Aktivität
 S = Substratverbrauch (gemessen als Nitritbildung)
 P = Proteinmenge
 Δt = Zeitintervall

In die Berechnungen wurde ein Durchschnittswert für die Proteinmenge eingesetzt, da die Proteinmenge während des untersuchten Zeitintervalls zunahm. Als mittlere Proteinmenge wurde der Mittelwert aus den zu Beginn und am Ende des Zeitintervalls ermittelten Proteinmengen errechnet.

3.16.1.2 Zellertragskoeffizient

Der **Zellertragskoeffizient Z** entspricht dem Quotienten aus Proteinzunahme und Substratverbrauch (11).

$$(11) \quad Z \left[\frac{\text{mg}}{\text{mmol}} \right] = \frac{\Delta P [\text{mg} \cdot \text{h}]}{\Delta S [\text{mmol} \cdot \text{h}]}$$

Z = Zellertragskoeffizient
 ΔP = Proteinzunahme
 ΔS = Substratverbrauch (gemessen als Nitritbildung)

3.16.1.3 Nutzeffekt

Der **Nutzeffekt n** ist der bei der Oxidation des Substrates freiwerdende Energiebetrag, der von den Organismen direkt für das Zellwachstum bzw. die Assimilation von Kohlendioxid genutzt werden kann (ENGEL, 1957; KRÜMMEL, 1978). Der Nutzeffekt kann wie folgt berechnet werden (12):

$$(12) \quad n = \frac{C_{\text{red}} [\text{mol}] \cdot K_c [\text{kJ}]}{N_{\text{ox}} [\text{mol}] \cdot K_n [\text{kJ}]} \cdot 100$$

n = Nutzeffekt
 C_{red} = Mole des in den Zellen gebundenen Kohlenstoffs
 K_c = für die Reduktion von 1 mol CO₂ zur Zellsubstanz [CH₂O] erforderlicher Energiebetrag (= 502,4 kJ)
 N_{ox} = Mole der oxidierten Stickstoffverbindung
 K_n = Bei der Oxidation von 1 mol Ammoniak freigesetzter Energiebetrag (= -270 kJ)

Der in den Zellen gebundene Kohlenstoff (C_{red}) wurde nicht direkt bestimmt sondern aus dem ermittelten Proteingehalt abgeleitet. Nach Analysen von LURIA (1960) besteht eine typische *E. coli*-Zelle zu 50 % aus Kohlenstoff. Auch der Proteinanteil beträgt durchschnittlich 50 % (INGRAHAM et al., 1983). Diese Zusammensetzung wurde auch für *Nitrosomonas eutropha* vorausgesetzt. Als C_{red} wurde daher der ermittelte Proteingehalt zugrunde gelegt.

3.16.1.4 Wachstumsrate

Die **Wachstumsrate** μ ist ein Maß für die Geschwindigkeit des Zellwachstums. Sie beschreibt die Zunahme der Zellmasse in einer Kultur, wobei der Proteingehalt ein relatives Maß für die Zellmasse darstellt. Daher konnte die Wachstumsrate wie folgt ermittelt werden (13):

$$(13) \quad \mu \left[h^{-1} \right] = \frac{\ln X_t - \ln X_0}{\Delta t}$$

μ = Wachstumsrate
 X_t = Zellmasse zum Zeitpunkt t
 X_0 = Zellmasse zum Zeitpunkt t=0
 Δt = Zeitintervall

3.16.1.5 Vermehrungsrate

Die **Vermehrungsrate** v beschreibt die Zunahme der Zellzahl einer Kultur und wurde nach folgender Formel berechnet (14):

$$(14) \quad v \left[h^{-1} \right] = \frac{\log N_t - \log N_0}{\log 2 \bullet \Delta t}$$

v = Vermehrungsrate
 N_t = Zellzahl zum Zeitpunkt t
 N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt t = 0
 Δt = Zeitintervall

3.16.1.6 Generationszeit

Die **Generationszeit** g kann aus der Vermehrungsrate errechnet werden. Sie ist wie folgt definiert (15):

$$(15) \quad g[h] = \frac{1}{v}$$

3.16.1.7 Absterberate

Hohe Temperaturen führen zur Abtötung einer Population von Zellen, die durch die **Absterberate** k beschrieben werden kann. Die exponentielle Abnahme der Zellzahl kann durch eine Funktion erster Ordnung beschrieben werden (16).

(16)

$$N_t = N_0 \times e^{-kt}$$

N_t = Zellzahl zum Zeitpunkt t

N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt $t = 0$

k = Absterberate

Bei halblogarithmischem Auftrag der Zellzahl gegen die Zeit beschreibt diese Funktion eine Gerade, aus der die spezifische Absterberate nach (17) berechnet werden kann.

(17)

$$-k \left[h^{-1} \right] = \frac{\ln N_t - \ln N_0}{\Delta t}$$

k = spezifische Absterberate

N_t = Zellzahl zum Zeitpunkt t

N_0 = Zellzahl zum Zeitpunkt $t = 0$ (bei Versuchsbeginn)

Δt = Zeitintervall

3.16.1.8 D_{10} -Wert

Der **D_{10} -Wert** (dezimale Reduktionszeit) gibt die Zeit an, nach der 90 % der Zellen einer Kultur abgetötet worden sind, die Zellzahl also um eine Zehnerpotenz vermindert wurde. Dieser Wert ist vor allem in der Nahrungsmittelindustrie gebräuchlich. Die Zahlen (log der MPN-Zellzahl) der überlebenden Bakterien bei Hitzestress wurden gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Aus der Kurve wurde nach linearer Regression der D_{10} -Wert errechnet.

4 Ergebnisse

4.1 Nitrifikation in der Pilotanlage

4.1.1 Biofilmbildung

Im Nitrifikationsreaktor der untersuchten Pilotanlage zur Stickstoffelimination aus Trübwasser wurden Ammoniakoxidanten in einem Biofilm immobilisiert, um hohe Biomassekonzentrationen im Reaktor zu erreichen und damit eine hohe Nitrifikationsleistung pro Kubikmeter Reaktorvolumen zu ermöglichen. Als Aufwuchsfläche bzw. Träger für den Biofilm wurde kugelförmiges geschäumtes Polystyrol verwendet, das der reaktortechnischen Nomenklatur folgend als Trägermaterial bezeichnet wurde. Abb. 5A zeigt, dass unbewachsenes Trägermaterial einen Durchmesser von etwa 1-2 mm hatte. Nach mehrmonatigem Betrieb der Pilotanlage hatte sich auf dem Trägermaterial ein hellbraun bis rostbraun gefärbter Biofilm gebildet (Abb. 5B). Da Ammoniakoxidantenkulturen bei hoher Zelldichte aufgrund ihres hohen Cytochromgehaltes typischerweise rostbraun gefärbt sind, deutete dieses Aussehen auf einen hohen Anteil von Ammoniakoxidanten im Biofilm hin.

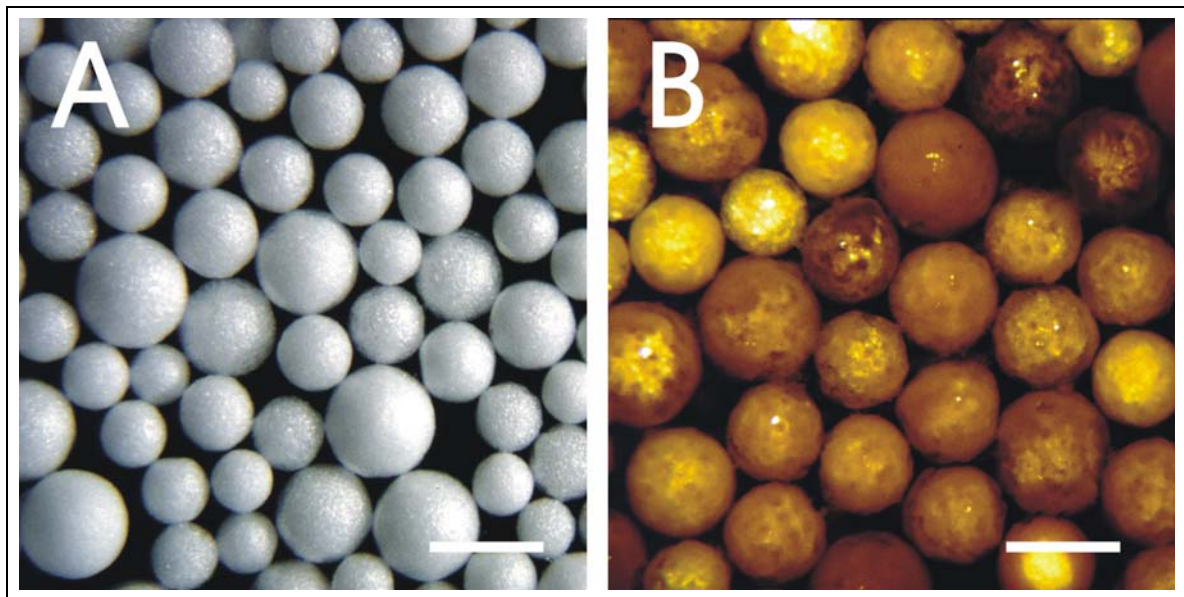


Abb. 5 Lichtmikroskopische Aufnahme von Trägermaterial, A: Unbewachsenes Trägermaterial, B: Trägermaterial mit Biofilm nach mehrmonatigem Betrieb aus der Optimierungsphase 1. Die Balkenlänge entspricht 2 mm.

Zur Untersuchung der Biofilmbildung und -architektur wurden während des Anlagenbetriebes regelmäßig Querschnitte von Trägermaterial mit Biofilm nach Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI mikroskopisch untersucht. Abb. 6A-C zeigen charakteristische Aufnahmen von Biofilm unterschiedlicher Stärke, die die Biofilmbildung dokumentieren.

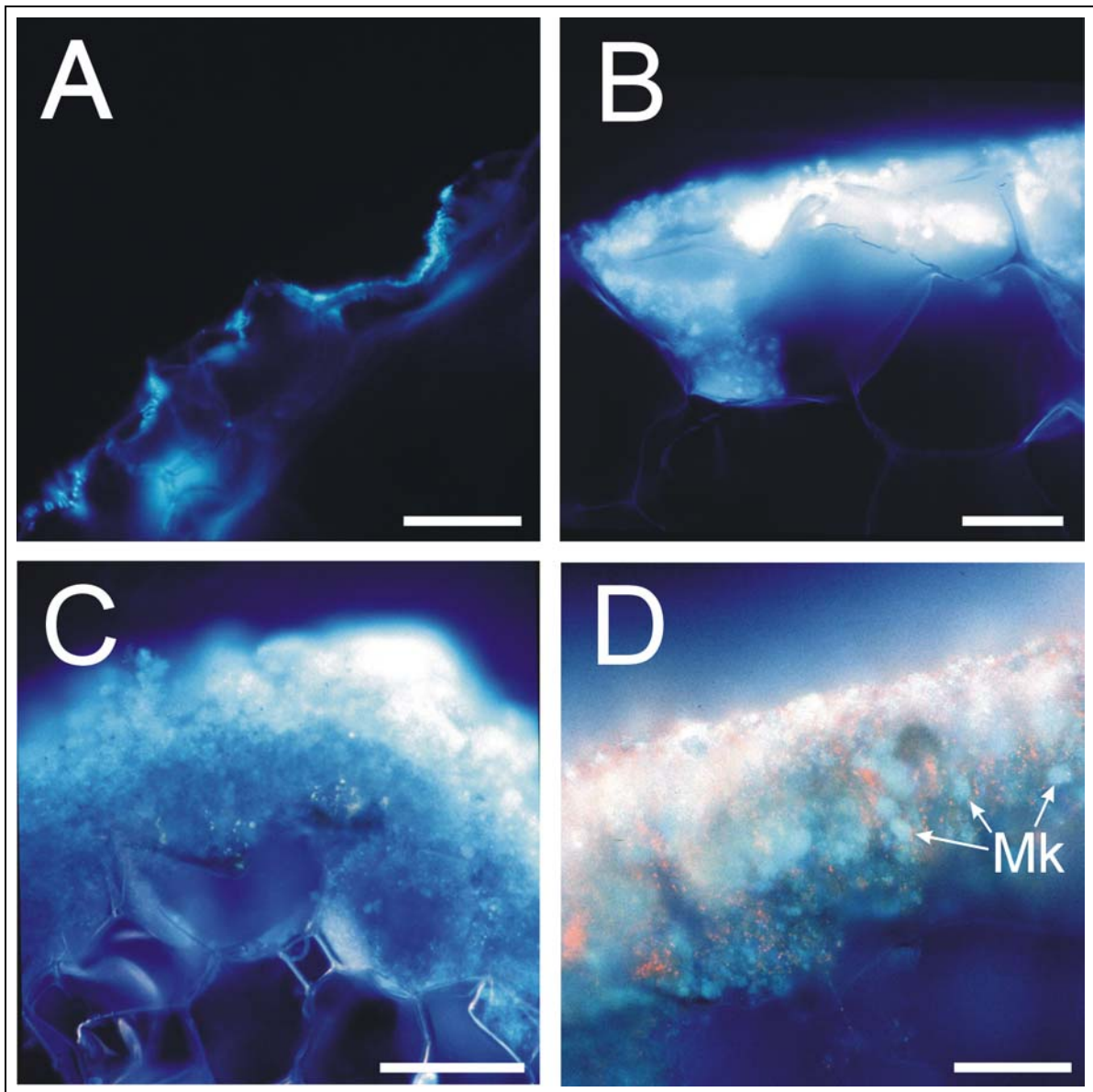


Abb. 6 Verlauf der Biofilmbildung und Verteilung von respiratorischer Aktivität im Biofilm. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten nach Färbung mit DAPI (A-C) bzw. DAPI und CTC (D). A: Anheftung von Zellen nach 40 Betriebsstunden (Optimierungsphase 1). Die Balkenlänge entspricht 50 μm , B: Biofilm nach 3monatigem Betrieb (Optimierungsphase 1). Die Balkenlänge entspricht 50 μm . C: Biofilm nach 15monatigem Betrieb (Optimierungsphase 2). Die Balkenlänge entspricht 200 μm . D: Biofilm nach 4monatigem Betrieb (Optimierungsphase 1). Mk = Mikrokolonien. Die Balkenlänge entspricht 50 μm .

Die Biofilmbildung setzte sofort nach Inbetriebnahme des Reaktors ein. Bereits nach wenigen Betriebsstunden waren erste Zellen auf dem Trägermaterial angeheftet. Dabei erfolgte die Anheftung auf der Trägermaterialoberfläche bevorzugt in strömungsarmen Vertiefungen (nicht dargestellt). Nach 40 Betriebsstunden war in diesen Bereichen bereits eine einschichtige Zelllage zu erkennen (Abb. 6A). Nach 3monatigem Betrieb war das Trägermaterial von einem geschlossenen Biofilm von etwa 40 μm Schichtdicke überzogen, der das Oberflächenrelief abdeckte (Abb. 6B). Die geschäumten Kammern des Trägermaterials waren

durch die hydrodynamische Beanspruchung während des Betriebes bereits teilweise aufgebrochen und Bakterienzellen waren in die oberste Kammerebene eingewandert (Abb. 6B). Nach 5-6 Monaten Betriebszeit war der Biofilm auf eine Stärke von etwa 200 μm angewachsen (nicht dargestellt). Der Biofilm veränderte die hydrodynamischen Eigenschaften des Trägermaterials. Daher wurde eine Regulation der Biofilmstärke erforderlich. Um einen Teil des Biofilms abzulösen, wurde das Trägermaterial in sogenannten Abreinigungen kurzzeitig hohen Scherkräften ausgesetzt. Die Biofilmstärke wurde im weiteren Betriebsverlauf durch diese in unregelmäßigen Abständen erfolgende Abtrennung von Biofilmmaterial auf etwa 200-300 μm eingestellt. Abb. 6C zeigt Biofilm nach 15 Monaten Betriebszeit, der eine Stärke von 200-250 μm aufwies.

Exemplarisch wurde die Verteilung der respiratorischen Aktivität heterotropher Bakterien im Querschnitt des Biofilms ermittelt. Diese Ergebnisse sollten Hinweise auf das Vorkommen und die Verteilung heterotropher Organismen im Biofilm liefern. Ein Biofilm von 150-200 μm Schichtdicke wurde mit dem Tetrazoliumsalz CTC inkubiert, das durch respiratorische Aktivität zu einem rotfluoreszierenden Formazan reduziert wird. Autotrophe Ammoniakoxidanten können diese Reduktion nicht durchführen. Abb. 6D zeigt, dass respiratorische Aktivität heterotropher Zellen über den gesamten Querschnitt des Biofilms gefunden wurde. Im Biofilm war somit auch ein hoher Anteil heterotropher Organismen vertreten. Allerdings trat eine Anhäufung von CTC-positiven Zellen in den äußeren Schichten des Biofilms auf. Außerdem war im Biofilm eine große Zahl von Mikrokolonien aus CTC-negativen Zellen zu erkennen. Da Ammoniakoxidanten häufig in Form von Mikrokolonien wachsen, könnte es sich bei den Mikrokolonien um Ammoniakoxidanten handeln.

4.1.2 Charakterisierung der Betriebsbedingungen

Während des Versuchsbetriebes der Pilotanlage wurden im Nitrifikationsreaktor in verschiedenen Versuchsabschnitten die Sauerstoff- und Ammoniumkonzentration sowie der pH-Wert variiert, um die Betriebsbedingungen für eine maximale Nitrifikationsleistung des Reaktors zu ermitteln. Der Betrieb der Pilotanlage konnte in drei Abschnitte unterteilt werden: die Optimierung des Sauerstoffeintrags (Optimierungsphase 1), die Erhöhung der Ammoniumkonzentration (sog. Hochlastphase) und die Optimierung der pH-Wert-Regulierung (Optimierungsphase 2).

In Tab. 3 sind die Betriebsparameter Temperatur, Sauerstoffkonzentration und pH-Wert, sowie die Konzentrationen von Ammonium, Nitrit und Nitrat während der verschiedenen Betriebsphasen der Pilotanlage zusammengestellt. Vergleichend wurden exemplarisch auch die Standortfaktoren von zwei großtechnischen Nitrifikationssystemen erfasst, um zu ermitteln, welche Betriebsparameter der Pilotanlage sich besonders deutlich von denen in Nitrifikationsstufen kommunaler Kläranlagen unterschieden. Als erstes System wurde die Nitrifikationsstufe des Hamburger Klärwerksverbundes Köhlbrandhöft/Dradenau untersucht, die im Belebtschlammverfahren betrieben wurde. Außerdem wurden die Standortfaktoren einer nitrifizierenden Tropfkörperanlage des Klärwerks Lüneburg erfasst.

Es zeigte sich, dass die Betriebsbedingungen der beiden großtechnischen Nitrifikationssysteme große Unterschiede gegenüber denen im Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage aufwiesen (Tab. 3).

Tab. 3: Temperatur, Sauerstoffgehalt, pH-Wert, Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentration von Proben aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage, der Nitrifikationsstufe der Kläranlage Dradenau (Klärwerksverbund Köhlbrandhöft/Dradenau, Hamburg) und der Tropfkörperanlage der Kläranlage Lüneburg

Betriebsphase Probenahme	Temperatur [°C]	Sauerstoff [mg/L]	pH-Wert	Ammonium [mM]	Nitrit [mM]	Nitrat [mM]
Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage						
<i>Optimierungsphase 1 (Sauerstoffeintrag)</i>						
09/95-02/96	30-35* (mittel: 34)	1-3,5*	7-7,5*	5-15*	10-20*	<0,1*
4 Proben	30,6-34,3	1,5-3,5	7,2-7,6	14-22	10-16	0,03-0,3
24. 01. 96	30,6	3,2	7,4	16,9	12,9	0,19
<i>Hochlastphase</i>						
03/96-09/96	33-42* (mittel: 37)	2-10*	7-7,5*	20-50*	15-50*	<0,1*
14 Proben	33,1-41,6	1,6-11,1	6,7-7,5	18-57	9-45	<0,01-0,08
29. 09. 96	34,3	7,6	7,2	46,4	30,6	<0,1
<i>Optimierungsphase 2 (pH-Kontrolle)</i>						
10/96-03/97	27-35* (mittel: 34)	6-8*	6,5-8,0*	5-15*	50-100*	<0,1*
6 Proben	27,2-35,2	2,6-11,5	6,6-8,1	5-30	15-73	<0,01-0,1
28. 01. 97	30,8	11,5	7,0	8,4	72,6	0,05
Nitrifikationsstufe der Kläranlage Dradenau						
05/97-07/97	13,7-18,1	1,8-2,8	7,0-7,2	0,01-2,33	0,01-0,11	0,06-0,28
3 Proben						
Tropfkörperanlage der Kläranlage Lüneburg						
07/97-08/97	19,1-20,4	6,3-6,6	7,1-7,6	0,68-1,05	0,04-0,15	1,28-1,39
2 Proben						

* Angaben aus regelmäßigen Messungen von Bräutigam et al. (1997)

Einen wesentlichen Unterschied stellte die Temperatur dar. In den Nitrifikationssystemen der kommunalen Kläranlagen wurden bei exemplarischen Untersuchungen in den Sommermonaten (Juli-August 1997) maximal 20,4 °C gemessen. Im Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage betrug die durchschnittliche Betriebstemperatur dagegen 34 °C (Optimierungsphase 1 und 2) bzw. 37 °C (Hochlastphase). Die steigende Betriebstemperatur während der Hochlastphase war auf die Erhöhung des Zentratsdurchsatzes zurückzuführen, da die Temperatur des Zentrats im Reaktorzufluss 45-50 °C betrug. Außerdem führten hochsommerliche Tagestemperaturen zu einem Temperaturanstieg im Reaktor. Daher wurde bei sommerlicher Witterung während der Hochlastphase mehrfach die Temperatur von 40° C überschritten, wobei maximal 42 °C gemessen wurden. Betriebstemperaturen von 40-42 °C wurden im Reaktor jeweils 2-8 Tage in Folge gemessen.

Die Konzentrationen von Ammonium und Nitrit stellten weitere bedeutende Unterschiede zwischen der Pilotanlage und den anderen Nitrifikationssystemen dar. In den kommunalen Nitrifikationsstufen war eine deutlich geringere Ammonium- (bis zu 2,3 mM) bzw. Nitrit-

konzentration (bis zu 0,15 mM) vorhanden als in der Pilotanlage (bis zu 57 mM Ammonium und 100 mM Nitrit). Demgegenüber war die Nitratkonzentration in den kommunalen Kläranlagen höher als in der Pilotanlage. Im Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage war die Nitritoxidation unterdrückt, so dass neben sehr geringen Nitratkonzentrationen Nitrit als Hauptprodukt im Reaktorablauf gefunden wurde.

Die Sauerstoffkonzentration betrug im Belebtschlamm der Nitrifikationsstufe Dradenau maximal 2,8 mg/L O₂. Im Zulauf der Tropfkörperanlage wurde mit 6,3-6,6 mg/L O₂ ein deutlich höherer Sauerstoffgehalt gemessen. Im Pilotreaktor war die Sauerstoffkonzentration stark schwankend. Zunächst war in der Optimierungsphase 1 ein Sauerstoffgehalt von 1-3,5 mg/L O₂ vorhanden. Der Sauerstoffeintrag wurde daraufhin durch verschiedene technische Maßnahmen verbessert. Dies führte im weiteren Betriebsverlauf zu einer Erhöhung der Sauerstoffkonzentration auf 2-10 mg/L O₂ (Hochlastphase) bzw. 6-8 mg/L O₂ (Optimierungsphase 2).

Der pH-Wert war in der Optimierungsphase 1 und der Hochlastphase im Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage mit dem der kommunalen Kläranlagen nahezu übereinstimmend. In der Optimierungsphase 2 wurden pH-Werte zwischen pH 6,5 und pH 8,0 eingestellt.

4.1.3 Biofilmmenge und -zusammensetzung

Zunächst wurden die Entwicklung und die biochemische Zusammensetzung des Biofilms aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage untersucht. Es sollte geprüft werden, inwieweit Änderungen der Betriebsbedingungen auch zu Änderungen der Biofilmmenge und -zusammensetzung führten. Dazu wurden der Protein- und Kohlenhydratgehalt des Biofilms bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 7 dargestellt.

Bis zum Versuchstag (VT) 266 stiegen der Protein- und Kohlenhydratgehalt an (Abb. 7), was Wachstum des Biofilms anzeigt. Dabei nahm die Biofilmstärke zu. Ab VT 300 wurde die Biofilmmenge durch Abtrennung von Biomasse reguliert. Die Abreinigungen sind in Abb. 7 durch senkrechte Pfeile markiert. Mit dieser in unregelmäßigen Abständen durchgeführten Abtrennung von Biomasse wurde die Biofilmmenge über einen Betriebszeitraum von etwa 8 Monaten zwischen 10-20 kg Protein und 2-5 kg Kohlenhydrate pro m³ Trägermaterial eingestellt.

Weiter sollte geprüft werden, welche Beziehungen zwischen der Biofilmmenge und den Betriebsbedingungen bestanden. Am VT 288 wurde wenig bewachsenes Trägermaterial in den Reaktor überführt. Dies führte zu einem Absinken der mittleren Biofilmmasse pro Kubikmeter Trägermaterial (bestimmt am VT 290). Auch zwischen VT 360 und 400 nahm die Biofilmmenge ab. Eine Ursache hierfür könnte in der hohen Betriebstemperatur liegen, die in diesem Zeitraum überwiegend zwischen 37 °C und 40 °C lag. Die Temperatur stieg maximal auf 42 °C an und ging minimal auf 34 °C zurück. Zur Darstellung eines möglichen Zusammenhangs wurde in Abb. 7 die Betriebstemperatur in vier farblich codierte Klassen eingeteilt, die als Balken im oberen Teil der Abbildung gezeigt sind. Aus dieser Darstellung wird deutlich, dass im Betriebsverlauf zwei Zeitabschnitte mit deutlich erhöhter Betriebstemperatur auftraten (VT 360-400 und VT 430-480). Während von VT 360-400 die Biofilmmenge abnahm, wurde von VT 430-480 eine Zunahme des Protein- und Kohlenhydrat-

gehaltenes gemessen, wobei der Kohlenhydratgehalt besonders stark anstieg (Abb. 7). Der Einfluss der Temperatur auf das Biofilmwachstum blieb somit unklar.

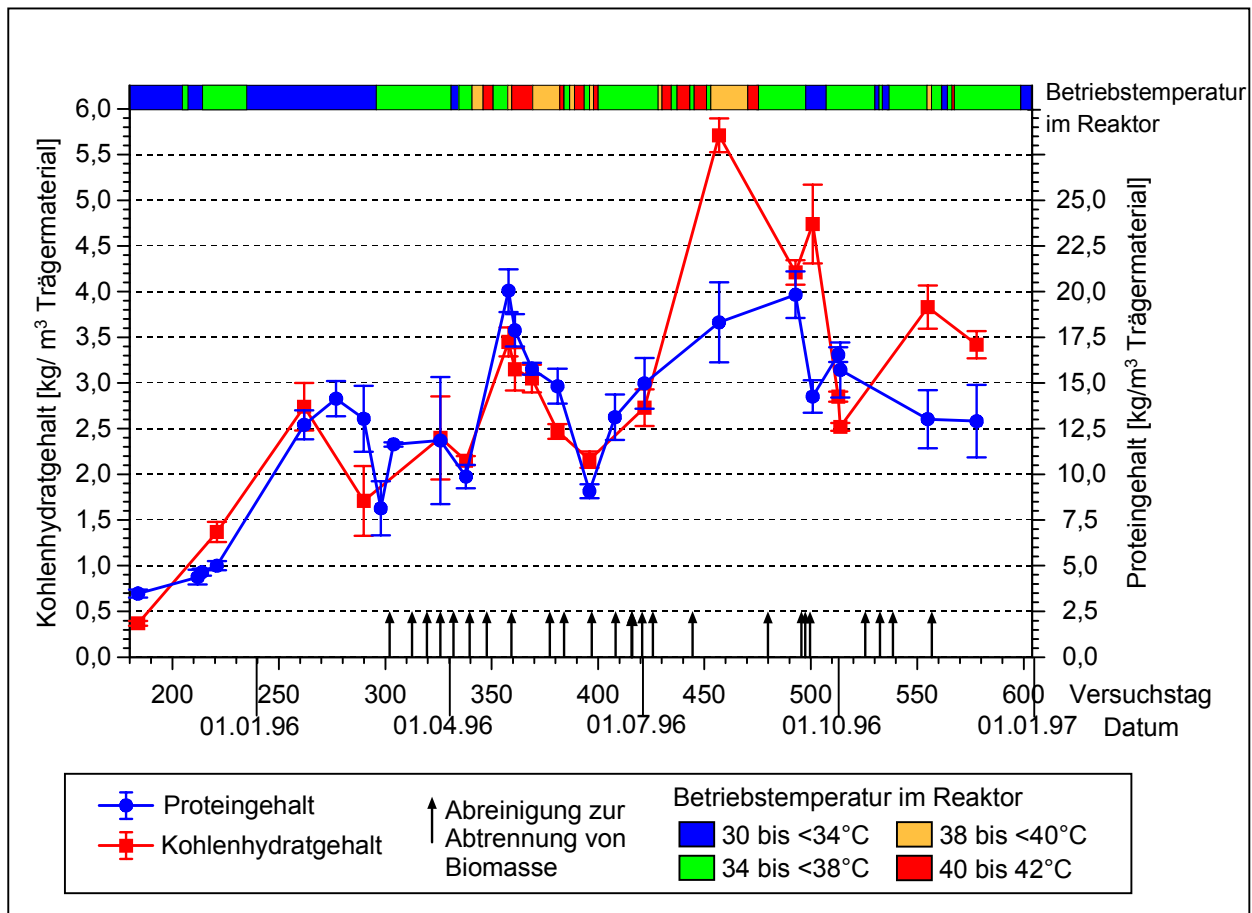


Abb. 7 Protein- und Kohlenhydratgehalt des Biofilms aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage zwischen dem 07. 11. 95 und dem 05. 12. 96 (VT 184-578).

Die Biofilmmzusammensetzung war in den ersten acht Monaten des Versuchsbetriebes konstant (Abb. 7). Das Verhältnis von Proteinen zu Kohlenhydraten betrug in diesem Betriebsabschnitt etwa 5:1. Nach dem VT 420 veränderte sich die Biofilmmzusammensetzung. Der Kohlenhydratgehalt stieg stark an. Dieser Parameter gab Hinweise auf den erhöhten Anteil der Biofilmmatrix am Biofilmaufbau, da extrazelluläre, polymere Substanzen (EPS), die die Zellen in einem Biofilm miteinander verbinden, überwiegend aus Kohlenhydraten aufgebaut sind. Zwischen den VT 489 und 498 wurde mehrfach Schaumbildung im Reaktorkopf beobachtet. Wie Untersuchungen ergaben, waren in diesem Schaum große Mengen abgelöster EPS enthalten. Das Verhältnis von Proteinen und Kohlenhydraten betrug im Schaum 0,25 : 1. Die Ursache für die ab VT 420 aufgetretene Veränderung der Biofilmmzusammensetzung könnte in einer starken Erhöhung der Sauerstoffkonzentration im Reaktor nach Erneuerung der Eintragssysteme liegen. Das gleichzeitige Auftreten von erhöhter Temperatur und hoher Sauerstoffkonzentration könnte zur verstärkten EPS-Bildung geführt haben.

4.1.4 Einfluss der Temperatur auf die Nitrifikation

Aus den Untersuchungsergebnissen während des Betriebes des Nitrifikationsreaktors der Pilotanlage konnte kein Zusammenhang zwischen der Betriebstemperatur und dem Protein- und Kohlenhydratgehalt des Biofilms abgeleitet werden. Diesem Punkt wurde nicht weiter nachgegangen, da es das Ziel der Versuche war, unter Betriebsbedingungen eine hohe Nitrifikationsleistung zu erreichen. Da die Ammoniakoxidanten nur einen Teil der Biomasse ausmachten, konnte der Einfluss von Betriebsbedingungen auf die Biofilmmenge und -zusammensetzung nicht gleichzeitig als Einfluss auf die Ammoniakoxidanten übertragen werden. Daher wurde untersucht, welchen Einfluss die Betriebsbedingungen auf die Stoffwechselleistung der Ammoniakoxidanten im Nitrifikationsreaktor hatten. Dazu wurde die Nitrifikationsleistung der Pilotanlage bei verschiedenen Betriebsbedingungen und zusätzlich das Nitrifikationspotential der Anlage in Laborversuchen bestimmt.

Die Leistung des Nitrifikationsreaktors der Pilotanlage betrug von VT 180-200 zunächst etwa $4 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial} \times \text{Tag}$ (Abb. 8). Durch Verbesserung des Sauerstoffeintrags und aufgrund von Biofilmwachstum stieg die Leistung bis auf etwa $14 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial} \times \text{Tag}$ an (VT 220). Im weiteren Betriebsverlauf bestand keine Relation mehr zwischen der Biofilmmasse und der Nitrifikationsleistung. Die Umsatzleistung betrug unabhängig vom Biofilmwachstum jeweils $8\text{-}14 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial} \times \text{Tag}$ und wies damit lediglich Schwankungen auf, wie sie in großtechnischen Anlagen regelhaft auftreten. Erst nach VT 530 wurde ein Anstieg der Nitrifikationsleistung auf bis zu $20 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial} \times \text{Tag}$ gemessen. Ein Einfluss von Betriebsbedingungen wie Temperatur, Sauerstoff- oder Ammoniumkonzentration auf die Nitrifikationsleistung war aus diesen Daten nicht abzuleiten.

Das im Labor ermittelte Nitrifikationspotential stieg zunächst bis zum VT 275 an (Abb. 8), was zeigt, dass das in diesem Betriebsabschnitt festgestellte Biofilmwachstum auch zu einem Potentialanstieg führte. Von VT 275 bis VT 357 wurde ein Nitrifikationspotential von $27\text{-}45 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial} \times \text{Tag}$ bestimmt, das damit 2-4fach höher war als die gemessene Umsatzleistung der Pilotanlage. Im Reaktor war demnach in diesem Betriebsabschnitt eine hohe Leistungsreserve vorhanden. Zwischen den VT 362-400 stieg die Betriebstemperatur auf $37\text{-}42^\circ \text{C}$, wobei wiederholt für mehrere Tage Temperaturen von $40\text{-}42^\circ \text{C}$ gemessen wurden. Dies hatte einen starken Rückgang des Nitrifikationspotentials auf $13,5 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial} \times \text{Tag}$ zur Folge. Nach Rückgang der Betriebstemperatur auf etwa $34\text{-}37^\circ \text{C}$ erhöhte sich das Nitrifikationspotential wieder auf etwa $22 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial} \times \text{Tag}$. Ein erneuter Anstieg der Betriebstemperatur auf $37\text{-}40^\circ \text{C}$ führte zu einem erneuten Absinken des Nitrifikationspotentials auf $12,3 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial} \times \text{Tag}$ (VT 457). Das Nitrifikationspotential lag damit nur noch geringfügig über der tatsächlichen Nitrifikationsleistung der Pilotanlage von $11,4 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial} \times \text{Tag}$. Diese Ergebnisse zeigen, dass in dieser Betriebsphase im Pilotreaktor keine Leistungsreserve mehr vorhanden war. Bei sinkenden Temperaturen nach dem VT 480 wurde ein erneuter Anstieg des Nitrifikationspotentials gemessen. Am VT 513 war das Nitrifikationspotential wieder etwa 4fach höher als die Nitrifikationsleistung der Pilotanlage. Eine Leistungsreserve war somit wieder vorhanden.

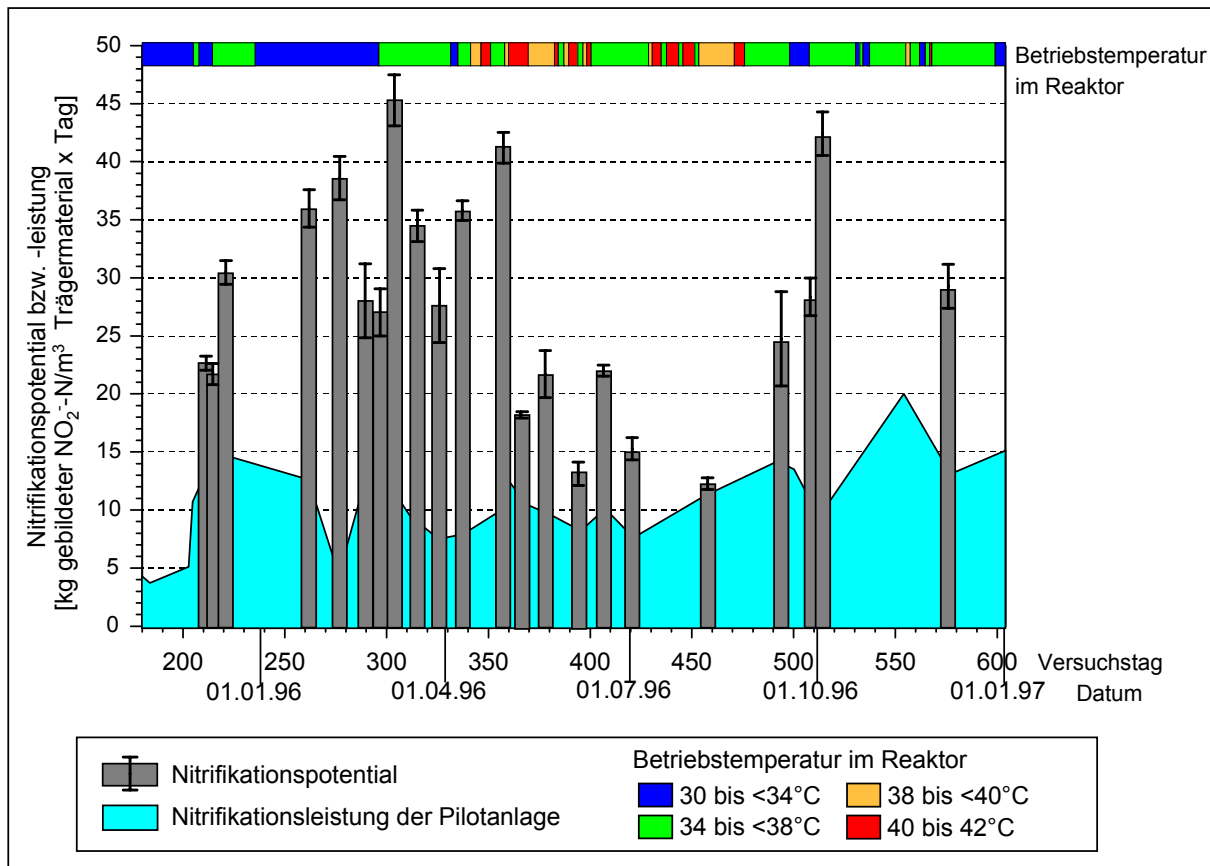


Abb. 8 Nitrifikationspotential der Ammoniakoxidantenpopulation der aus dem Nitrifikationsreaktor Pilotanlage und Nitrifikationsleistung der Pilotanlage in Abhängigkeit von der Betriebstemperatur zwischen dem 07. 11. 95 und dem 05. 12. 96 (VT 184-578).

Mit diesen Ergebnissen konnte ein deutlicher Einfluss der Temperatur auf das Nitrifikationspotential gezeigt werden. Bei Anstieg der Betriebstemperatur auf 37-42 °C sank das Nitrifikationspotential. Trotz dieses Rückgangs blieb die Nitrifikationsleistung der Anlage aufgrund der im Biofilm vorhandenen Leistungsreserve weitgehend konstant. Bei längerandauerndem Betrieb der Pilotanlage auf diesem hohen Temperaturniveau muss somit auch von einem Rückgang der Nitrifikationsleistung ausgegangen werden. Das lässt vermuten, dass bei permanenten Betriebstemperaturen von 40 °C keine stabile Nitrifikationsleistung des Pilotreaktors erwartet werden kann.

Da im Biofilm des Nitrifikationsreaktors während der meisten Betriebsphasen eine Leistungsreserve nachgewiesen werden konnte, sollte geklärt werden, bei welcher Biofilmstärke bereits das Potential für die maximal im Reaktorsystem gemessene Nitrifikationsleistung vorhanden war. In Abb. 9 sind das Nitrifikationspotential des Biofilms und die zeitgleich bestimmte Nitrifikationsleistung der Pilotanlage bei unterschiedlicher Biofilmstärke für ausgewählte Proben dargestellt.

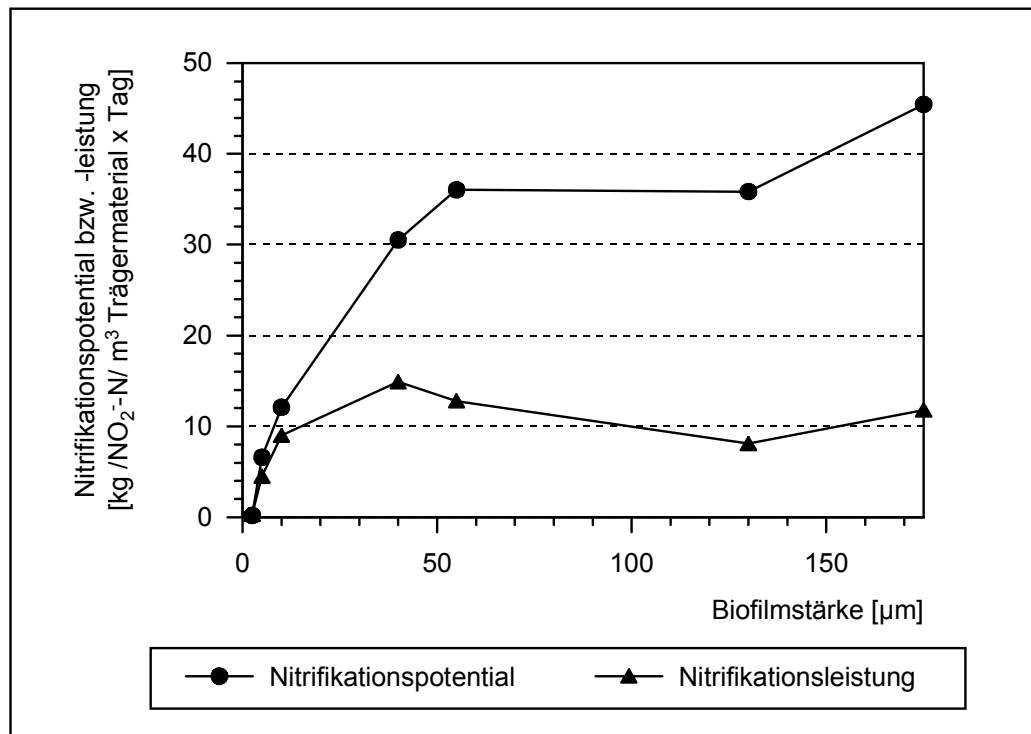


Abb. 9 Nitrifikationspotential der Ammoniakoxidantenpopulation und Nitrifikationsleistung der Pilotanlage bei unterschiedlicher Biofilmstärke.

Bei dünnem Biofilm bis zu einer Schichtdicke von etwa $60 \mu\text{m}$ stieg das Nitrifikationspotential mit zunehmender Biofilmstärke bis auf eine Oxidationsleistung von etwa $36 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial x Tag}$ an (Abb. 9). Eine Zunahme der Biofilmstärke auf $175 \mu\text{m}$ führte zu einem weiteren Anstieg des Nitrifikationspotentials auf $45 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial x Tag}$. Auch die Nitrifikationsleistung des Reaktors stieg zunächst mit zunehmender Biofilmstärke deutlich an. Bereits bei einer Biofilmstärke von $10 \mu\text{m}$ betrug die Nitrifikationsleistung $9 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial x Tag}$. Bei weiterer Erhöhung der Biofilmstärke pendelte sich die Nitrifikationsleistung auf einen Wert von $8\text{-}14 \text{ kg NO}_2^- \text{-N/m}^3 \text{ Trägermaterial x Tag}$ ein.

Dies Ergebnis beweist, dass für die von der Pilotanlage erbrachte maximale Nitrifikationsleistung nur ein dünner Biofilm von etwa $10\text{-}40 \mu\text{m}$ Stärke erforderlich war. Eine Zunahme der Biofilmstärke erbrachte zwar keine Steigerung der Nitrifikationsleistung des Reaktors, ermöglichte aber die Ausbildung einer Leistungsreserve. Für die Betriebsstabilität der Pilotanlage war die Leistungsreserve von entscheidender Bedeutung, da sie auch bei Veränderung der Betriebsbedingungen eine gleichbleibende Nitrifikationsleistung ermöglichte. Andererseits führte ein starker Biofilm aber zu einer Erhöhung der mittleren Dichte des Trägermaterials und somit zu einer für das Verfahren nachteiligen Veränderung der hydrodynamischen Eigenschaften des Trägermaterials. Daher wäre eine Biofilmstärke von etwa $50\text{-}100 \mu\text{m}$ für das Verfahren gut geeignet, um eine stabile Nitrifikationsleistung mit Leistungsreserve zu ermöglichen ohne die Eigenschaften des Trägermaterials nachteilig zu verändern.

4.1.5 Zahl der Ammoniakoxidanten im Biofilm

Das Nitrifikationspotential wurde durch Betriebstemperaturen von 37-42 °C, die vor allem in den Sommermonaten auftraten, deutlich verringert. Daher sollte untersucht werden, inwieweit dieser Rückgang des Nitrifikationspotentials auch mit einer Abnahme der Zahl vermehrungsfähiger Ammoniakoxidanten im Biofilm verbunden war. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 10 dargestellt.

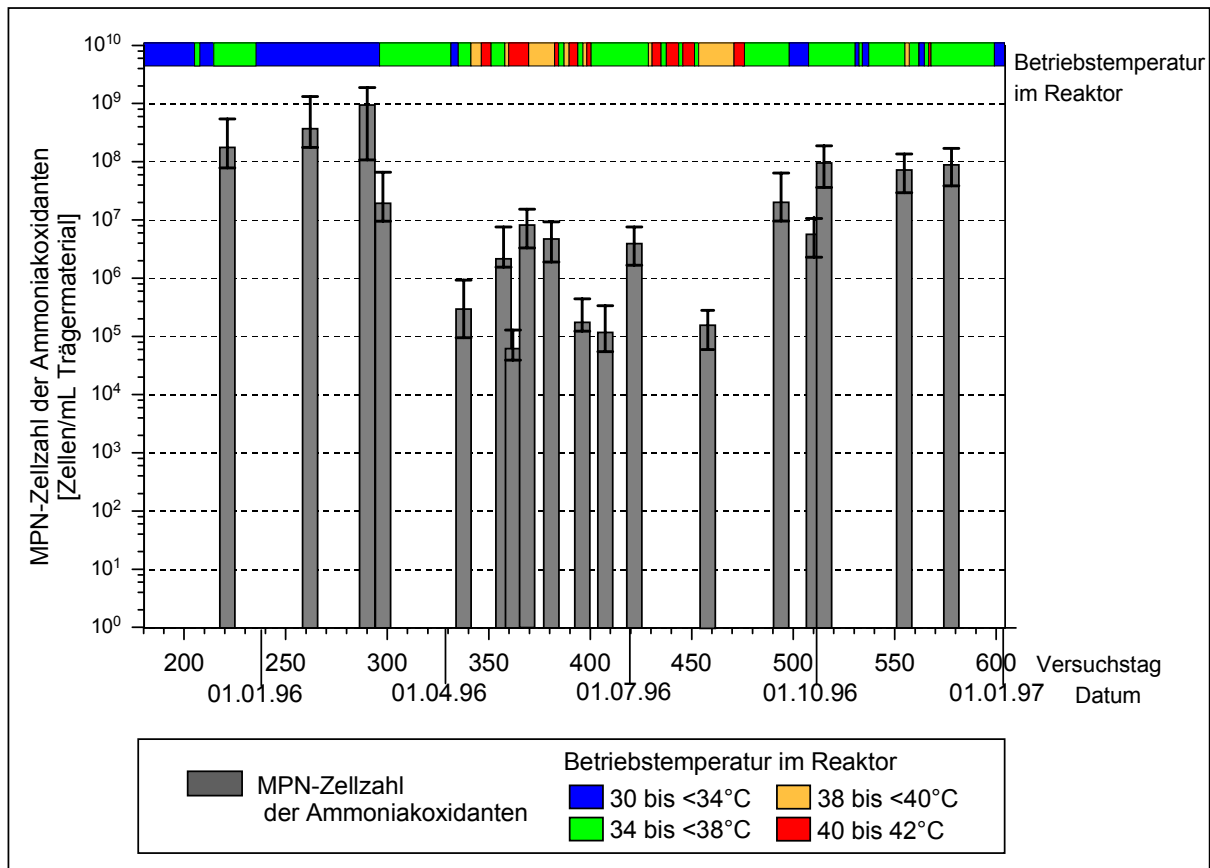


Abb. 10 Zahl vermehrungsfähiger Ammoniakoxidanten (MPN-Zellzahl) in Abhängigkeit von der Betriebstemperatur zwischen dem 07. 11. 95 und dem 05. 12. 96 (VT 184-578).

Die MPN-Zellzahl wies starke Schwankungen auf. Bei Temperaturen von 30-35 °C (Dezember 1995 - März 1996 = VT 200-300) betrug die Zahl vermehrungsfähiger Ammoniakoxidanten 1×10^7 - 1×10^9 Zellen/mL Trägermaterial. Dagegen sank die Zellzahl in den Monaten April-August 1996 (VT 330-460) bei Betriebstemperaturen von 37-42 °C auf 1×10^5 - 1×10^7 Zellen/mL Trägermaterial und war damit um 2-4 Zehnerpotenzen verringert. Diese Abnahme der MPN-Zellzahl war einhergehend mit dem Rückgang des Nitrifikationspotentials. Ab Mitte September 1996 (VT 480) ermöglichten sinkende Betriebstemperaturen wieder einen Anstieg der MPN-Zellzahl der Ammoniakoxidanten. Wie zu Beginn des Jahres wurde eine Zellzahl von 1×10^7 - 1×10^9 Zellen/mL Trägermaterial erreicht.

Hohe Betriebstemperaturen aus dem Bereich von 40 °C führten somit in den Sommermonaten zu einem Rückgang der MPN-Zellzahl der Ammoniakoxidanten im Biofilm. Dies

Ergebnis war ein erster Hinweis auf ein Absterben von Ammoniakoxidanten der Biofilmpopulation bei Temperaturen von 37-42 °C.

4.1.6 Temperaturprofil von Biofilmmaterial

Die bisherigen Untersuchungen des Pilotreaktors hatten gezeigt, dass sowohl das Nitrifikationspotential als auch die MPN-Zellzahl des Biofilms der Pilotanlage durch Veränderung der Betriebstemperatur beeinflusst wurden. Da der Reaktor nicht temperaturreguliert war und außerdem in starkem Maße durch die Außentemperatur beeinflusst wurde, wurden Laborversuche durchgeführt, um den Einfluss der Temperatur auf die Nitrifikationsleistung von Biofilmmaterial einzugrenzen. Bewachsenes Trägermaterial wurde bei verschiedenen Temperaturen zwischen 20 °C und 40 °C inkubiert. Nach einem bzw. drei Tagen wurde die Konzentration des von den Zellen gebildeten Nitrits als Maß für die Stoffwechselleistung bestimmt.

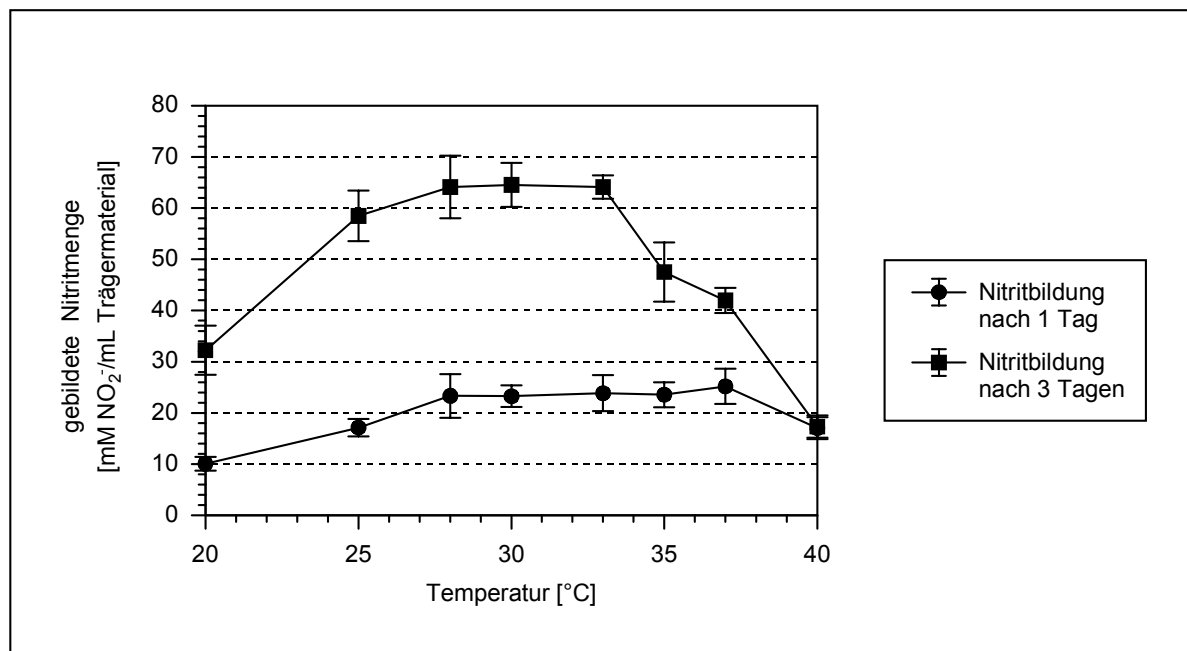


Abb. 11: Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Nitritbildung von Biofilmmaterial aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage nach 1 und 3 Tagen.

Nach eintägiger Inkubation war ein breites Temperaturoptimum vorhanden (Abb. 11). Von 20-28 °C stieg die Nitritbildung mit zunehmender Temperatur an. Über den Temperaturbereich von 28-37 °C wurde eine hohe Nitritbildung gemessen. Bei 40 °C war sie herabgesetzt. Nach dreitägiger Inkubation war das Temperaturoptimum deutlich enger. Von 20-28 °C war wiederum ein Anstieg der gebildeten Nitritmenge festzustellen. Der optimale Temperaturbereich lag zwischen 28 °C und 33 °C. Oberhalb von 33 °C war die Nitritbildung zunehmend herabgesetzt. Bei 40 °C konnte im Zeitabschnitt von 1-3 Versuchstagen nur noch eine äußerst geringe Nitritbildung gemessen werden. Die Temperaturen 35 °C, 37 °C und 40 °C müssen aufgrund dieser Ergebnisse als superoptimale Temperaturen eingeordnet werden. Die Nitritbildung in Abhängigkeit von der Temperatur zeigte damit densel-

ben Verlauf, wie er auch für andere mesophile Ammoniakoxidanten beschrieben wurde (HARMS et al., 1976).

Diese ersten Ergebnisse zum Einfluss der Temperatur auf die Nitritbildung des Biofilms aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage gaben Hinweise, dass der Reaktor in den Sommermonaten bei Betriebstemperaturen zwischen 37 °C und 42 °C im superoptimalen Temperaturbereich der Ammoniakoxidantenpopulation des Biofilms betrieben wurde.

4.1.7 Einfluss der Temperatur auf die Nitritbildung von Biofilmmaterial

Aufgrund der Laborversuche war der Temperaturbereich oberhalb von 33 °C für die Ammoniakoxidantenpopulation des Biofilms als superoptimal eingeordnet worden. Außerdem konnte gezeigt werden, dass für die Nitritbildung bei superoptimalen Temperaturen neben der Höhe der Temperatur auch die Dauer der Temperatureinwirkung von Bedeutung war. Daher sollte ermittelt werden, bis zu welcher Temperatur im Laborversuch Nitritbildung erfolgen konnte.

Zur Bestimmung dieser maximalen Temperatur wurden einwöchige Inkubationsversuche bei 35 °C, 37 °C und 40 °C durchgeführt. Für einzelne Versuchsabschnitte wurde aus der Zunahme der Nitritkonzentration eine mittlere Nitritbildungsrate pro Stunde errechnet. Als Kontrolle wurden Ansätze bei 28 °C inkubiert. Diese Temperatur wurde gewählt, da sie die niedrigste Temperatur des optimalen Temperaturbereichs darstellte (Abb. 11). Die Nitritbildungsrate wurde jeweils auf die im Versuchszeitraum von 0-8 Stunden in der Kontrolle ermittelte Nitritbildungsrate derselben Versuchsreihe normiert, um Parallelversuche mit unterschiedlicher Zellzahl vergleichen zu können.

In den Kontrollansätzen war in den ersten 48 Versuchsstunden eine gleichbleibende Nitritbildungsrate zu beobachten (Abb. 12). Im Versuchsabschnitt von 48-72 Stunden ging die Rate dann um etwa 10 % zurück. Von 72-96 Stunden war die Nitritbildung dann geringfügig, von 144-166 Stunden stärker erhöht, was ein Wachstum der Kultur anzeigte. Eine deutliche Hemmung der Nitritbildung wurde im Untersuchungszeitraum in den Kontrollansätzen nicht beobachtet.

Bei Temperaturen von 35 °C, 37 °C, 38 °C und 40 °C konnte in den ersten acht Stunden eine Steigerung der Nitritbildungsrate gegenüber der Kontrolle festgestellt werden. Erst im weiteren Versuchsverlauf war die Stoffwechselaktivität zunehmend herabgesetzt (Abb. 12).

Bei 35 °C war die Nitritbildung in den ersten Stunden auf 128 % erhöht. Im Zeitabschnitt von 8-72 Stunden ging sie leicht zurück und betrug dann im Zeitabschnitt von 48-72 Stunden 80 % der anfänglichen Nitritbildungsrate der Kontrolle. Im Zeitraum von 72-96 Stunden war sie stark herabgesetzt. Auch in den folgenden Zeitabschnitten nahm die Aktivität weiter ab. Im Zeitraum von 144-166 Stunden betrug sie noch 30 % der anfänglichen Nitritbildung des Kontrollansatzes.

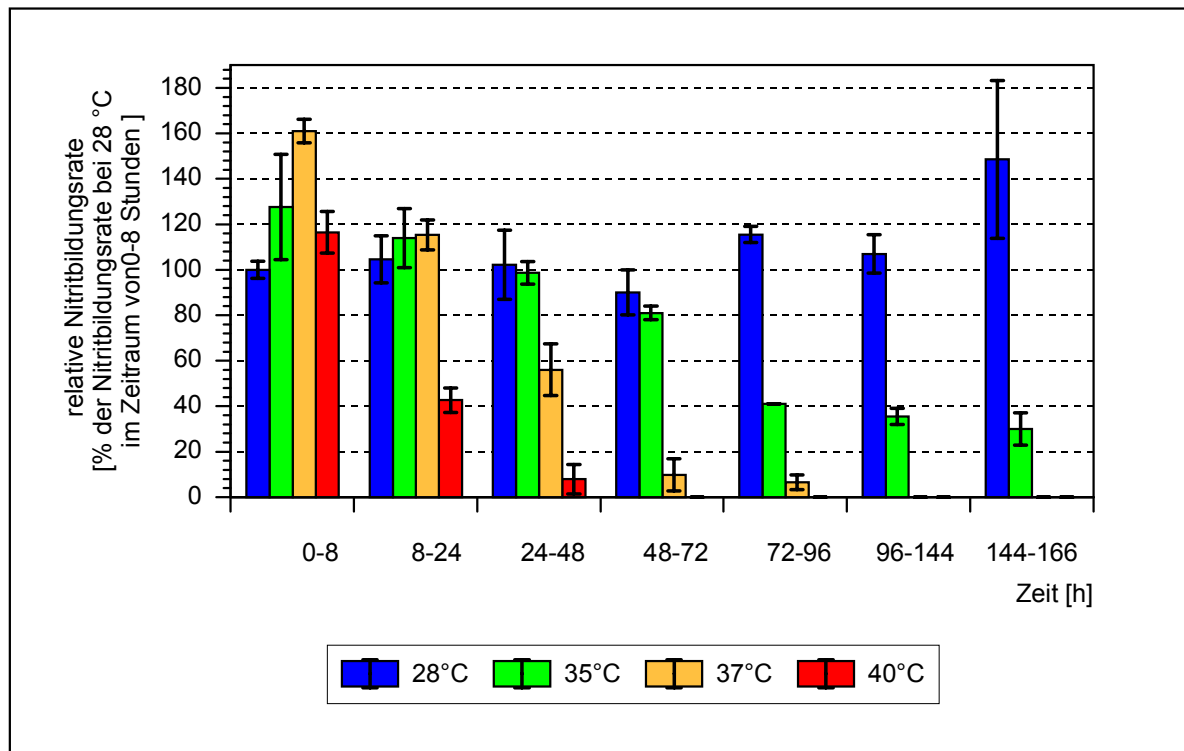


Abb. 12 Einfluss der Temperatur auf die mittlere Nitritbildungsrate von Biofilmmaterial aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage über einen Versuchszeitraum von 166 Stunden. Angegeben ist die relative Nitritbildungsrate in % der im Zeitraum von 0-8 Stunden ermittelten Ausgangsaktivität der bei 28 °C inkubierten Kontrollansätze.

Bei 37 °C war die Nitritbildung in den ersten 8 Stunden gegenüber dem Kontrollansatz um 61 % erhöht. Eine deutliche Hemmung trat bereits im Zeitraum von 24-48 Stunden auf. Im halblogarithmischen Auftrag zeigte sich, dass zwischen 8 und 72 Stunden eine exponentielle Abnahme der Nitritbildungsrate vorlag (nicht dargestellt). Zwischen 72 und 96 Stunden wurden nur noch etwa 10 % der anfänglichen Aktivität des Kontrollansatzes erreicht. Von 72-96 Stunden war eine sehr geringe Nitritbildung nachweisbar, nach 96 Stunden Inkubation war die Nitritbildung vollständig gehemmt.

Auch während der Inkubation bei 40 °C wurde die Nitritbildung in den ersten 8 Stunden gegenüber der Kontrolle gesteigert, wobei die Erhöhung 17 % betrug. Anschließend erfolgte eine exponentielle Abnahme der Nitritbildungsrate, wie im halblogarithmischen Auftrag gezeigt werden konnte (nicht dargestellt). Im Zeitabschnitt von 8-24 Stunden war bereits ein Rückgang der Nitritbildungsrate auf etwa 40 % der Aktivität der Kontrolle vorhanden. Nach 48 Stunden war die Nitritbildung vollständig unterdrückt.

Bei Inkubationstemperaturen von 37 °C und 40 °C wurde jeweils eine exponentielle Abnahme der Nitritbildungsrate beobachtet, die zu einer vollständigen Hemmung der Nitritbildung nach 96 bzw. 48 Stunden führte. Bei 35 °C wurde dagegen nach Ende des einwöchigen Versuches noch eine deutliche Nitritbildung ermittelt. Die Ammoniakoxidantenpopulation der Pilotanlage konnte somit im Laborversuchen bis zu einer maximalen Temperatur von 35 °C über die gesamte Inkubationszeit Nitrit bilden. Die langsam abnehmende

Bildungsrate könnte aber bedeuten, dass auch bei dieser Temperatur keine dauerhafte Nitritbildung möglich ist.

Diese Ergebnisse der Laborversuche standen damit im Widerspruch zu den Ergebnissen des Betriebes der Pilotanlage. Im Nitrifikationsreaktor war die Betriebstemperatur in den Sommermonaten bis auf 42 °C gestiegen. Über einen Zeitraum von mehreren Wochen sank die Betriebstemperatur nur für kurze Zeitabschnitte unter 35 °C. Trotz dieser Temperaturen nahm die Reaktorleistung nicht ab, während die Laborversuche darauf hinwiesen, dass schon eine konstante Temperatur von 35 °C schließlich zur Hemmung der Nitrifikation führen könnte. In weiteren Versuchen sollten daher Indizien gesammelt werden, welche Faktoren im Reaktor die gleichbleibend hohe Nitrifikationsleistung bei Betriebstemperaturen von 35-42 °C ermöglicht haben könnten.

4.1.8 Einfluss von Temperaturschwankungen auf die Nitritbildung von Biofilmmaterial

Online Messungen der Betriebstemperatur des Pilotreaktors über mehrere Wochen hatten gezeigt, dass die Betriebstemperatur im Verlauf von 24 Stunden um 1-5 °C schwankte. Die bisherigen Laborversuche zur Ermittlung des Temperaturprofils wurden jeweils bei konstanter Temperatur mit einer maximalen Abweichung von $\pm 0,2$ °C durchgeführt. Daher sollte in weiteren Ansätzen der Einfluss von Temperaturschwankungen auf die Nitritbildungsrate bei supermaximalen Temperaturen untersucht werden.

Tab. 4 24h-Temperaturprogramm für die Inkubation von Biofilmmaterial aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage

Ansatz	Inkubation bei:		
	35°C	40°C	28°C
Kontrolle	-	-	0-24 Stunden
Ansatz 1	0-8 Stunden	-	8-24 Stunden
Ansatz 2	0-4 Stunden	4-8 Stunden	8-24 Stunden
Ansatz 3	-	1. Tag: 0-24 Stunden 2.-7. Tag: 0-8 Stunden	- 8-24 Stunden

Dazu wurde ein Versuchsprogramm konzipiert, um im Laborversuch die im Reaktor gemessenen Temperaturschwankungen zwischen Tag und Nacht zu simulieren (Tab. 4). Ein Kontrollansatz wurde bei konstant 28 °C inkubiert. In Ansatz 1 wurde die Temperatur pro Tag jeweils für 8 Stunden von 28 °C auf 35 °C erhöht und anschließend wieder auf 28 °C herabgesetzt. In Ansatz 2 wurde die Temperatur pro Tag jeweils 4 Stunden von 28 °C auf 35 °C und anschließend 4 Stunden weiter auf 40 °C erhöht, danach wurden die Kolben 16 Stunden bei 28 °C inkubiert. In Ansatz 3 wurden die Zellen zunächst einen Tag lang bei 40 °C inkubiert. Anschließend wurde ab dem zweiten Inkubationstag ein Temperaturprogramm durchgeführt, bei dem die Temperatur jeweils 8 Stunden auf 40 °C eingestellt und danach von 8-24 Stunden auf 28 °C abgesenkt wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.

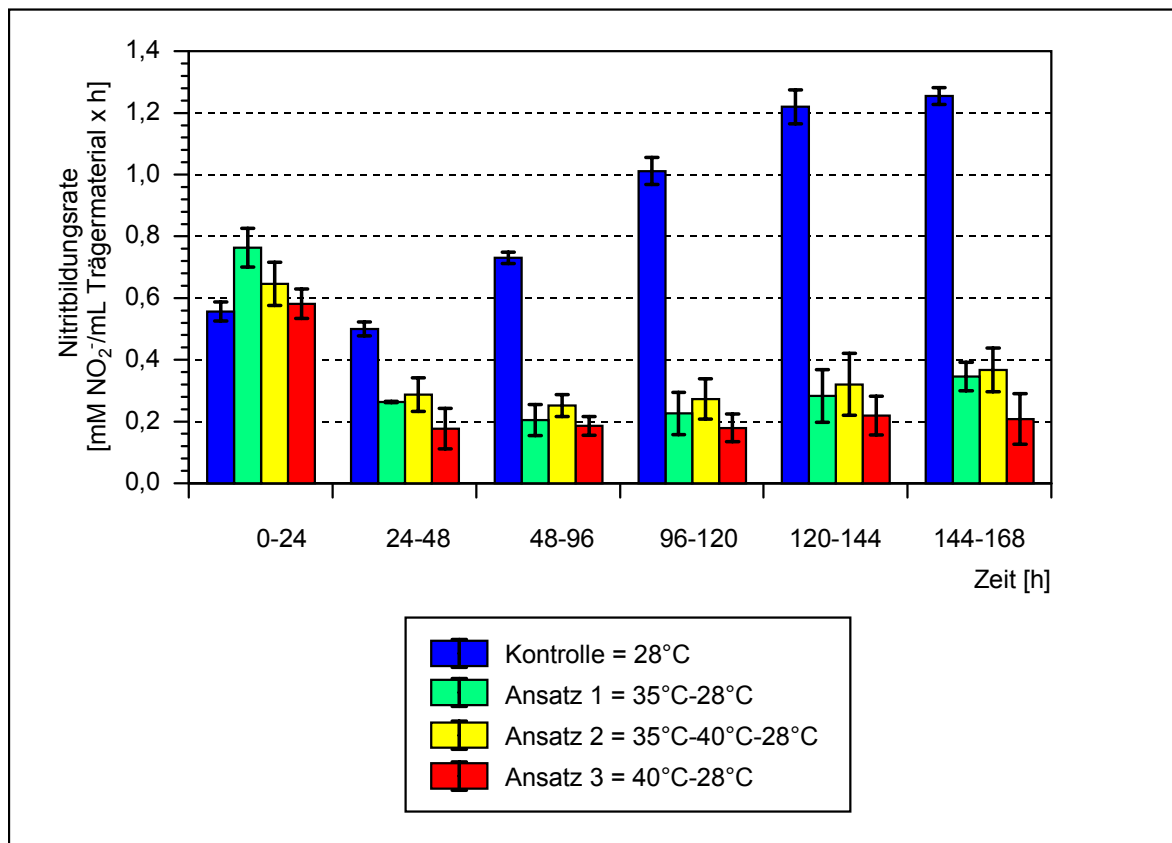


Abb. 13 Nitritbildungsrate von Biofilmmaterial aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage bei verschiedenen, wechselnden Temperaturen im Vergleich zu einer konstanten Inkubationstemperatur von 28°C.

In den Kontrollansätzen war bei konstanter Inkubation bei 28 °C nach einer lag-Phase von etwa 48 Stunden ein Anstieg der Nitritbildungsrate zu beobachten (Abb. 13).

In Ansatz 1 war die Nitritbildungsrate in den ersten 24 Versuchsstunden gegenüber der Kontrolle zunächst erhöht. Im Zeitraum von 24-48 Stunden war die Aktivität des Ansatzes dann deutlich herabgesetzt. Anschließend wurde bis zur Inkubationszeit von 120 Stunden eine niedrige Nitritbildungsrate gemessen. Im Zeitabschnitt von 120-168 Stunden Inkubation stieg die Aktivität geringfügig an (Abb. 13). In Ansatz 2 war derselbe Verlauf der Nitritbildungsrate ausgeprägt wie in Ansatz 1 (Abb. 13).

Auch in Ansatz 3 entsprach der Verlauf der Nitritbildungsrate zunächst dem für Ansatz 1 und Ansatz 2 beschriebenen. Allerdings wurde in Ansatz 3 kein Anstieg der Nitritbildungsrate in den letzten beiden Versuchstagen gefunden. Außerdem war die Nitritbildungsrate von Ansatz 3 jeweils geringer die der anderen Ansätze.

Dieses Ergebnis zeigte, dass die Nitritbildung von Biofilmmaterial durch hohe Temperaturen bei der Einwirkung in Intervallen weniger gehemmt wurde als bei konstanter Inkubationstemperatur und lieferte damit ein erstes Indiz auf zelluläre Schutzmechanismen von Ammoniakoxidanten gegenüber hohen Standorttemperaturen.

4.1.9 Charakterisierung der Ammoniakoxidantenpopulation

Zur Ermittlung der Ursachen, die die gleichbleibend hohe Nitrifikationsleistung der Pilotanlage bei Betriebstemperaturen von 37-42 °C ermöglicht haben könnten, sollten die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss der Temperatur auf Ammoniak oxidierende Bakterien durch Versuche mit einer Reinkultur ergänzt werden. Um dafür einen standortrelevanten Vertreter einsetzen zu können, wurde im Weiteren die Zusammensetzung der Population bestimmt.

4.1.9.1 Isolierung und serologische Charakterisierung

Zunächst wurde der Frage nachgegangen, ob die gegenüber kommunalen Kläranlagen deutlich abweichenden Betriebsbedingungen zur Selektion eines die Population dominierenden Ammoniakoxidanten geführt hatten. In diesem Zusammenhang wurde auch geprüft, ob durch die Temperaturen im Pilotreaktor thermophile bzw. thermotolerante Ammoniak oxidierende Bakterien angereichert worden waren. Dazu wurden Anreicherungskulturen mit Biofilmmaterial beimpft und bei 41 °C inkubiert. In den Kulturen wurde nach einem Tag Nitrifikationsaktivität nachgewiesen. Nach zwei Tagen war keine Aktivität mehr vorhanden. Im Biofilm des Nitrifikationsreaktors der Pilotanlage konnten somit keine thermophilen Ammoniakoxidanten nachgewiesen werden.

Anschließend wurden Anreicherungskulturen bei 33 °C und damit unter mesophilen Bedingungen inkubiert. Diese Anreicherungskulturen wurden mit Biofilmmaterial aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage oder mit Zellsuspension aus MPN-Röhrchen der höchsten positiven Verdünnungsstufe beimpft. Aus den Anreicherungen wurden insgesamt 41 Stämme als Reinkulturen isoliert.

Alle Isolate wurden in phasenkontrastmikroskopischen Untersuchungen aufgrund ihrer Zellmorphologie der Gattung *Nitrosomonas* zugeordnet. Mit Hilfe der Immunofluoreszenz (IF)-Technik sollte der Serotyp der Isolate bestimmt werden. Dafür wurden Antiseren gegen insgesamt 7 Stämme der Gattung *Nitrosomonas* eingesetzt. Die verwendeten Seren besaßen eine hohe Spezifität. Positive Kreuzreaktionen wurden ausschließlich zwischen Stämmen einer Art ermittelt. Kreuzreaktionen mit Stämmen anderer Arten traten nicht auf (SOWITZKI, 1992).

Durch die Untersuchungen mit diesen 7 Seren konnte zunächst etwa die Hälfte der Isolate serologisch charakterisiert werden (Tab. 5): 4 Isolate (10 %) konnten *Nitrosomonas europaea* Nm 50, 13 Isolate (32 %) *Nitrosomonas eutropha* zugeordnet werden. Dabei zeigten 7 Stämme mit *N. eutropha* Nm 14 (17 %) und 6 Stämme (15 %) mit Nm 23 eine positive Kreuzreaktion. *Nitrosomonas spec.* Nm P34x war mit 4 Isolaten (10 %) vertreten. Dagegen zeigte keines der Isolate mit Antiserum gegen *Nitrosomonas eutropha* Nm 53, *Nitrosomonas nitrosa* Nm 90 und *Nitrosomonas ureae* Nm 60 eine positive Kreuzreaktion.

Tab. 5: Immunofluoreszenz-Reaktionen der Isolate N 1 - N 27 und N 50 - N 63 mit Antiseren gegen Zellen der Bakterienstämme *Nitrosomonas europaea* Nm 50, *Nitrosomonas eutropha* Nm 14, Nm 23 und Nm 53, *Nitrosomonas ureae* Nm 60, *Nitrosomonas nitrosa* Nm 90 und *Nitrosomonas spec.* Nm P34x, *Nitrosomonas spec.* Nm N1 und *Nitrosomonas spec.* Nm N56. 0=keine, 4+=maximale Fluoreszenz, positive Kreuzreaktionen sind grau hinterlegt

Isolat	Material	Kreuzreaktion mit Antiserum gegen Zellen des Stammes								
		Nm 50	Nm 14	Nm 23	Nm 53	Nm 60	Nm 90	Nm P34x	NmN1	NmN56
Nm N1	Biofilm (17. 11. 1995)	1 +	0	0	0	0	1+	1+	4+	0
Nm N2		0	1+	0	0/1+	0	0	1+	0	0
Nm N3		0	2+	4+	0	0	1+	1+	1+	0
Nm N4		2+	1+	4+	0	0	0	1+	0	0
Nm N5		0/1+	4+	2+	0	0	1+	0	2+	0
Nm N6		1+	2+	4+	0	0	0	1+	2+	0
Nm N7		0	4+	0	0/1+	0	0	0	0/1+	0
Nm N8		2+	1+/2+	4+	0	0	0	0	0/1+	0
Nm N9		0/1+	2+	1+	0	1+	0	2+/3+	2+	0
Nm N10		0	0	0	0	0	0	0	4+	0
Nm N11		0	1+	0	0	0	0	0+	0	0
Nm N12		4+	0	0	0	0	0	2+	0	0
Nm N13		1+	2+	2+	1+	0	0	3+/4+	2+	0
Nm N14		0	1+	3+/4+	0	0	0	2+	0	0
Nm N15		2+	2+/3+	0/1+	1+	0	0	0	4+	0
Nm N16		0/1+	4+	2+	0	0	0	2+	2+	1+
Nm N17		0	1+	0	0	0	0	4+	2+	1+
Nm N18	Biofilm (06. 08. 1996)	0	0	1+	0	0	0	3+/4+	0	0
Nm N19		2+	0	3+/4+	0	0	0	0	0	0
Nm N20		0	0	0	0	0	0	2+	0	0
Nm N21		2+	0	0	0/1+	0	0	4+	2+	0
Nm N22		0	4+	0	0/1+	0	0	0	0	0
Nm N23	MPN-Röhrchen (21. 02.; 06. 03. und 22. 05. 1996)	4+	0	0	0	0	0	0	0	0
Nm N24		0	0	2+	0	0	0	0	0	0
Nm N25		0	4+	1+	0	0	1+	0	0	0
Nm N26		0	4+	2+/3+	0	0	0	0	0	0
Nm N27		0	0	1+	0	0	0	0	0	0
Nm N50		1+	0	0	0/1+	0	0	2+	4+	0
Nm N51	MPN-Röhrchen (19. 06. 1996)	0	4+	1+	0/1+	0	0	1+	2+	0
Nm N52		0	0	1+	0	1+	0	0	0	0
Nm N53		2+	2+	0/1+	0/1+	0	0	0	0	4+
Nm N54		4+	1+	1+/2+	0	0	0	1+	0	1+
Nm N55		0	0	0/1+	0	0	0	1+	0	0
Nm N56		1+	1+	2+	1+	0	0	0	0	4+
Nm N57		1+	0/1+	0	1+/2+	0	0	0/1+	4+	0
Nm N58		0	0	0	1+	0	0	0	0	0
Nm N59		4+	1+	0/1+	1+/2+	0	0	0/1+	2+	0
Nm N60		2+	0	0/1+	1+	0	0	0	0	0
Nm N61		2+	0	0	0	0	0	2+	0	0
Nm N62		0	2+	0/1+	0	0	0	0	0	0
Nm N63		2+	0	0/1+	0	0	0	0	0	0

Von den 41 Isolaten konnten 20 Isolate serologisch nicht zugeordnet werden. Zur weitergehenden Charakterisierung der Population wurden zwei dieser Isolate zur Herstellung von Seren ausgewählt. Als Auswahlkriterium wurde dabei das Wachstumsverhalten herangezogen. Isolat Nm N1, das aus Biofilmmaterial isoliert worden war, zeigte in allen Wachstumsphasen eine starke Flockenbildung. Außerdem wurde Isolat Nm N56 eingesetzt, bei dem keine Aggregatbildung beobachtet worden war. Dieser Stamm war aus MPN-Röhrchen isoliert worden.

Auch die Antiseren gegen die beiden Isolate *Nitrosomonas* spec. NmN1 und *Nitrosomonas* spec. NmN56 zeigten keine Kreuzreaktion mit anderen Ammoniakoxidanten. Daher wurde geprüft, inwieweit weitere Isolate diesen Serotypen zugeordnet werden konnten (Tab. 5). Das Serum gegen *Nitrosomonas* spec. Nm N1 zeigte mit vier weiteren Stämmen eine positive Kreuzreaktion, so dass insgesamt 5 Isolate (12 %) diesem Stamm zugeordnet wurden. Das Serum gegen *Nitrosomonas* spec. Nm N56 zeigte mit noch einem weiteren Isolat (5 %) eine positive Kreuzreaktion.

Zusammenfassend konnten etwa zwei Drittel der Isolate serologisch verschiedenen Arten und Stämmen der Gattung *Nitrosomonas* zugeordnet werden. Diese Ergebnisse zeigten, dass die Ammoniakoxidantenpopulation im Biofilm des Pilotreaktors sehr heterogen zusammengesetzt war.

4.1.9.2 Ammoniakoxidantenpopulation des Biofilms

Der Hauptvertreter der heterogen zusammengesetzten Population war aus der Charakterisierung von Isolaten nicht abzuleiten. Daher wurde eine Populationsanalyse mit der IF-Methode durchgeführt, um die Häufigkeit verschiedener *Nitrosomonas*-Stämme im Biofilm zu ermitteln. Außerdem sollte geprüft werden, ob die unterschiedlichen Bedingungen der einzelnen Betriebsphasen einen Einfluss auf die Zusammensetzung der Ammoniakoxidantenpopulation des Pilotreaktors hatten. Die Zellzahlen der untersuchten Ammoniakoxidanten sind in Tab. 6 zusammengestellt, wobei die höchsten Zellzahl jeder Probe dunkelgrau und die zweithöchste hellgrau hinterlegt wurde.

Die Ammoniakoxidantenpopulation des Nitrifikationsreaktors der Pilotanlage war aus verschiedenen Arten und Stämmen mesophiler, Ammoniak oxidierender Bakterien zusammengesetzt, wobei die Populationszusammensetzung durch Bedingungen während verschiedener Betriebsphasen nicht wesentlich beeinflusst wurde. Die dunkelgrau hinterlegten Felder der Tabelle zeigen, dass die höchste Zellzahl jeweils für *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) oder den aus Biofilmmaterial der Pilotanlage isolierten Stamm *Nitrosomonas* spec. Nm N1 bestimmt wurde, wobei die Zellzahl des letzteren Stammes nicht in allen Proben ermittelt wurde.

Auch der aus Belebtschlamm einer Industriekläranlage isolierte *Nitrosomonas nitrosa* Nm 90 war regelmäßig in hoher Zellzahl im Biofilm vorhanden. Außerdem waren die anderen beiden Stämme von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 23 und Nm 53), *Nitrosomonas europaea* Nm 50 und *Nitrosomonas* spec. Nm P34x im Biofilm vertreten. Der aus dem Reaktor isolierte Stamm, *Nitrosomonas* spec. Nm N56, war dagegen nicht regelmäßig im Biofilm nachweisbar, nur in zwei von vier untersuchten Proben wurde er in geringer Zellzahl gefunden. Er spielte daher keine Rolle für die Umsatzleistung des Reaktors. Auch

Nitrosomonas ureae Nm 60 war nur in sehr geringer Zellzahl vertreten. *Nitrosococcus mobilis* Nc 2 war nicht nachweisbar.

Tab. 6: IF-Zellzahl verschiedener Stämme Ammoniak oxidierender Bakterien im Biofilm des Nitrifikationsreaktors der Pilotanlage während verschiedener Betriebsphasen, die höchste Zellzahl wurde dunkelgrau, die zweithöchste hellgrau hinterlegt. n.b.= nicht bestimmt; — = nicht nachweisbar

Tag der Probenahme	Zellzahl von Ammoniakoxidanten [Zellen/mL Trägermaterial]								
	<i>N. europaea</i>	<i>Nitrosomonas eutropha</i>			<i>N. ureae</i>	<i>N. nitrosa</i>	<i>N. spec.</i>	Isolate aus der Pilotanlage	
	Nm 50	Nm 14	Nm 23	Nm 53	Nm 60	Nm 90	Nm P34x	Nm N1	Nm N56
<i>Optimierungsphase 1 (Sauerstoffeintrag)</i>									
07. 11. 95	2,0x10 ⁷	9,8x10 ⁷	1,7x10 ⁷	1,4x10 ⁷	n.b.	1,8x10 ⁷	2,7x10 ⁵	n.b.	n.b.
24. 01. 96	3,1x10 ⁷	1,3x10 ⁸	4,4x10 ⁶	4,4x10 ⁷	3,8x10 ⁶	1,7x10 ⁷	1,4x10 ⁶	1,2x10 ⁸	1,7x10 ⁷
<i>Hochlastphase</i>									
06. 03. 96	3,3x10 ⁷	4,4x10 ⁷	7,4x10 ⁶	1,6x10 ⁷	n.b.	3,8x10 ⁷	2,8x10 ⁶	n.b.	n.b.
10. 05. 96	3,2x10 ⁷	9,0x10 ⁷	2,8x10 ⁷	1,4x10 ⁷	n.b.	3,3x10 ⁷	2,6x10 ⁷	n.b.	n.b.
02. 07. 96	1,3x10 ⁸	4,3x10 ⁸	1,1x10 ⁸	2,0x10 ⁸	1,2x10 ⁷	2,1x10 ⁸	6,1x10 ⁷	3,0x10 ⁸	1,0x10 ⁸
11. 09. 96	2,7x10 ⁷	3,2x10 ⁸	6,9x10 ⁷	9,1x10 ⁷	n.b.	4,9x10 ⁷	8,6x10 ⁶	n.b.	n.b.
29. 09. 96	1,8x10 ⁷	1,7x10 ⁸	4,8x10 ⁷	1,2x10 ⁸	6,8x10 ⁶	4,9x10 ⁷	5,2x10 ⁶	2,5x10 ⁸	—
<i>Optimierungsphase 2 (pH-Kontrolle)</i>									
21. 01. 97	2,5x10 ⁷	8,4x10 ⁷	2,3x10 ⁷	1,8x10 ⁷	6,9x10 ⁶	7,4x10 ⁷	2,9x10 ⁷	9,9x10 ⁷	—
28. 01. 97	7,6x10 ⁷	1,2x10 ⁸	4,9x10 ⁷	3,7x10 ⁷	n.b.	8,5x10 ⁷	1,6x10 ⁷	n.b.	n.b.

Aufgrund der hohen Zellzahl in allen untersuchten Proben konnten *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) und *Nitrosomonas spec.* Nm N1 als wesentliche Vertreter des Biofilms der Pilotanlage angesehen werden. Für die weiteren Versuche wurde *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) ausgewählt, da es sich bei diesem Stamm im Unterschied zu dem Eigenisolat um einen bereits beschriebenen Stamm handelte.

4.2 Der Einfluss der Temperatur auf *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) in Kurzzeitversuchen

Im Nitrifikationsreaktor war die Betriebstemperatur in den Sommermonaten auf 37-42 °C gestiegen, ohne dass die Reaktorleistung abnahm. In Laborversuchen mit Biofilmmaterial wurde die Nitrifikation dagegen bei 37 °C bereits nach 4tägiger Inkubation vollständig unterdrückt. Diesem Widerspruch zwischen den Ergebnissen aus Laborversuchen und dem Anlagenbetrieb sollte in ersten Versuchen mit Reinkulturen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) nachgegangen werden.

Dazu wurde der Einfluss eines breiten Temperaturspektrums von 28-43 °C auf die Nitritbildung von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) untersucht. Dieser Temperaturbereich wurde ausgewählt, da sich die Betriebstemperatur des Nitrifikationsreaktors der Pilotanlage in der Regel zwischen diesen Werten befand. Die Experimente wurden als Kurzzeitversuche von 8 Stunden Dauer durchgeführt. Neben der Aktivität wurden die Zunahme des Proteingehaltes zur Beschreibung des Wachstums und die Zunahme der Gesamtzellzahl zum Nachweis der Vermehrung bestimmt. Damit sollte geprüft werden, inwieweit neben der Aktivität Wachstum und Vermehrung der Zellen durch die Temperatur beeinflusst wurden.

4.2.1 Einfluss der Temperatur auf die Nitritbildung

Zunächst wurde der Einfluss verschiedener Temperaturen auf die Nitrifikationsaktivität verfolgt. Dazu wurde die relative Nitritbildungsrate berechnet. Als Bezugsgröße (100 %) diente jeweils die Nitritbildungsrate bei 28 °C. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur von 28 °C auf 33 °C führte zu einer Erhöhung der Nitritbildungsrate gegenüber der Kontrolle um 45 % (Abb. 14).

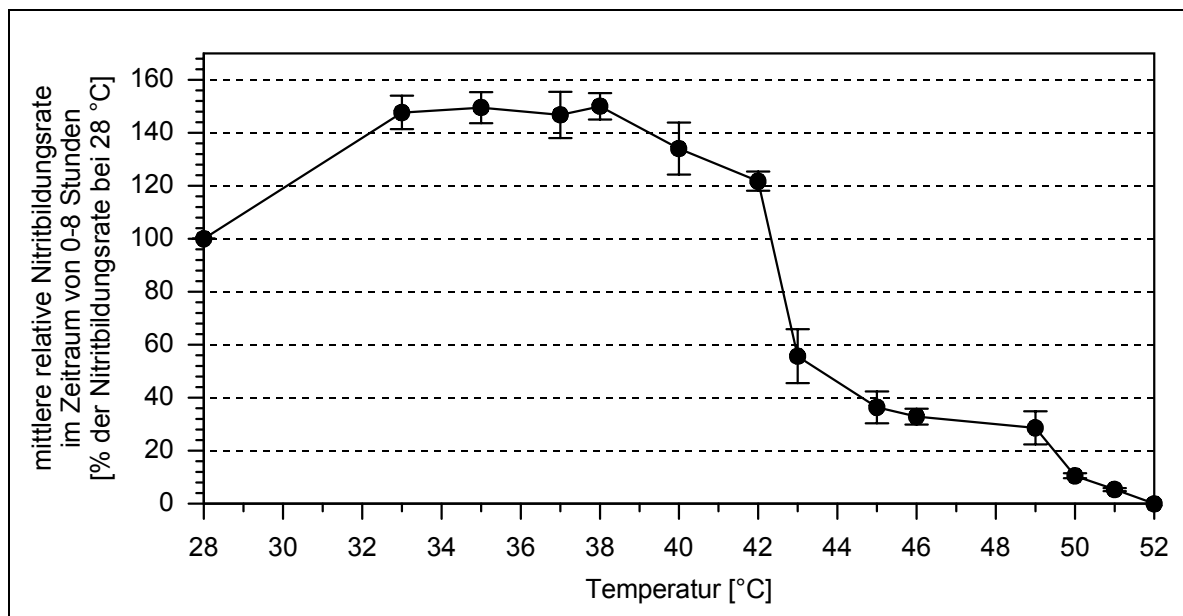


Abb. 14 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die mittlere Nitritbildungsrate von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) im Kurzzeitversuch (8 Stunden Inkubation). Angegeben ist die relative Nitritbildungsrate in % der im Zeitraum von 0-8 Stunden ermittelten Ausgangsaktivität der bei 28 °C inkubierten Kontrollansätze.

Auch bei 35 °C, 37 °C und 38 °C wurde die Nitritbildung um in der gleichen Größenordnung gefördert. Bei 40 °C betrug die Förderung etwa 30 %, bei 42 °C noch etwa 20 %. Bei weiterer Temperaturerhöhung war ein starker Rückgang der Aktivität nachweisbar. Bei 43 °C wurden nur noch etwa 50 % der Ausgangsaktivität gefunden. Von 43 °C bis 52 °C ging die Nitritbildungsrate bis auf Null zurück.

Die Erhöhung der Aktivität im Temperaturbereich von 28 °C – 33 °C dürfte vor allem auf eine Steigerung der chemischen Umsatzgeschwindigkeit durch die Temperatur zurückzuführen sein (ARRHENIUS, 1889). Bei Temperaturen oberhalb von 33 °C wurde die Nitritbildungsrate nicht mehr weiter erhöht. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass schon bei 33 °C die maximale Umsatzgeschwindigkeit dieses Enzymsystems erreicht war oder hemmende Temperatureinflüsse vorlagen. Der Rückgang der Aktivität in den Ansätzen von 42 °C – 51 °C dürfte auf eine zunehmende Schädigung der Enzymsysteme hinweisen.

51 °C war die höchste Temperatur, bei der Nitritbildung nachweisbar war und stellte demnach das Temperaturmaximum für die Aktivität von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) im Kurzzeitversuch dar.

4.2.2 Einfluss der Temperatur auf das Wachstum

Außerdem wurden die Auswirkungen von verschiedenen Temperaturen auf das Wachstum untersucht. Die Zellmasse wurde durch Messung des Proteingehaltes als repräsentative Größe erfasst. Aus dem Anstieg des Proteingehaltes wurde jeweils die Wachstumsrate errechnet.

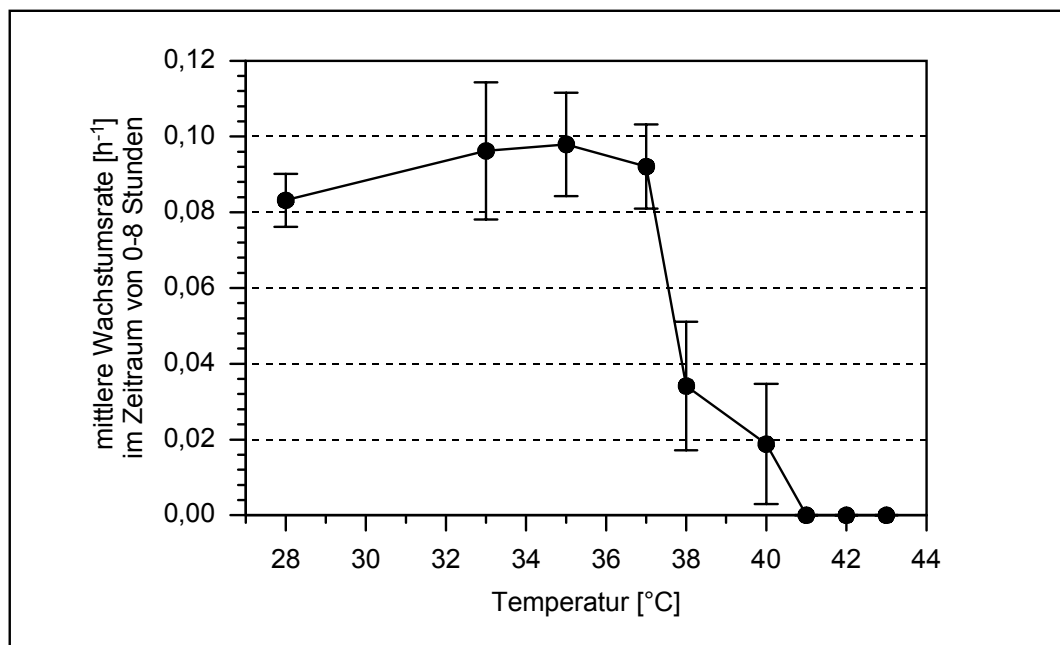


Abb. 15 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die mittlere Wachstumsrate von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) im Kurzzeitversuch (8 Stunden Inkubation).

Analog zur Aktivität war bei Erhöhung der Inkubationstemperatur von 28 °C auf 33 °C auch die Wachstumsrate erhöht (Abb. 15). Bei 35 °C und 37 °C lag die Wachstumsrate jeweils in der gleichen Größenordnung wie bei 33 °C. Bei Temperaturen von 38 °C und 40 °C war die Wachstumsrate dagegen deutlich herabgesetzt. Ein Vergleich der Nitritbildungsrate mit der Wachstumsrate in diesem Temperaturbereich zeigt, dass die durch den hohen Substratumsatz freiwerdende Energie nur zu einem geringen Anteil zum Aufbau neuer Zellmasse verwendet werden konnte. Bei den Inkubationstemperaturen 41-43 °C war trotz Substratoxidation keine Zunahme des Proteingehaltes messbar.

40 °C war die höchste Temperatur, bei der Wachstum nachweisbar war und stellte demnach das Temperaturmaximum für das Wachstum von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) im Kurzzeitversuch dar. Die Proteinbildung war damit bereits bei deutlich geringerer Temperatur unterdrückt als die Substratoxidation.

4.2.3 Einfluss der Temperatur auf die Zellvermehrung

Die vorangegangenen Ergebnisse hatten gezeigt, dass die Wachstumsrate in deutlich stärkerem Maße durch hohe Temperaturen beeinflusst wurde als die Aktivität. Daher sollte nun geklärt werden, wie der Einfluss der Temperatur auf die Zellteilung ausgeprägt war. Aus der Zunahme der Gesamtzellzahl der Kulturen wurde die Vermehrungsrate errechnet.

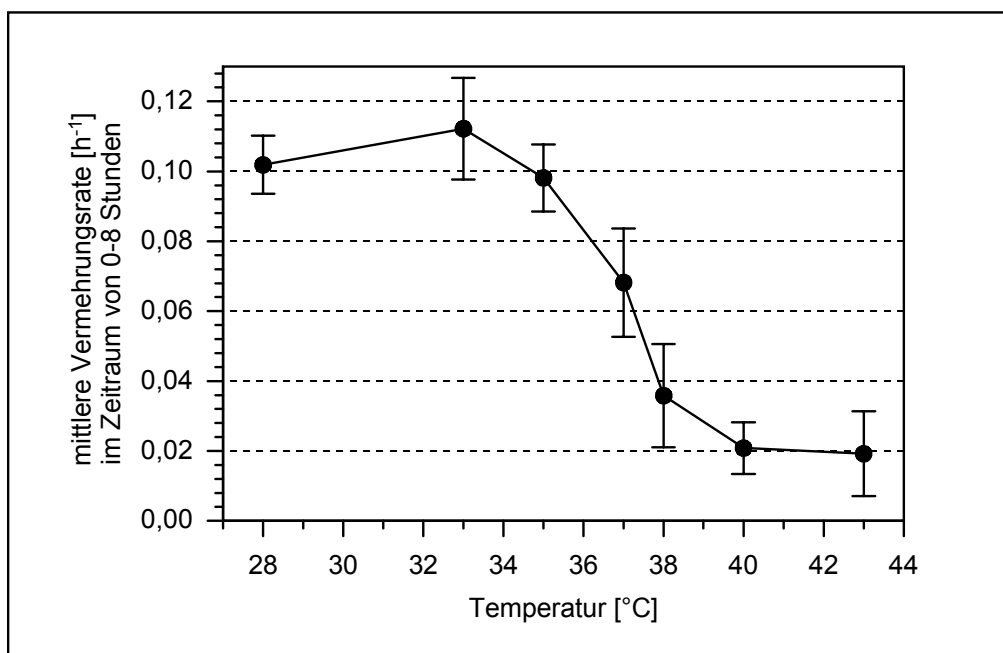


Abb. 16 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die mittlere Vermehrungsrate einer wachsenden Kultur von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) im Kurzzeitversuch (8 Stunden Inkubation).

Bei Temperaturerhöhung von 28 °C auf 33 °C war die Vermehrungsrate analog zur Wachstumsrate erhöht (Abb. 16). Bei Temperaturen von 35 °C, 37 °C und 38 °C wurde die Vermehrung zunehmend durch die Temperatur gehemmt, so dass die Vermehrungsrate stark zurückging. Die Vermehrung wurde bei 35 °C und 37 °C durch die Temperatur stärker herabgesetzt als das Wachstum, was vermutlich eine Vergrößerung der Zellen zur Folge hatte.

Bei 40 °C und 43 °C wurde jeweils die gleiche, niedrige Vermehrungsrate ermittelt, die nur mit einer äußerst geringen bzw. keiner Zunahme von Zellprotein einherging. Da in schnell wachsenden Zellen der die Bildung des Septums einleitende Z-Ring schon direkt nach der Zellteilung gebildet wird (ADDINALL et al., 1996) und die Zellen für die Versuche jeweils aus exponentiell wachsenden Kulturen entnommen worden waren, dürften die errechneten niedrigen Vermehrungsraten bei 40 °C und 43 °C nur auf die Beendigung bereits initiierteter Zellteilungen zurückzuführen sein.

Außerdem wurde die Generationszeit für *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) bei verschiedenen Inkubationstemperaturen berechnet (Tab. 7). Die minimale Generationszeit wurde mit 8,9 Stunden bei der Inkubationstemperatur von 33 °C bestimmt. Bei 28 °C und 35 °C, war die Generationszeit mit 9,8 bzw. 10,2 Stunden höher. Bei 37 °C und 38 °C wurde jeweils eine stark verlängerte Generationszeit ermittelt. Bei 40 °C betrug die Generationszeit 48,0 Stunden, bei 43 °C wurden 52,1 Stunden errechnet.

Tab. 7 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die mittlere Generationszeit einer wachsenden Kultur von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) im Kurzzeitversuch (8 Stunden Inkubation)

Temperatur	28 °C	33 °C	35 °C	37 °C	38 °C	40 °C	43 °C
Generationszeit	9,8 h	8,9 h	10,2 h	14,7 h	27,9 h	48,0 h	52,1 h

4.3 Der Einfluss der Temperatur auf *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) in Versuchen von 24 Stunden Dauer

Die bisherigen Ergebnisse hatten gezeigt, dass bei Temperaturen von 37-43 °C die Aktivität, sowie Wachstum und Vermehrung der Zellen in unterschiedlichem Maße beeinflusst waren. Diesem Punkt sollte im Folgenden weiter nachgegangen werden. Die Inkubationszeit wurde auf 24 Stunden verlängert, um mögliche Effekte deutlicher erkennen zu können.

4.3.1 Einfluss der Temperatur auf die Zellmorphologie

Die Vermehrungsrate der Zellen war in den 8stündigen Versuchen bei 37 °C gegenüber der Kontrolle von 28 °C deutlich herabgesetzt, während die Wachstumsrate gefördert war. Dies wies auf eine Vergrößerung der Zellen hin. Zur Prüfung dieses Zusammenhangs wurde exemplarisch der Einfluss der Temperatur von 37 °C auf die Zellmorphologie untersucht.

Die Versuchskulturen wurden für 24 Stunden bei 37 °C und als Kontrolltemperatur bei 28 °C inkubiert und phasenkontrastmikroskopisch untersucht. Anhand der mikroskopischen Aufnahmen wurde die Morphologie der Zellen charakterisiert und ihre Größe durch Messung exakt bestimmt.

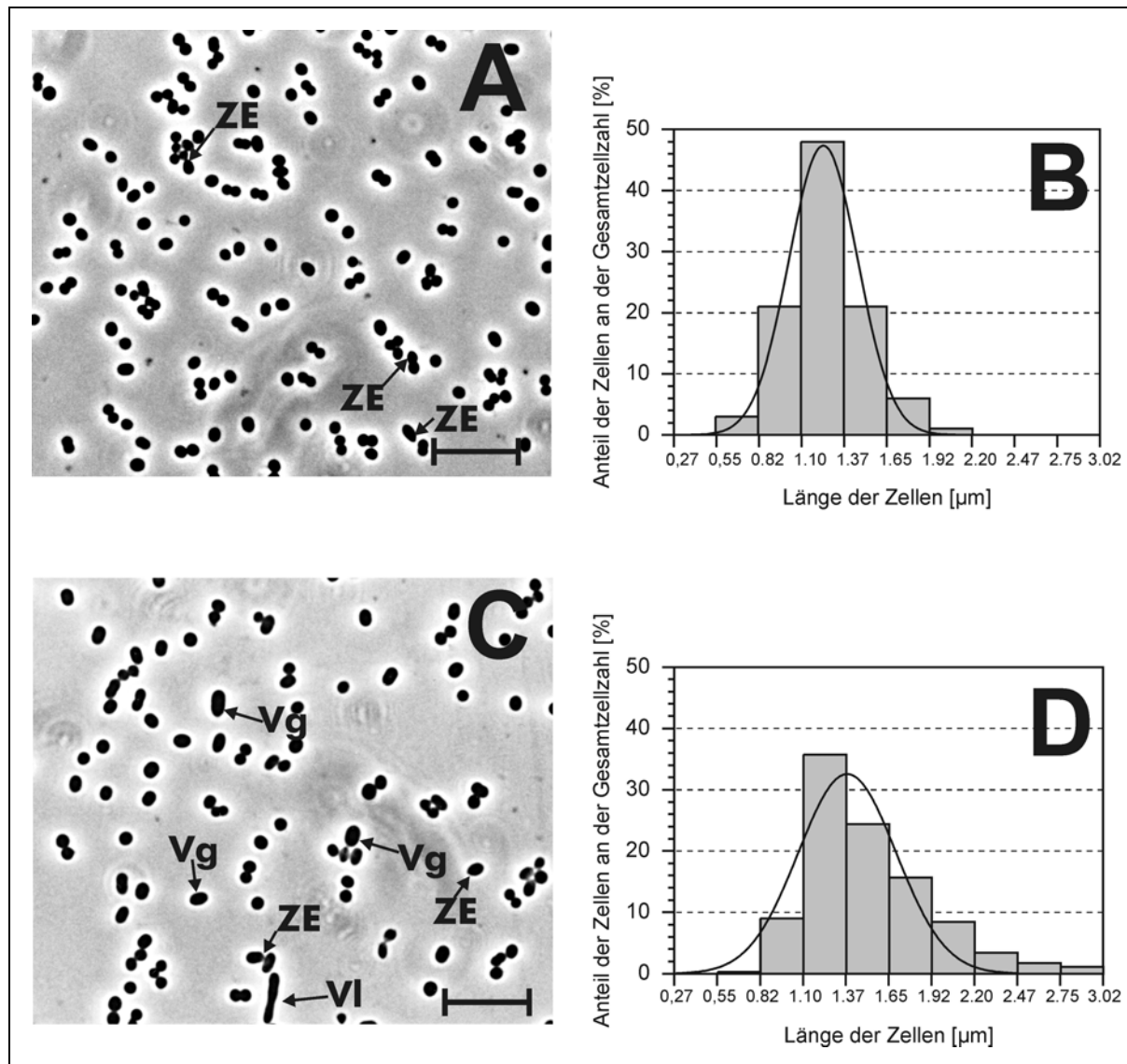


Abb. 17 Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14)-Zellen nach 24 Stunden Inkubation in HEPES-gepufferter Nährlösung bei 28 °C (A) und 37 °C (C)., ZE = zugespitztes Zellende, Vg = Vergrößerte Zelle; VI = Verlängerte Zelle. Die Balkenlänge entspricht 10 µm. Histogramm der Häufigkeitsverteilung der Zelllängen bei 28 °C (B) und 37 °C (D) mit der Funktion der Normalverteilung (Gauß).

Abb. 17A zeigt eine Aufnahme von charakteristischen Zellen nach Inkubation bei 28 °C. Die Zellen waren gedrungene Kurzstäbchen. Die für *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) typische Zellform von Stäbchen mit an einer Seite zugespitztem Zellende (KOOPS et al., 1991) wurde nur sehr selten gefunden. Zellen mit zugespitztem Zellende sind in mit ZE markiert. Die beobachtete Abkuglung der Zellen war vermutlich auf den Einfluss der eingesetzten HEPES-Puffersubstanz zurückzuführen (HARMS, pers. Mitt.). Messungen ergaben eine durchschnittliche Zelllänge von 1,27 µm bei einem mittleren Zelldurchmesser von 1,13 µm. Die Zelllängen waren normalverteilt, wobei die meisten Zellen der Klasse von 1,13-1,37 µm Länge zugeordnet werden konnten (Abb. 17B).

In Abb. 17C sind Zellen nach 24stündiger Inkubation bei der superoptimalen Temperatur von 37 °C dargestellt. Auch bei dieser Temperatur waren nur wenige Zellen mit zugespitz-

tem Zellende zu erkennen. Dagegen war ein Teil der Zellen deutlich vergrößert. Bei der Zellvergrößerung nahm vor allem die Länge der Zellen zu. Die durchschnittliche Zelllänge stieg auf 1,51 μm . Der mittlere Durchmesser der Zellen betrug wie bei 28 °C 1,13 μm . Abb. 17C zeigt, dass bei 37 °C der Anteil von Zellen mit einer Zelllänge >1,65 μm deutlich erhöht war.

4.3.2 Einfluss der Temperatur auf die spezifische Aktivität, den Zellertragskoeffizient und den Nutzeffekt

Die Zunahme des Proteingehaltes war in den ersten 8 Inkubationsstunden bei Temperaturen von 38-43 °C stärker herabgesetzt als die Nitritbildung. Daher wurde untersucht, inwieweit die bei der Substratoxidation freigesetzte Energie bei Temperaturen von 28-43 °C zum Aufbau von Zellmasse genutzt wurde. Dazu wurden die spezifische Aktivität, der Ertragskoeffizient und der Nutzeffekt bei Temperaturen von 28-43 °C bestimmt. Die Daten sind in Tab. 8 zusammengefasst.

Tab. 8 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die mittlere spezifische Aktivität, den mittleren Zellertragskoeffizienten und den mittleren Nutzeffekt einer wachsenden Kultur von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) nach 24 Stunden Inkubation

Temperatur	Spezifische Aktivität [mmol Nitrit/ g Protein x h]	Zellertrags- koeffizient [μg Protein/ mmol Nitrit]	Nutzeffekt [%]
28 °C	149 ($\pm$ 11)	492 ($\pm$ 72)	8,4 ($\pm$ 1,2)
33 °C	154 ($\pm$ 11)	402 ($\pm$ 45)	6,3 ($\pm$ 0,1)
35 °C	151 ($\pm$ 7)	415 ($\pm$ 25)	6,5 ($\pm$ 0,4)
37 °C	145 ($\pm$ 22)	366 ($\pm$ 55)	5,7 ($\pm$ 0,9)
38 °C	155 ($\pm$ 23)	134 ($\pm$ 21)	2,4 ($\pm$ 0,3)
40 °C	148 ($\pm$ 19)	84 ($\pm$ 5)	1,3 ($\pm$ 0,1)
43 °C	62 ($\pm$ 10)	0	0

Die Nitritbildungsrate zeigte im Temperaturbereich von 28 °C – 40 °C keine großen Unterschiede. Die spezifische Aktivität betrug jeweils etwa 150 mmol Nitrit/g Protein x h. Lediglich bei 43 °C war die Nitritbildung deutlich geringer, was eine niedrigere spezifische Aktivität von 62 mmol Nitrit/g Protein x Stunde ergab.

Die bei der Substratoxidation freigesetzte Energie wurde aber von den Zellen in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur in sehr unterschiedlichem Maße zum Aufbau neuer Zellsubstanz genutzt. Der höchste Zellertragskoeffizient wurde bei 28 °C mit 492 μg Protein/mmol Nitrit ermittelt. Das entspricht einem Nutzeffekt von 8,4 % (Tab. 8).

Die bei 33 °C und 35 °C ermittelten Ergebnisse für Zellertragskoeffizient bzw. Nutzeffekt waren im Vergleich zu den bei 28 °C bestimmten Werten etwa um 25 % niedriger. Bei

37 °C waren Zellertragskoeffizient und Nutzeffekt noch weiter reduziert. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 38 °C und 40 °C führte zu einem starken Rückgang dieser Parameter. Bei 43 °C wurde die Proteinbiosynthese sofort total gehemmt, so dass Zellertragskoeffizient und Nutzeffekt auf Null sanken (Tab. 8). Das zeigt, dass bei Temperaturen von 33-40 °C ein zunehmender Teil der freigesetzten Energie nicht mehr für die Biosynthese von Zellsubstanz genutzt wurde.

Diese Ergebnisse bestätigen noch einmal den unterschiedlichen Einfluss der Temperatur auf Aktivität und Wachstum. Während die Aktivität im Temperaturbereich von 33-40 °C kaum beeinflusst war, war die thermodynamische Ausbeute zunehmend herabgesetzt.

4.4 Der Einfluss der Temperatur auf *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) in mehrtägigen Versuchen

Die ersten Versuche hatten gezeigt, dass die Aktivität von Zellen bei 8stündiger Inkubation bei 40 °C nicht herabgesetzt war. Der Zellertragskoeffizient und der Nutzeffekt waren nach 24stündiger Inkubation allerdings schon stark reduziert. Neben der Höhe der Temperatur war somit auch ihre Einwirkungsdauer von großer Bedeutung. Daher wurden weitere Versuche mit verlängerten Inkubationszeiten durchgeführt, um die langfristigen Auswirkungen der Temperatur auf den Stoffwechsel von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) zu ermitteln.

Zunächst wurden exemplarisch in Versuchen von 48 Stunden Dauer die Auswirkungen einer Temperatur von 40 °C auf Aktivität, Wachstum und Vermehrung im Vergleich zu einer optimalen Temperatur von 28 °C untersucht. Damit sollte ermittelt werden, inwieweit der Stoffwechsel von *N. eutropha* durch 2tägige Inkubation bei 40 °C beeinflusst wurde. Die Ergebnisse sind in Abb. 18 dargestellt.

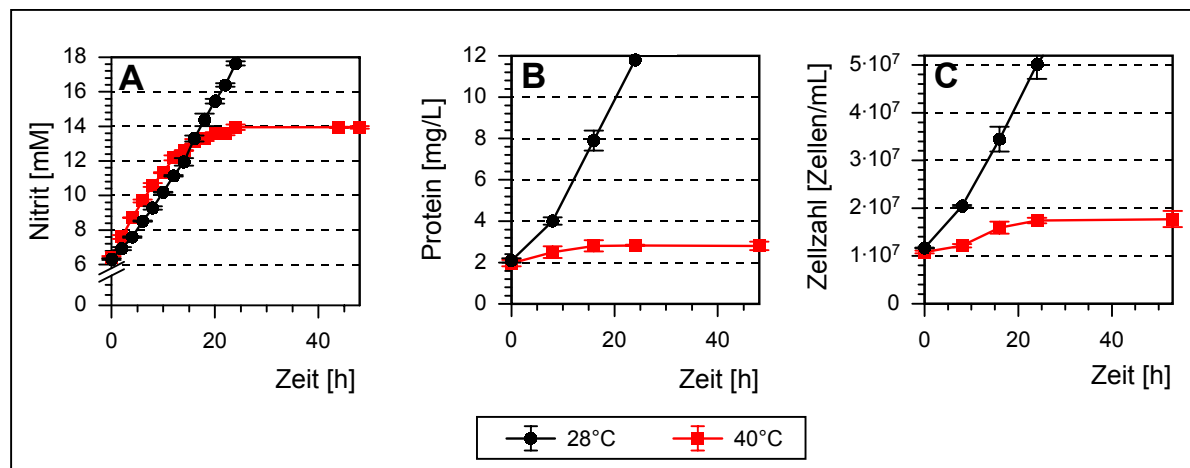


Abb. 18 Einfluss der Temperatur auf die gebildete Nitritmenge (A), den Proteingehalt (B) und die Gesamtzellzahl (C) von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) in statischer Kultur.

Bei 28 °C wurde in den Versuchskolben jeweils ein deutlicher Anstieg der Nitritkonzentration, des Proteingehaltes und der Zellzahl bestimmt, wobei alle Parameter gleichsinnig verliefen (Abb. 18A-C).

Bei 40 °C wurde in den ersten 6-10 Stunden eine hohe Nitritbildung gemessen, wobei die Nitritbildungsrate der Ansätze höher war als bei 28 °C. Bei weiterer Inkubation wurde die Nitritbildung zunehmend herabgesetzt. Nach 24 Stunden konnte bei 40 °C keine weitere Zunahme der Nitritkonzentration mehr bestimmt werden (Abb. 18A). Auch der Proteingehalt und die Zellzahl stiegen bei 40 °C zunächst an. Im Unterschied zur Nitritbildung war die Zunahme aber bereits in den ersten Stunden deutlich geringer als bei 28 °C (Abb. 18B,C). Nach 16 Stunden konnte keine weitere Zunahme des Proteingehaltes, nach 24 Stunden auch keine weitere Zunahme der Zellzahl mehr festgestellt werden.

Die Ergebnisse zeigten somit, dass sowohl die Nitritbildung, als auch Wachstum und Vermehrung durch Inkubation bei 40 °C vollständig gehemmt wurden. Nur in den ersten 16-24 Inkubationsstunden wurden Nitritbildung, Proteinsynthese und Vermehrung gemessen, wobei diese Stoffwechselleistungen nicht miteinander gekoppelt waren. In den weiteren Versuchen sollte untersucht werden, ob diese Entkopplung auch bei anderen Temperaturen auftrat. Die Versuchszeit wurde auf 7 Tage verlängert, damit sich mögliche Temperatureffekte stärker ausprägen konnten.

4.4.1 Einfluss der Temperatur auf die Nitritbildung

Zunächst wurde der Einfluss von 28-43 °C auf die Nitritbildung von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) untersucht. Für die Versuche im Temperaturbereich von 28-37 °C wurden die Ansätze jeweils mit einer Zellzahl von 1×10^6 Zellen/mL beimpft und der pH-Wert der Kulturen durch Zugabe von steriler 5%iger Natronlauge nachreguliert. Inkubationstemperaturen von 28 °C und 33 °C führten zu einer starken Zunahme der Nitritkonzentration (Abb. 19 A).

Auch bei 35 °C wurde eine starke Nitritbildung gemessen, wobei die Bildungsgeschwindigkeit nach 48 Stunden Inkubation aber gegenüber 28 °C und 33 °C deutlich herabgesetzt war. Nach etwa 96 Stunden war bei 35 °C die eingesetzte Ammoniummenge der Ansätze oxidiert (Abb. 19A). Daher wurden zusätzlich Versuche mit einer auf 5×10^5 Zellen/mL reduzierten Zellzahl durchgeführt. In Abb. 19B ist jeweils die mittlere Nitritbildungsrate über einen Zeitraum von 24 Stunden dargestellt. Die Ergebnisse zeigen, dass bei 35 °C eine Nitritbildung über den gesamten Versuchszeitraum von sieben Tagen erfolgte. Die Aktivität stieg in den ersten beiden Tagen deutlich an. Am dritten Inkubationstag wurde ein geringfügiger weiterer Anstieg bestimmt. Am vierten Tag entsprach die Nitritbildungsrate der von Tag 3, während sie an Tag 5,6 und 7 jeweils abnahm. 35 °C war die höchste Temperatur, bei der über den gesamten Versuchszeitraum Nitritbildung nachweisbar war und stellte damit das Temperaturmaximum für die Aktivität von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) in den einwöchigen Versuchen dar.

Bei 37 °C wurde die Nitritbildung im Versuchsverlauf zunehmend gehemmt. Nach etwa 100 Stunden Versuchsdauer war in den Ansätzen keine Nitritbildung mehr nachweisbar (Abb. 19A). Versuche einer höheren Zellzahl von 1×10^7 Zellen/mL ergaben, dass die Nitrit-

bildung in den ersten 48 Stunden bei dieser Temperatur noch mit hoher Rate erfolgte (Abb. 19C).

Auch bei 38-43 °C wurde die Nitritbildung im Versuchsverlauf zunehmend gehemmt bis sie vollständig unterdrückt war (Abb. 19C). Diese Ansätze wurden mit einer höheren Zellkonzentration von 1×10^7 Zellen/mL beimpft, um auch bei hoher Temperatur den Verlauf der Nitritbildung verfolgen zu können.

Bei 38 °C war die Nitritbildung im Unterschied zu 37 °C bereits nach 24 Stunden stark herabgesetzt. Nach etwa 120 Stunden war sie vollständig unterdrückt (Abb. 19C). Bei 40 °C wurde in den Versuchsansätzen bereits nach 48 Stunden keine Nitritbildung mehr gefunden. Bei 43 °C war der Zeitraum der Nitritbildung weiter verkürzt und betrug nur noch 16 Stunden (Abb. 19 C).

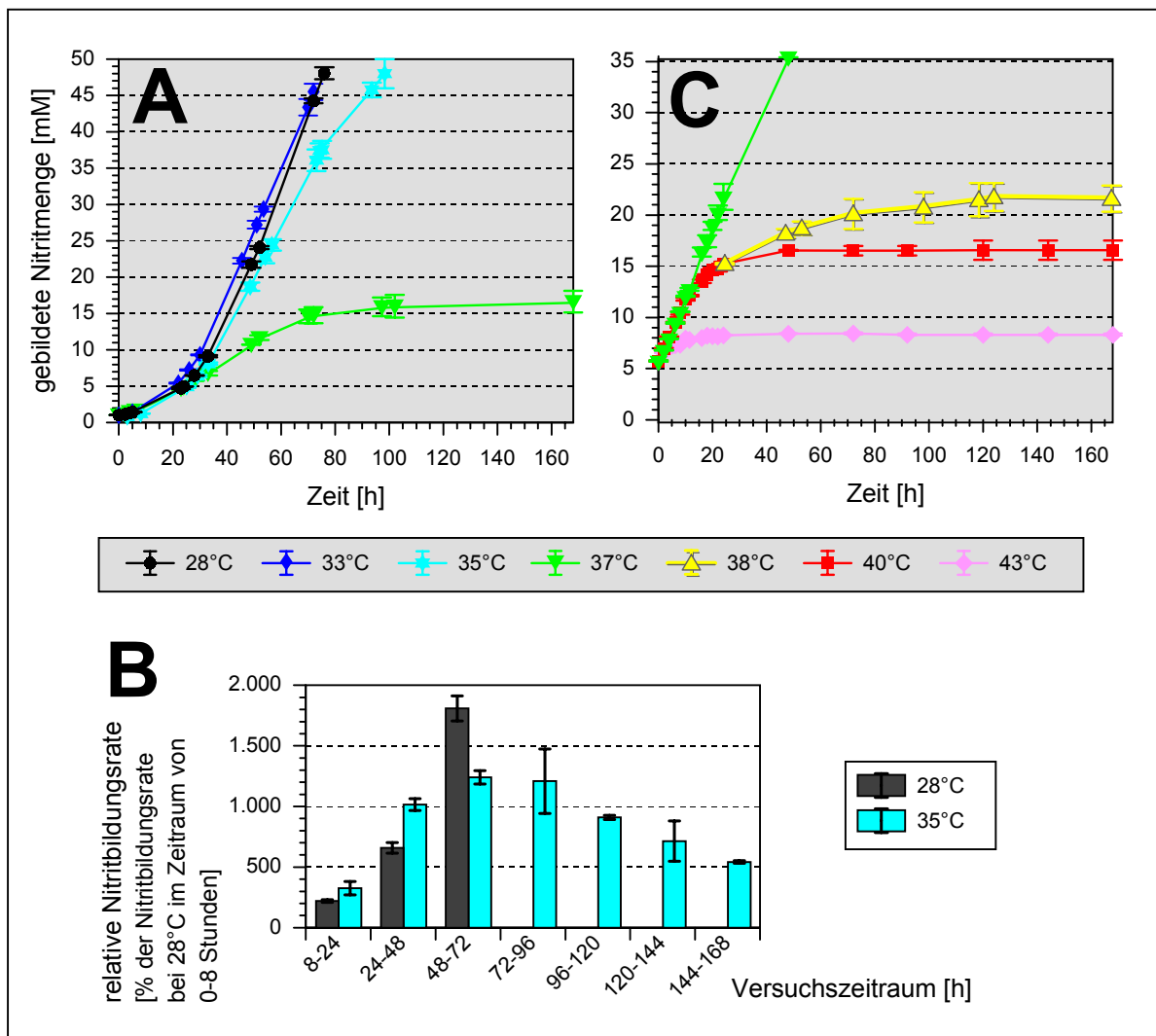


Abb. 19 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die gebildete Nitritmenge (A,C) und die Nitritbildungsrate (B) von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) in statischer Kultur, Ausgangszellzahl **A** = 1×10^6 Zellen/mL, **B** = 5×10^5 Zellen/mL, **C** = 1×10^7 Zellen/mL, relative Nitritbildungsrate normiert auf die im Zeitraum von 0-8 Stunden ermittelte Gesamtaktivität bei 28 °C.

4.4.2 Einfluss der Temperatur auf Proteingehalt und Gesamtzellzahl

Bei Temperaturen von 37-43 °C war eine vollständige Hemmung der Nitritbildung von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) beobachtet worden. Daher sollte durch einwöchige Inkubation in diesem Temperaturbereich verfolgt werden, ob durch diese Temperaturen das Wachstum und die Vermehrung der Zellen gleichermaßen beeinflusst wurden. Als Kontrolle wurden jeweils auch Zellen bei 28 °C inkubiert. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Abb. 20 dargestellt.

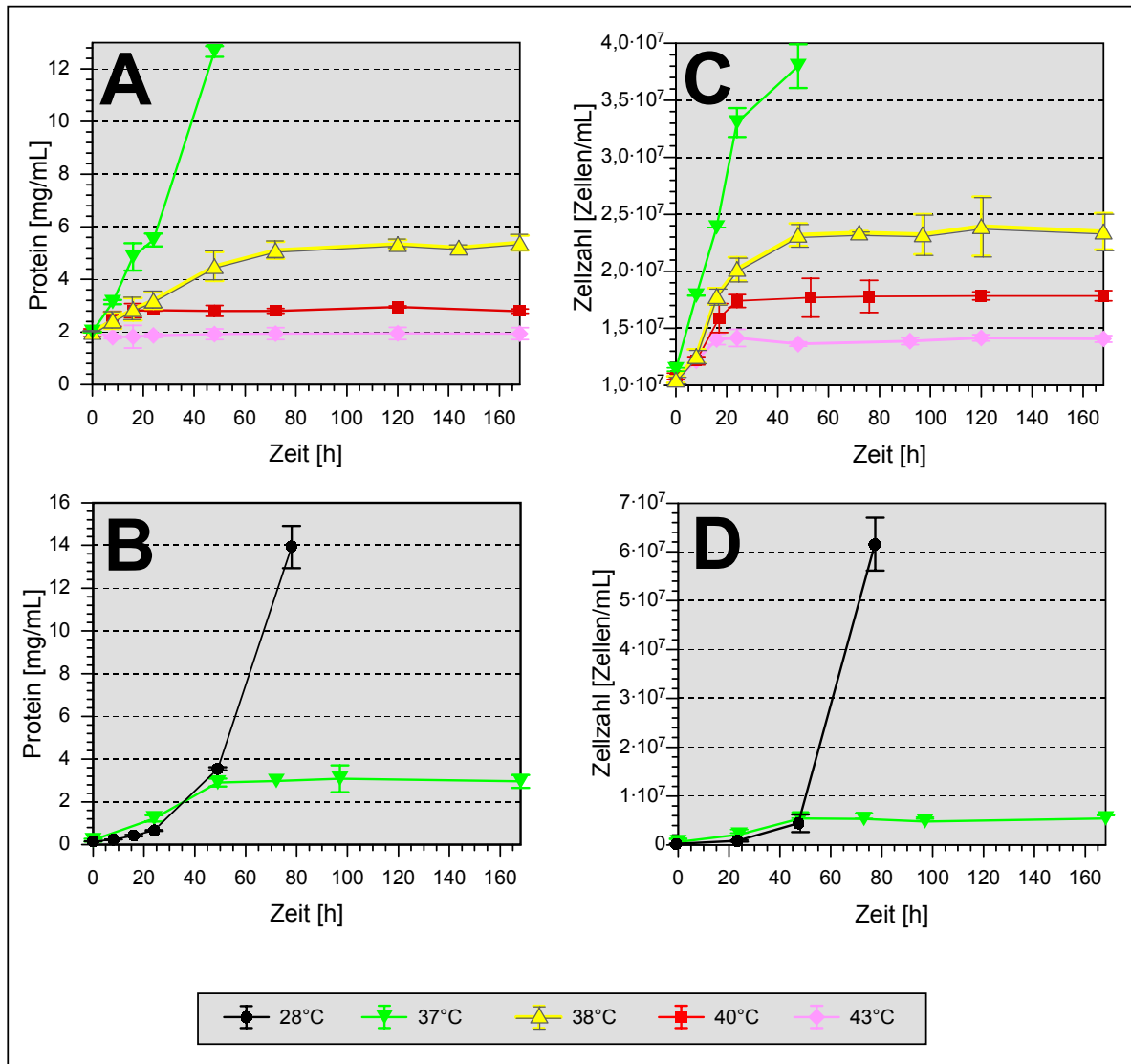


Abb. 20 Einfluss der Inkubationstemperatur auf den Proteingehalt (A,B) und die Gesamtzellzahl (C,D) von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) in statischer Kultur, Ausgangszellzahl A,C = 1×10^7 Zellen/mL, B,D = 1×10^6 Zellen/mL.

Bei 37 °C wurde zunächst eine starke Zunahme des Proteingehaltes gefunden, die bis zur Inkubationszeit von 48 Stunden kaum gehemmt war. Im weiteren Versuchsverlauf trat nach 48 Stunden eine vollständige Hemmung der Proteinsynthese auf (Abb. 20 B). Ein Abbau von Proteinen konnte nicht gemessen werden. Auch bei 38 °C stieg der Proteingehalt in den ersten 48 Inkubationsstunden an, wobei die Wachstumsrate gegenüber der Inkubation bei

37 °C deutlich verringert war. Erst nach 72 Stunden war bei dieser Temperatur keine Proteinbildung mehr nachweisbar, anschließend wurde auch bei 38 °C ein gleichbleibender Proteingehalt bestimmt (Abb. 20 A). Bei 40 °C erfolgte ebenfalls zunächst ein Anstieg des Proteingehaltes. Die Proteinbildung war bei dieser Temperatur aber bereits nach 16 Stunden vollständig gehemmt.

Bei 43 °C wurde dagegen keinerlei Zunahme der Proteinkonzentration in den Kulturen gemessen. Nach 24 Stunden war die Proteinkonzentration sogar geringfügig niedriger als zu Versuchsbeginn (Abb. 20B). Diese Abnahme der Proteinkonzentration war möglicherweise auf proteolytischen Abbau zurückzuführen.

Ein Vergleich des jeweiligen Verlaufes des Proteingehaltes mit dem des Nitritgehaltes zeigt, dass die Proteinbildung bei den untersuchten Temperaturen jeweils früher gehemmt war als die Nitritbildung. Somit gab es jeweils einen Versuchsabschnitt, in dem die Nitritbildung nicht zu einer messbaren Proteinbiosynthese führte.

Die Gesamtzellzahl nahm bei allen untersuchten Temperaturen zunächst zu. Bei 37 °C wurde in den ersten 48 Stunden ein starker Anstieg der Zellzahl bestimmt (Abb. 20C). Versuche mit einer geringeren Ausgangszellzahl zeigten, dass die Zellzahl bei 37 °C nach 48 Stunden konstant blieb (Abb. 20D). Der Verlauf der beiden Parameter Zellzahl und Proteinkonzentration war somit bei 37 °C übereinstimmend, was zeigt, dass Zellteilung und Proteinsynthese bei dieser Temperatur offensichtlich gekoppelt waren.

Bei 38 °C wurde über einen Zeitraum von 48 Stunden eine Zunahme der Zellzahl bestimmt (Abb. 20C). Die totale Hemmung der Vermehrung erfolgte somit bei 38 °C nach kürzerer Inkubationszeit als die totale Hemmung der Proteinbildung (vgl. Abb. 20A). Bei 40 °C war die Vermehrung bereits nach 24 Stunden gehemmt, bei 43 °C bereits nach 16 Versuchsstunden (Abb. 20C). Bei 40 °C und 43 °C war die Vermehrung damit also über einen längeren Zeitraum möglich als die Proteinbildung.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass Temperaturen von 37-43 °C für *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) zu den supermaximalen Temperaturen gezählt werden müssen. Proteinsynthese und Zellteilung waren bei allen untersuchten Temperaturen dieses Bereiches nach kürzerer Inkubationszeit unterdrückt als die Nitritbildung, was auf eine Entkopplung dieser Prozesse hinwies. Bei 38-43 °C waren auch Proteinbildung und Vermehrung voneinander entkoppelt.

4.4.3 Einfluss der Temperatur auf die MPN-Zellzahl

Die bisherigen Versuche mit Reinkulturen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) zeigten, dass Temperaturen von 37-43 °C zu einer vollständigen Hemmung des Stoffwechsels der Zellen führten. Auch im Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage war in den Sommermonaten bei einem zeitweiligen Anstieg der Betriebstemperatur auf 37-42 °C ein deutlicher Rückgang der MPN-Zellzahl der Ammoniakoxidanten beobachtet worden (vgl. 4.1.5), der vermutlich auf ein Absterben von Zellen zurückzuführen war.

Die Kinetik des Absterbens kann allgemein durch eine Funktion erster Ordnung beschrieben werden. Um einzelne Absterbephasen zu beschreiben und Begriffe zu definieren, wurde zunächst eine Absterbekurve von *N. eutropha* bei 40 °C ermittelt, die beispielhaft in Abb. 21 dargestellt ist. In dieser Abbildung wurde die MPN-Zellzahl logarithmisch gegen die Inkubationszeit aufgetragen. Die sogenannte exponentielle Absterbephase (in Abb. 21 orange hinterlegt) ist charakterisiert durch die exponentielle Abnahme der MPN-Zellzahl. Die Geschwindigkeit des Absterbens wird durch die Absterberate beschrieben, die der Steigung der Regressionsgerade (in Abb. 21 rot gezeichnet) entspricht. Aus der Regressionsgerade kann der vor allem in der Lebensmittelindustrie gebräuchliche D_{10} -Wert errechnet werden. Dieser gibt das Zeitintervall an, in dem die Lebendzellzahl einer Kultur um eine Zehnerpotenz reduziert wird.

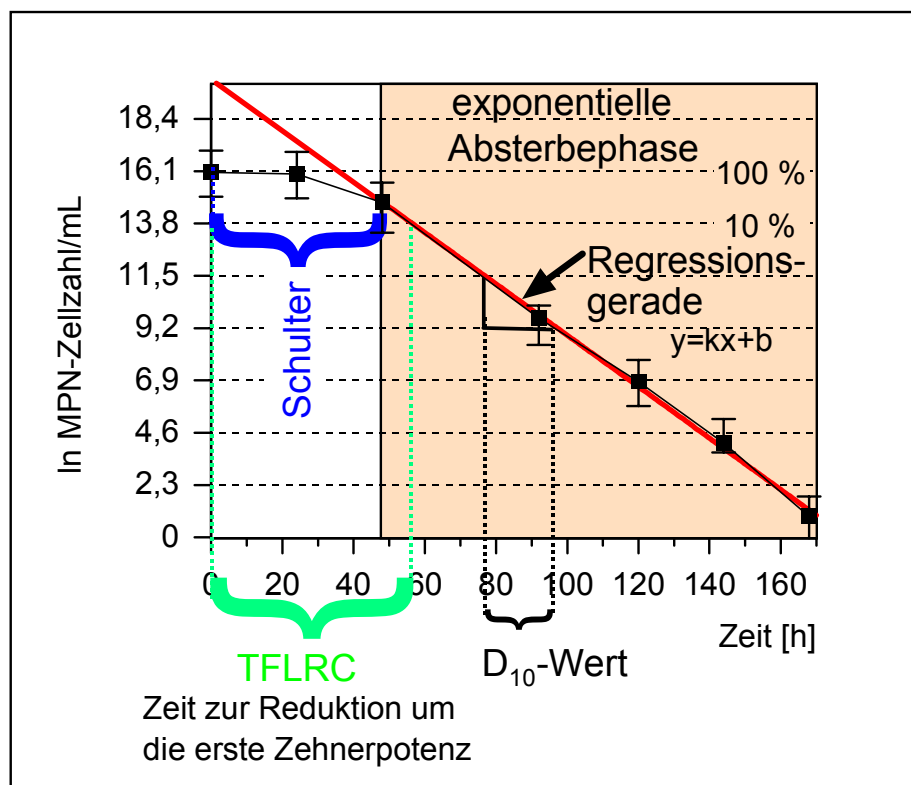


Abb. 21 Absterbekurve von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) bei 40 °C. Dargestellt sind Schulter, TFLRC- und D_{10} -Wert.

Bei Absterbekurven tritt häufig in der ersten Inkubationsphase eine sogenannte „Schulter“ auf (in Abb. 21 weiß hinterlegt). Als Schulter wird dabei der Zeitabschnitt vom Inku-

bationsbeginn bis zum Eintritt der Kultur in die exponentielle Absterbephase bezeichnet. Die Dauer der Schulter kann somit aus der Absterbekurve ermittelt werden. Im Schulterbereich bleibt die Zellzahl konstant oder nimmt mit deutlich geringerer Rate ab als in der Absterbephase. Eine Schulter wird in der Literatur daher meist auf zelluläre Reparatursysteme zurückgeführt (CODON et al., 1996; PAGAN et al., 1997; VAN UHDEN, 1984). Das Auftreten einer Schulter liefert somit einen starken Hinweis auf die Induktion von Reparatursystemen, zu denen auch Stressproteine zählen.

Bei Absterbekurven mit ausgeprägter Schulter ist die Zeit zur Reduktion der Zellzahl um die erste Zehnerpotenz deutlich länger als die Reduktion um weitere Zehnerpotenzen. Nach PAGAN et al. (1997) wird dieser Abschnitt durch den TFLCR-Wert (=Time for the first log cycle reduction) beschrieben, der ebenfalls in Abb. 21 markiert ist.

Nach Abtötung der meisten Zellen kann außerdem ein sogenanntes „Tailing“ mit einer deutlich verringerten Absterberate ausgeprägt sein (MOATS, 1971; VAN UHDEN, 1984), das aber bei der in Abb. 21 untersuchten Absterbekurve von *N. eutropha* nicht erkennbar war.

In den nachfolgend beschriebenen Experimenten wurde die Absterbekinetik von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) bei den supermaximalen Temperaturen von 37 °C, 38 °C, 40 °C und 43 °C vergleichend untersucht. Insbesondere wurde dabei geprüft, ob bei allen Temperaturen eine Schulter auftrat und bei welcher Inkubationstemperatur sie gegebenenfalls besonders ausgeprägt war. In Abb. 22 ist für die obigen Temperaturen jeweils eine repräsentative Absterbekurve dargestellt. Es ist ersichtlich, dass alle Absterbekurven durch eine Schulter und eine anschließende Absterbephase mit exponentieller Abnahme der Zellzahl charakterisiert waren. 37-43 °C waren somit letale Temperaturen für *N. eutropha*.

Bei einer Inkubationstemperatur von 37 °C stieg die MPN-Zellzahl in den ersten 24 Stunden nahezu auf den vierfachen Wert der Ausgangszellzahl an. Auch die Gesamtzellzahl war in 24 Stunden im selben Maße gestiegen (s. Abb. 20C). Daraus kann abgeleitet werden, dass in den ersten 24 Inkubationsstunden bei 37 °C keine Zellen abstarben. Von 24-48 Stunden war eine geringe Abnahme der MPN-Zellzahl zu beobachten. Nach 48 Stunden war dann die exponentielle Abnahme der Zellzahl erkennbar. Die Absterbekurve bei 37 °C war somit durch eine Schulter von 48 Stunden Dauer gekennzeichnet.

Bei 38 °C war die Schulter noch stärker ausgeprägt. In den ersten 48 Inkubationsstunden verdoppelte sich die MPN-Zellzahl. Dies war auch einhergehend mit einer Verdopplung der Gesamtzellzahl (s. Abb. 20C). Auch bei 38 °C kam es somit in den ersten Inkubationsstunden nicht zum Absterben von Zellen. Im Vergleich zur Inkubation bei 37 °C war die Vermehrungsrate der Zellen bei 38 °C geringer. Die Zellteilung konnte aber über einem längeren Zeitraum erfolgen. Im Zeitabschnitt von 48-72 Stunden war die MPN-Zellzahl nahezu konstant. Auch die Gesamtzellzahl nahm in diesem Zeitraum nicht mehr zu, wohingegen der Proteingehalt noch anstieg (vgl. Abb. 20C). Dies verhinderte möglicherweise ein Absterben der Zellen bei 38 °C. Erst nach 72 Stunden Inkubationszeit und damit nach vollständiger Hemmung der Proteinsynthese, nahm die MPN-Zellzahl ab. Bei 38 °C erfolgte die Proteinsynthese über einen längeren Zeitraum als die Zellvermehrung. Diese Ergebnis stellte somit eine wichtige Ausnahme dar. Die Schulter war mit etwa 120 Stunden mehr als doppelt so lang als bei 37 °C. Erst nach etwa 120 Stunden nahm die Zellzahl dann exponentiell ab.

Bei 40 °C wurde in den ersten 24 Stunden eine gleichbleibende Zellzahl gefunden. Anschließend traten die Kulturen in die Absterbephase ein. Auch bei 40 °C war somit eine Schulter ausgeprägt, die aber nur eine Dauer von 48 Stunden hatte. Nach 48 Stunden Inkubationszeit nahm die Zellzahl exponentiell ab.

Bei 43 °C war bis zu 24 Stunden Inkubation nur eine geringe Abnahme der Zellzahl zu erkennen, die auf eine Schulter hinwies. Anschließend nahm die MPN-Zellzahl exponentiell ab.

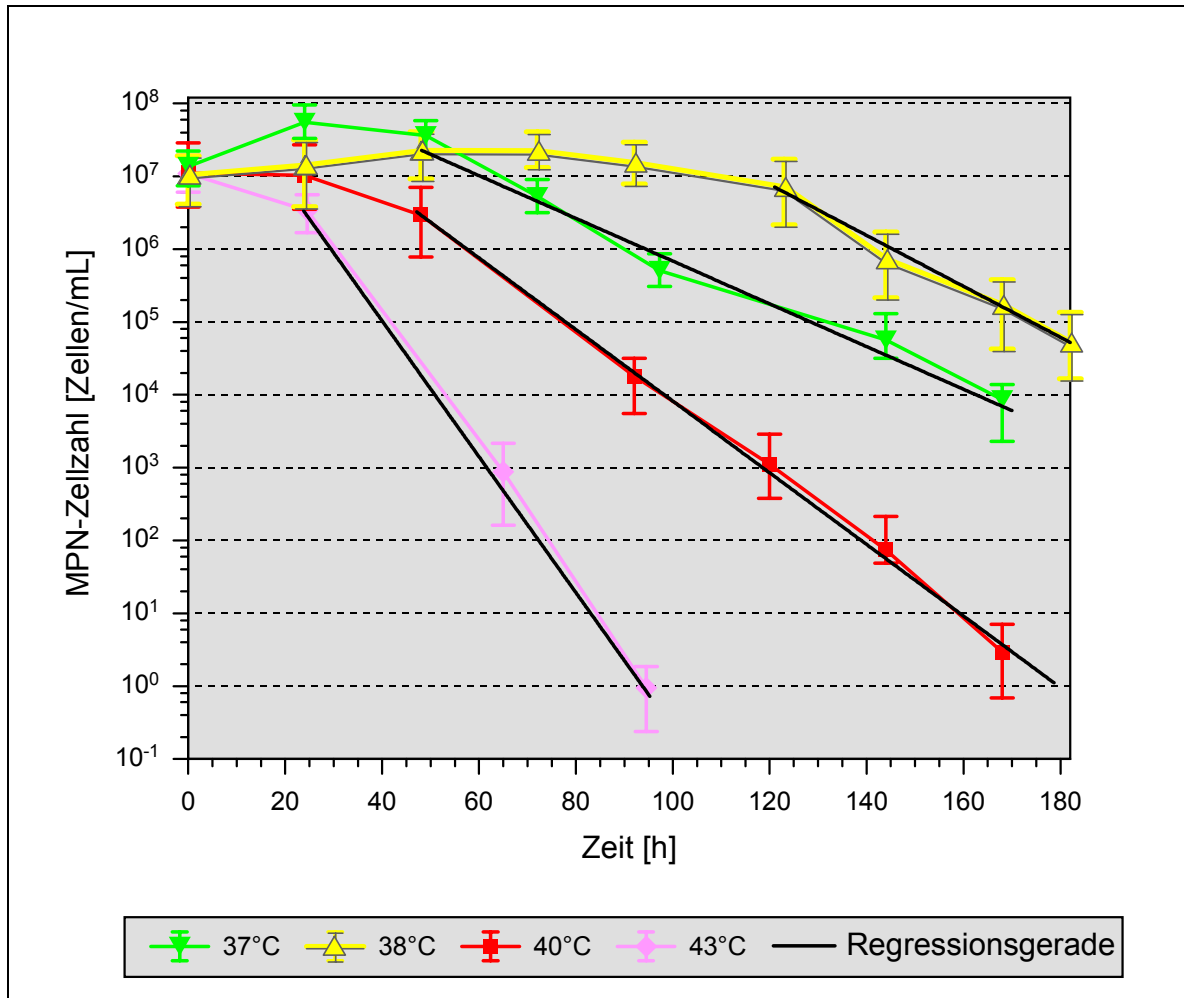


Abb. 22 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die MPN-Zellzahl von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) in statischer Kultur.

Aus den Absterbefunktionen wurde für jede Temperatur eine mittlere Absterberate errechnet, die in Tab. 9 aufgeführt ist. Es wird deutlich, dass die Absterberate von der Inkubationstemperatur abhängig war und mit zunehmender Temperatur von 37 °C bis 43 °C anstieg. Demzufolge nahm der D_{10} -Wert bei steigender Temperatur deutlich ab.

Tab. 9 Einfluss der Inkubationstemperatur auf die Absterberate, den D_{10} -Wert, die Dauer der Schulter und den TFLCR-Wert von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) in statischer Kultur

Temperatur	Absterberate [h ⁻¹]	D_{10} -Wert [h]	Dauer der Schulter [h]	TFLCR-Wert [h]
37 °C	-0,061 (± 0,008)	36 (± 5)	50 (± 8)	90 (± 7)
38 °C	-0,077 (± 0,017)	31 (± 6)	105 (± 17)	132 (± 24)
40 °C	-0,112 (± 0,016)	21 (± 3)	40 (± 12)	57 (± 11)
43 °C	-0,268 (± 0,045)	9 (± 2)	24 (± 6)	24 (± 4)

Aus Tab. 9 ist außerdem die mittlere Dauer der Schulter zu erkennen. Die Absterbekurve bei 37 °C wies eine Schulter von 50 ± 8 Stunden auf, bei 40 °C war die Schulter mit 40 ± 12 Stunden deutlich verkürzt. Bei 43 °C nahm sie weiter auf 24 ± 6 Stunden ab. Auch die Dauer der Schulter war somit von der Temperatur abhängig.

Eine wichtige Ausnahme stellte jedoch die Inkubationstemperatur von 38 °C dar. Bei dieser Temperatur wurde mit durchschnittlich 105 Stunden eine gegenüber 37 °C etwa doppelt so lange Schulter gefunden. Der TFLCR-Wert zeigte dieselbe Temperaturabhängigkeit wie die Dauer der Schulter und war daher auch bei 38 °C deutlich erhöht. Dieses Ergebnis lieferte einen Hinweis auf möglicherweise besonders effektive zelluläre Schutzmechanismen bei 38 °C. Da bei 38 °C nicht nur die längste Schulter gefunden wurde, sondern auch über den längsten Zeitraum Proteinsynthese festgestellt wurde, konnte weiter vermutet werden, dass Proteine für den Schutz der Zellen vor Abtötung bei dieser Temperatur eine entscheidende Rolle spielen.

4.5 Auswirkungen von Hitzestress auf *Nitrosomonas eutropha*

Temperaturen über dem Temperaturoptimum stellen für Organismen einen Stressfaktor dar. Die typische Reaktion von Zellen auf Stress ist die gesteigerte Synthese einer Reihe von Stressproteinen im Rahmen einer organismusspezifischen Stressantwort (LINDQUIST, 1986) zum Schutz essentieller Zellbestandteile gegen thermische Denaturierung (GLATZ et al., 1999). Da in den vorangegangenen Untersuchungen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) auch bei Temperaturen von 37-40 °C für mindestens 16 Stunden Nitritbildung, Wachstum und Vermehrung gefunden wurden, war die Bildung von Stressproteinen auch bei diesem Organismus zu vermuten. Ein weiterer Hinweis auf eine Stressantwort war, dass die Absterbekurven bei diesen Stresstemperaturen durch eine Schulter gekennzeichnet waren. Die Schulter zeigt, dass die Organismen bei ansonsten letalen Temperaturen für eine begrenzte Zeit überlebensfähig waren.

4.5.1 Nachweis einer Stressantwort

Zur Induktion einer Stressantwort in *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) wurden Kulturen für verschiedene Zeiten bei 38 °C inkubiert. Anschließend wurden die Proteine des Zytosols auf einen SDS-Gel nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt und die Proteinmuster verglichen.

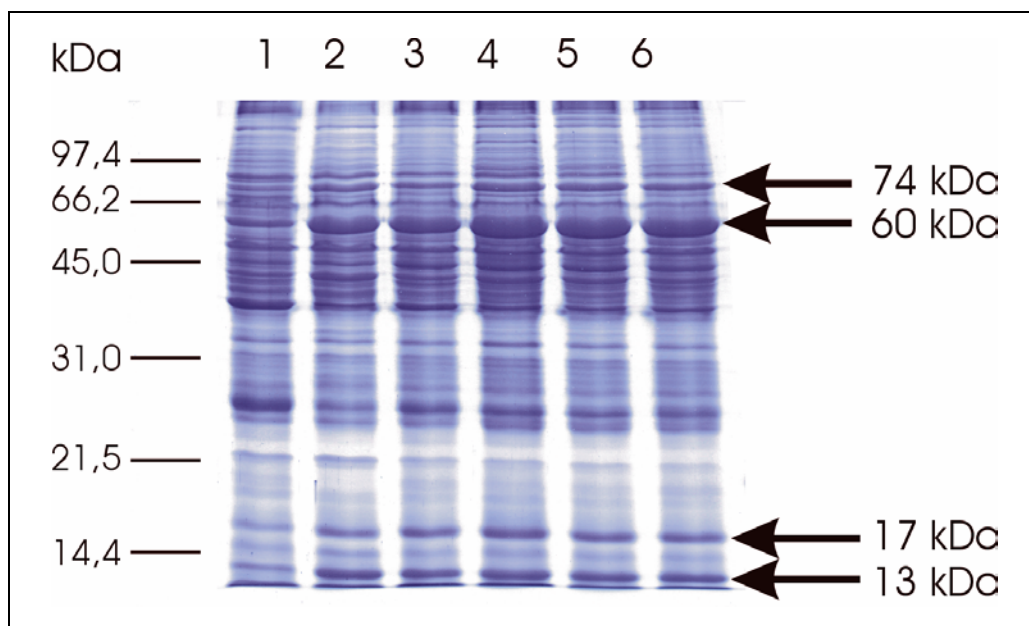


Abb. 23 SDS-PAGE von Proteinen der Zellysate von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14), Spur 1: Kontrolle, Inkubation bei 28 °C; Spuren 2-6: Inkubation bei 38 °C, Proteinisolierung nach verschiedenen Inkubationszeiten: Spur 2: 24 Stunden, Spur 3: 48 Stunden, Spur 4: 96 Stunden, Spur 5: 121 Stunden, Spur 6: 166 Stunden. Links ist das Molekulargewicht [kDa] angegeben, die Pfeile auf der rechten Seite markieren die vier auffälligsten in der Menge erhöhten Proteine.

Ein repräsentatives SDS-Gel ist in Abb. 23 dargestellt. Durch Inkubation bei 38 °C veränderte sich das Proteinmuster in Abhängigkeit von der Inkubationszeit. Die Konzentration von vier Proteinen war in den Zellen deutlich erhöht (in Abb. 23 mit Pfeilen markiert). Anhand der Migrationsstrecken von Standardproteinen bekannter Größe wurde das relative

Molekulargewicht dieser verstärkt gebildeten Proteine mit 13 kDa, 17 kDa, 60 kDa und 74 kDa berechnet. Nach 95 Stunden Inkubation bei 38 °C hatte das 60 kDa-Protein einen Anteil von 9,2 % an den Gesamtzellproteinen und machte etwa 13 % der insgesamt bei 38 °C synthetisierten Proteine aus. Die Zunahme der Bandenintensität nach Inkubation bei der Stresstemperatur von 38 °C war ein starkes Indiz dafür, dass es sich bei den vier in ihrer Expression deutlich gesteigerten Proteinen um Stressproteine handeln dürfte.

4.5.2 Identifikation von Stressproteinen

Nachfolgend wurde untersucht, ob diese unter Stressbedingungen gebildeten Proteine aufgrund entsprechender Homologien zu bekannten Stressproteinen anderer Organismen zweifelsfrei als Stressproteine identifiziert werden konnten.

Zunächst wurde das Molekulargewicht dieser Proteine mit dem Molekulargewicht hochkonservierter Stressproteine verglichen. Das hitzeinduzierbare Protein von 60 kDa hatte dieselbe Größe wie das HSP60-Chaperonin. Das Protein von 74 kDa lag hinsichtlich der Größe in der Nähe des hochkonservierten HSP70-Chaperons. Bei dem 13 kDa Protein könnte es sich um das zum Chaperoninsystem zählende HSP10 handeln.

Das System der Chaperonine besteht aus den beiden Proteinen HSP60 (bei *E. coli* als GroEL bezeichnet) und einem 10 kDa großen Stressprotein (bei *E. coli* GroES genannt), wobei die beiden Proteine eine funktionelle Einheit bilden (vgl. Abb. 2). Zum HSP70-Chaperonsystem gehört neben einem 70 kDa großen Protein (bei *E. coli* als DnaK bezeichnet) noch das 21 kDa große DnaJ-Protein. Zur Identifikation der Stressproteine wurden die Proteinbanden der Polyacrylamidgele auf Blotmembranen übertragen und mit folgenden spezifischen Antikörpern inkubiert: antiHSP 60, antiDnaK und antiGroES. Dadurch sollten Homologien zu konservierten Proteinen des Chaperonin- und des HSP70-Chaperonsystems nachgewiesen werden.

Abb. 24 belegt, dass bei *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) ein deutlich positives Signal mit dem HSP60-Antikörper vorhanden war. Dies zeigte, dass das 60kDa-Protein aus *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) eine hohe Homologie zum HSP60 aus *Synechococcus spec.* aufwies. Es konnte damit als HSP60-Chaperonin identifiziert werden. HSP60 aus *N. eutropha* hatte ein etwas geringeres Molekulargewicht als das humane HSP60-Protein, das als Positivkontrolle eingesetzt wurde.

Auch mit dem Antikörper gegen DnaK aus *E. coli* wurde im Immunoblot ein positives Signal mit einem etwa 74 kDa großen Protein von *N. eutropha* erhalten. Dieses Protein konnte damit als Teil des HSP70-Chaperonsystems identifiziert werden und wird nach anerkannter Konvention (WATSON, 1990) nachfolgend als HSP74 bezeichnet.

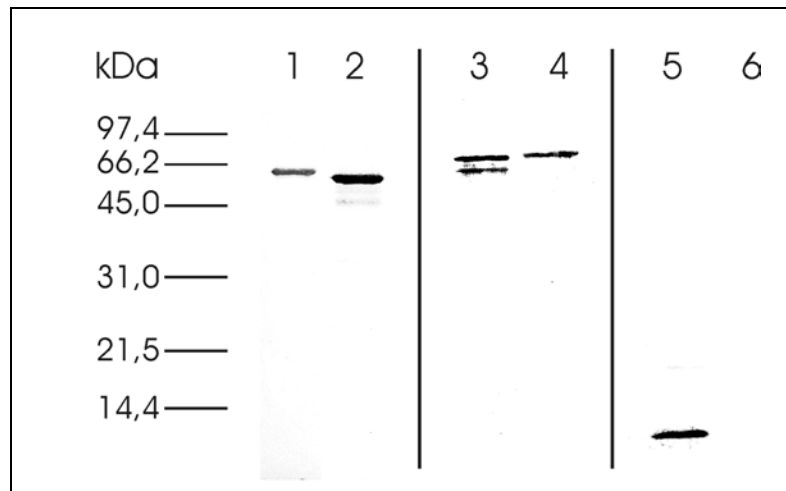


Abb. 24 Immunoblot von Zelllysaten von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) mit Antikörpern gegen verschiedene Stressproteine nach 24stündiger Inkubation bei 40 °C, Spur 1 und 2: Inkubation mit antiHSP 60 (*Synechococcus* sp.), Spur 1: Positivkontrolle, HSP 60-Protein (human), Spur 2: Nm 14, Spur 3+4: Inkubation mit antiDnaK (*E. coli*), Spur 3: Positivkontrolle, DnaK-Protein (*E. coli*), Spur 4: Nm14, Spur 5+6: Inkubation mit antiGroES (*E. coli*): Spur 5: Positivkontrolle, GroES-Protein (*E. coli*), Spur 6: Nm14. Links ist das Molekulargewicht [kDa] angegeben.

Ein gegen GroES aus *E. coli* gerichteter Antikörper zeigte lediglich mit dem als Positivkontrolle eingesetzten GroES-Protein ein positives Signal. Ein homologes Protein von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) konnte mit diesem Antikörper nicht nachgewiesen werden. Das hitzeinduzierbare Protein mit einem Molekulargewicht von 13 kDa konnte somit nicht dem GroES zugeordnet werden.

Zusammenfassend zeigte *Nitrosomonas eutropha* Nm 14 somit analog zu anderen Organismen eine typische Stressantwort als Reaktion auf Stresstemperaturen.

4.5.3 Einfluss der Temperatur auf die Konzentration der Stressproteine

Zur weiteren Charakterisierung der Stressantwort wurde der Einfluss der Temperatur auf die Konzentration der beiden Stressproteine HSP60 und HSP74 in den Zellen untersucht. Kulturen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) wurden für 24 Stunden bei Temperaturen von 28-43 °C inkubiert. Aus allen Ansätzen wurden die Proteine isoliert und auf SDS-Gelelektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden auf Blotmembranen transferiert, die mit antiHSP60 bzw. antiHSP74 inkubiert wurden.

Der in Abb. 25 dargestellte Immunoblot zeigt, dass HSP60 auch bei einer Temperatur von 28 °C in den Zellen vorhanden war. Bereits durch Inkubation bei 33 °C wurde die HSP60-Menge deutlich erhöht. Die größte Menge dieses Stressproteins wurde bei 38 °C gefunden. Auch bei 40 °C war die HSP60-Menge deutlich gegenüber der Kontrolle erhöht. Bei 43 °C wurde dieses Stressprotein kaum induziert.

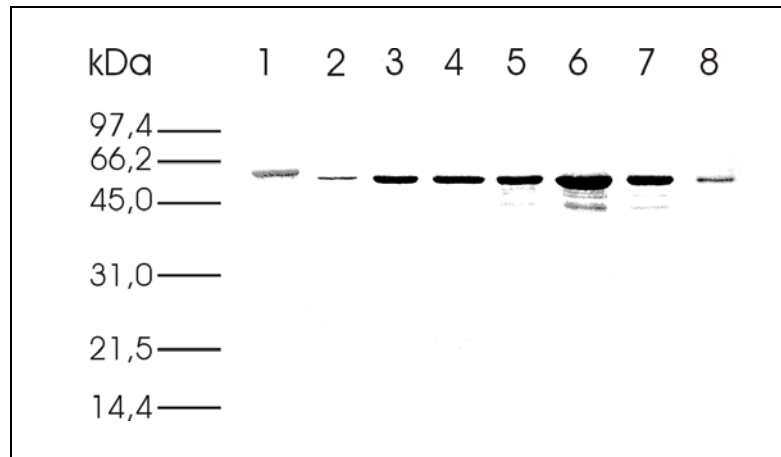


Abb. 25 Immunoblot von Zelllysaten von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) mit antiHSP 60 (*Synechococcus* sp.) nach 24stündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen. Spur 1: Positivkontrolle, HSP 60-Protein (human), Spur 2: 28 °C, Spur 3: 33 °C, Spur 4: 35 °C, Spur 5: 37 °C, Spur 6: 38 °C, Spur 7: 40 °C, Spur 8: 43 °C Stunden. Links ist das Molekulargewicht [kDa] angegeben.

Der Temperatureinfluss auf die Bildung von HSP74 war ähnlich ausgeprägt. Abb. 26 zeigt eine mit antiDnaK inkubierte Blotmembran. In der Positivkontrolle war neben der 70 kDa-Bande eine weitere Bande bei etwa 65 kDa zu erkennen. Dies könnte auf eine Verunreinigung des als Positivkontrolle verwendeten DnaK-Proteins zurückzuführen sein (WHITAKER UND BATT, 1991). Wie bei HSP60 wurde bei steigender Temperatur auch eine Erhöhung der HSP74-Menge detektiert, wobei die maximale Menge ebenfalls bei 38 °C gefunden wurde.

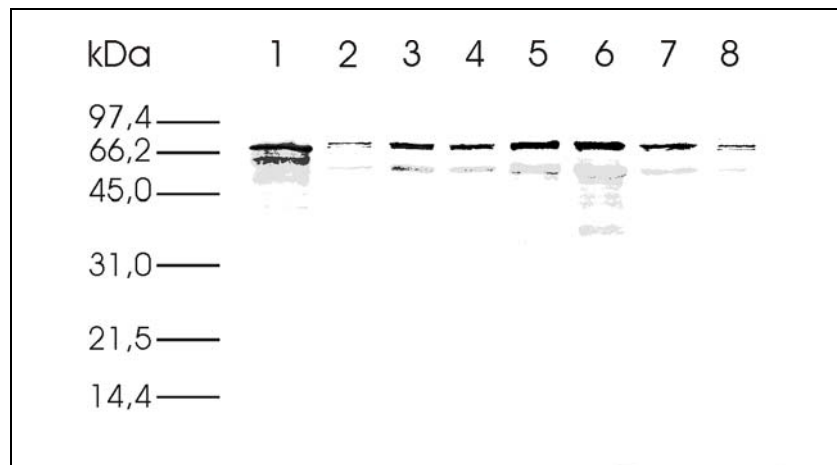


Abb. 26 Immunoblot von Zelllysaten von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) mit antiDnaK (*E. coli*) nach 24stündiger Inkubation bei verschiedenen Temperaturen. Spur 1: DnaK-Protein (aus *E. coli*) als Positivkontrolle, Spur 2: 28 °C, Spur 3: 33 °C, Spur 4: 35 °C, Spur 5: 37 °C, Spur 6: 38 °C, Spur 7: 40 °C, Spur 8: 43 °C Stunden. Links ist das Molekulargewicht [kDa] angegeben.

Temperaturen von 33-40 °C waren somit Stressfaktoren, die die Bildung der Stressproteine HSP60 und HSP74 bei *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) induzierten, wobei 38 °C die effektivste Temperatur darstellte. Dieser Zusammenhang sollte nachfolgend durch densitometri-

sche Analysen quantifiziert werden. In Abb. 27 sind die so ermittelten relativen Mengen der Stressproteine in Abhängigkeit von der Temperatur dargestellt.

Die Ergebnisse bestätigen den Einfluss der Temperatur auf die Bildung der Stressproteine HSP60 und HSP74 in den Zellen. Für die beiden Proteine wurde ein ähnlicher Verlauf gefunden. Mit steigender Temperatur stieg auch die Konzentration der Stressproteine an. Die maximale Konzentration wurde bei 38 °C gebildet. Bei 40 °C sank die Menge an Stressproteinen gegenüber der Inkubation bei 38 °C ab. Bei 43 °C war kein Unterschied der Konzentration der Stressproteine im Vergleich zur Kontrolle feststellbar. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, dass das Wachstum bei dieser Temperatur vollständig gehemmt war und somit auch keine Synthese von Stressproteinen mehr erfolgte.

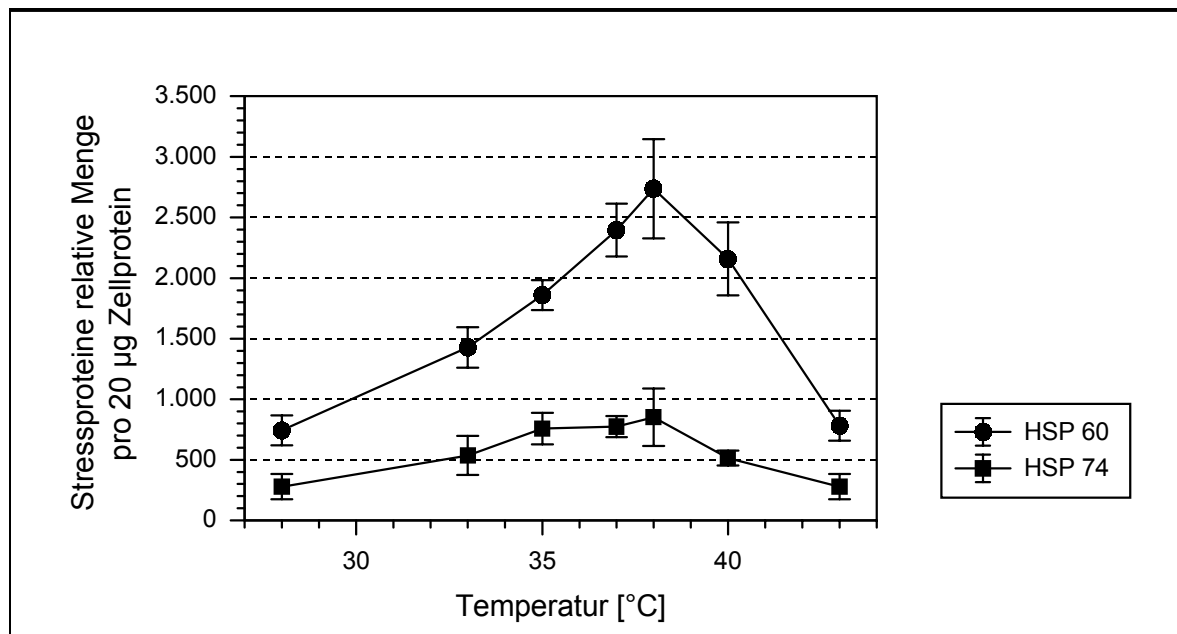


Abb. 27 Relative Menge der Stressproteine HSP60 und HSP74 von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) nach 24stündiger Inkubation der Zellen bei verschiedenen Temperaturen.

4.5.4 Induktionsverlauf von Stressproteinen

Der vorangegangene Versuch hatte gezeigt, dass nach 24stündiger Inkubation bei Temperaturen von 35 °C bis 40 °C eine starke Zunahme der Menge an Stressproteinen festzustellen war (Abb. 27). Daher wurden Untersuchungen bei der Stresstemperatur von 38 °C durchgeführt, um den Induktionsverlauf zu ermitteln. Nach Inkubationszeiten zwischen 30 min und 70 Stunden wurden die Proteine aus den Ansätzen isoliert und auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Proteinbanden auf eine Blotmembranen transferiert, die mit antiHSP60 inkubiert wurde.

Aus dem in Abb. 28 dargestellten Immunoblot kann abgeleitet werden, dass die HSP60-Konzentration in den Zellen von der Induktionszeit abhängig war. Im Immunoblot wurde nach 2 Stunden eine deutliche Zunahme der Bandenstärke gefunden, die nach 8 Stunden weiter erhöht war. Nach 16 und 24 Stunden war die Stärke der HSP60-Bande dann nahezu gleichbleibend. Die größte Menge an HSP60 war nach 44 Stunden in den Zellen vorhanden (Abb. 28).

gleichbleibend. Die größte Menge an HSP60 war nach 44 Stunden in den Zellen vorhanden (Abb. 28).

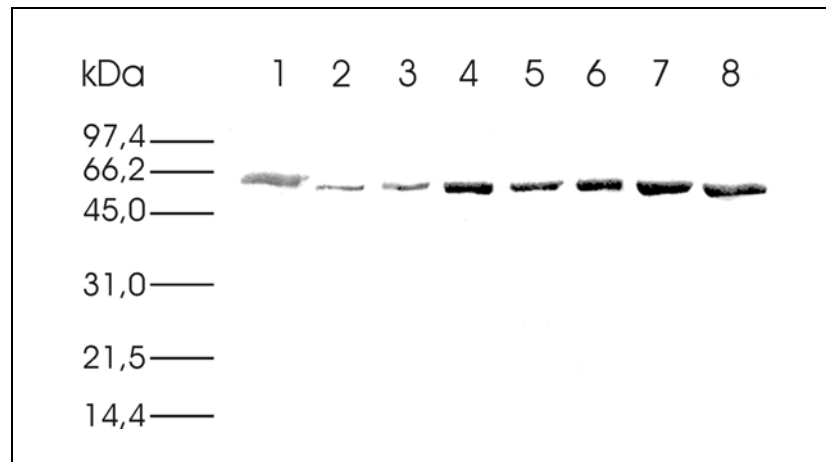


Abb. 28 Immunoblot von Zelllysaten von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) mit antiHSP 60 (*Synechococcus* sp.) nach Inkubation der Zellen bei 38 °C für verschiedene Inkubationszeiten, Spur 1: HSP 60–Protein (human) als Positivkontrolle, Spur 2: 0,5 Stunden, Spur 3: 2 Stunden, Spur 4: 8 Stunden, Spur 5: 16 Stunden, Spur 6: 24 Stunden, Spur 7: 44 Stunden, Spur 8: 70 Stunden. Links ist das Molekulargewicht [kDa] angegeben.

Zur weiteren Beschreibung des Induktionsverlaufes von Stressproteinen wurden Kulturen bei 38 °C und 40 °C inkubiert. Nach verschiedenen Inkubationszeiten wurden die Proteine aus den Ansätzen isoliert und auf einem SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die relativen Mengen von HSP60 und HSP74 im Gel densitometrisch bestimmt. In Abb. 29 sind die so ermittelten relativen Mengen der Stressproteine bei den beiden Temperaturen in Abhängigkeit von der Inkubationszeit dargestellt.

Die Ergebnisse bestätigen, dass die Konzentration der Stressproteine von der Induktionszeit abhängig war (Abb. 29). Bei 38 °C war bereits nach 30 min eine deutliche Erhöhung der HSP60-Menge nachweisbar. Anschließend wurde bis etwa 2 Stunden ein starker Anstieg der HSP60-Menge gefunden. Bis zu einer Inkubationszeit von 8 Stunden nahm die Menge des Stressproteins weiter zu, wobei der Anstieg der Konzentration zunehmend verlangsamt war (Abb. 29A). Anschließend stieg die Konzentration dieses Proteins in den Zellen kaum noch an. Auch die HSP74-Konzentration stieg in der ersten Inkubationsstunde deutlich an. Anschließend stieg die Menge an HSP74 bis zum Versuchsende von 24 Stunden an. Bei längerer Inkubation wurde ein Anstieg der Proteinkonzentration bis 72 Stunden bestimmt (nicht dargestellt).

Bei 40 °C wurde in der ersten Inkubationsstunde ein steiler Anstieg der HSP60-Menge gefunden. Anschließend verlangsamte sich der Anstieg. Nach 16 Stunden Inkubation wurde die maximale Menge erreicht. Im weiteren Versuchsverlauf blieb die HSP60-Konzentration konstant (Abb. 29B). Auch die Menge an HSP74 stieg bei 40 °C in der ersten Inkubationsstunde an. Anschließend erfolgte für eine Inkubationszeit von 8 Stunden ein weiterer Anstieg mit nahezu gleichbleibender Geschwindigkeit. Im anschließenden Versuchsverlauf wurde bis 24 Stunden ein gleichmäßiger Abfall der HSP74-Menge beobachtet.

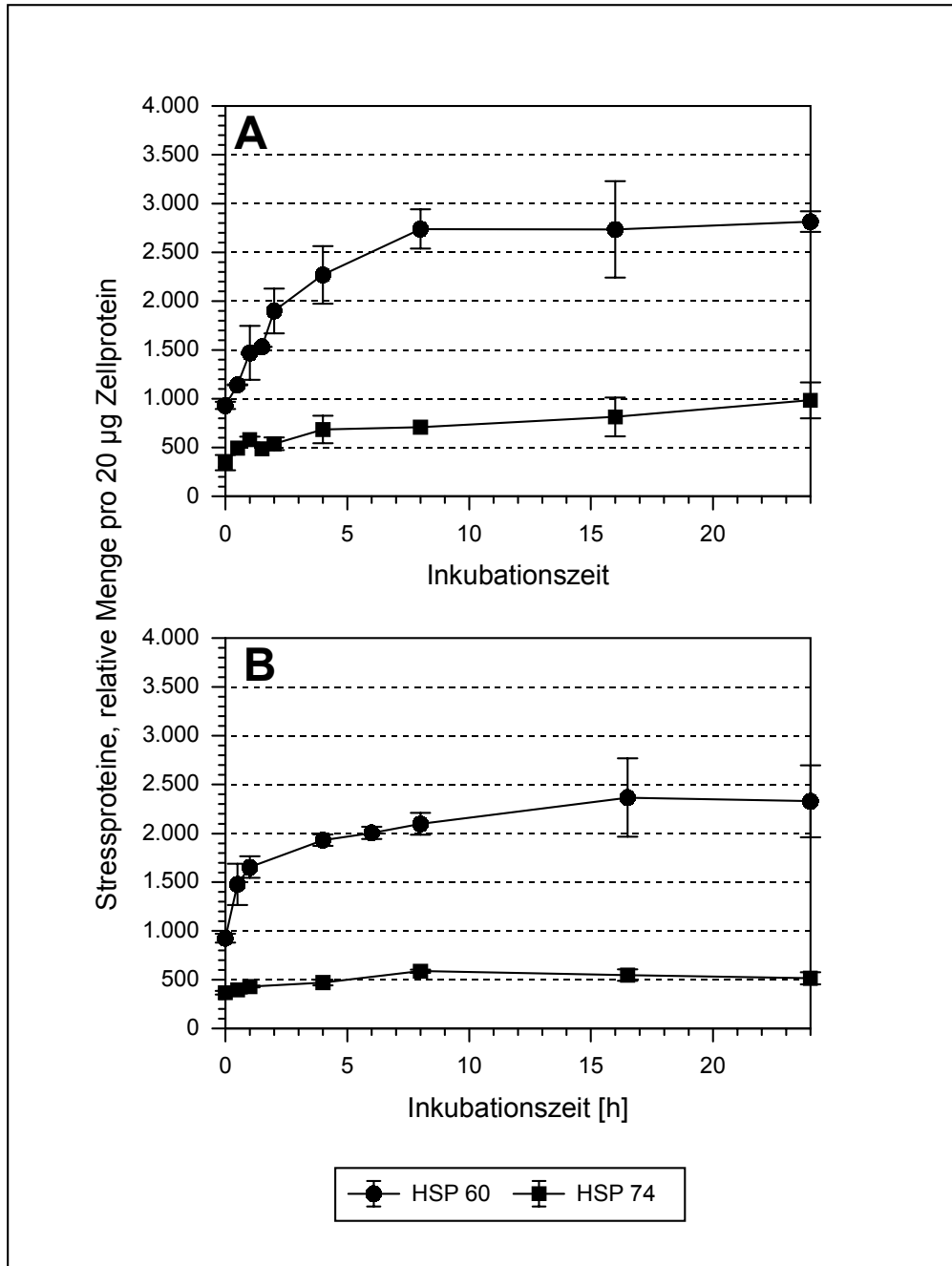


Abb. 29 Relative Menge der Stressproteine HSP60 und HSP74 von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) nach Inkubation der Zellen bei 38 °C und 40 °C in Abhängigkeit von der Zeitdauer der Temperatureinwirkung. A = Inkubation bei 38 °C, B = Inkubation bei 40 °C.

Ein Vergleich der Induktionsverläufe der Stressproteine bei 38 °C und 40 °C zeigt, dass nach 24 Stunden bei 38 °C eine höhere Konzentration der Stressproteine gebildet worden war als nach 24 Stunden bei 40 °C. Außerdem gab es einen deutlichen Unterschied im Induktionsverlauf. Während die Bildung von HSP60 bei 38 °C zunächst mit geringerer Geschwindigkeit verlief, erfolgte die Bildung dieses Stressproteins bei 40 °C sofort nach der Temperaturerhöhung mit hoher Rate. Diese bei der höheren Temperatur mit gesteigerter Geschwindigkeit erfolgende Induktion von HSP60 belegt, dass die Hitzeschockantwort eine Notfallreaktion für die Zellen darstellt.

4.5.5 Thermotoleranz

Stressproteine ermöglichen das temporäre Überdauern von Organismen bei letalen Temperaturen. Wenn nach einem moderaten Hitzeschock, der die Bildung von Stressproteinen induziert, die Absterberate bei letalen Temperaturen herabgesetzt ist, wird dieses Phänomen als Thermotoleranz bezeichnet. Im Folgenden sollte untersucht werden, ob auch bei *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) durch Hitzestress Thermotoleranz induzierbar war.

Die Versuchsparmeter wurden auf Grundlage der Ergebnisse von Kapitel 4.5.3 und 4.5.4 gewählt. Als Hitzeschocktemperatur zur Induktion der Stressproteine wurde 38 °C eingesetzt. Zur Induktion der Stressproteine wurden die Kulturen 2 Stunden bei 38 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze sowie Vergleichskulturen ohne vorherigen Hitzeschock jeweils bei 43 °C inkubiert. Im Abstand von 24 Stunden wurde in allen Ansätzen die Zahl der vermehrungsfähigen Zellen mit Hilfe der MPN-Methode bestimmt. Damit sollte geprüft werden, ob durch die Induktion der Hitzeschockproteine die Absterberate vermindert und somit Thermotoleranz nachweisbar war.

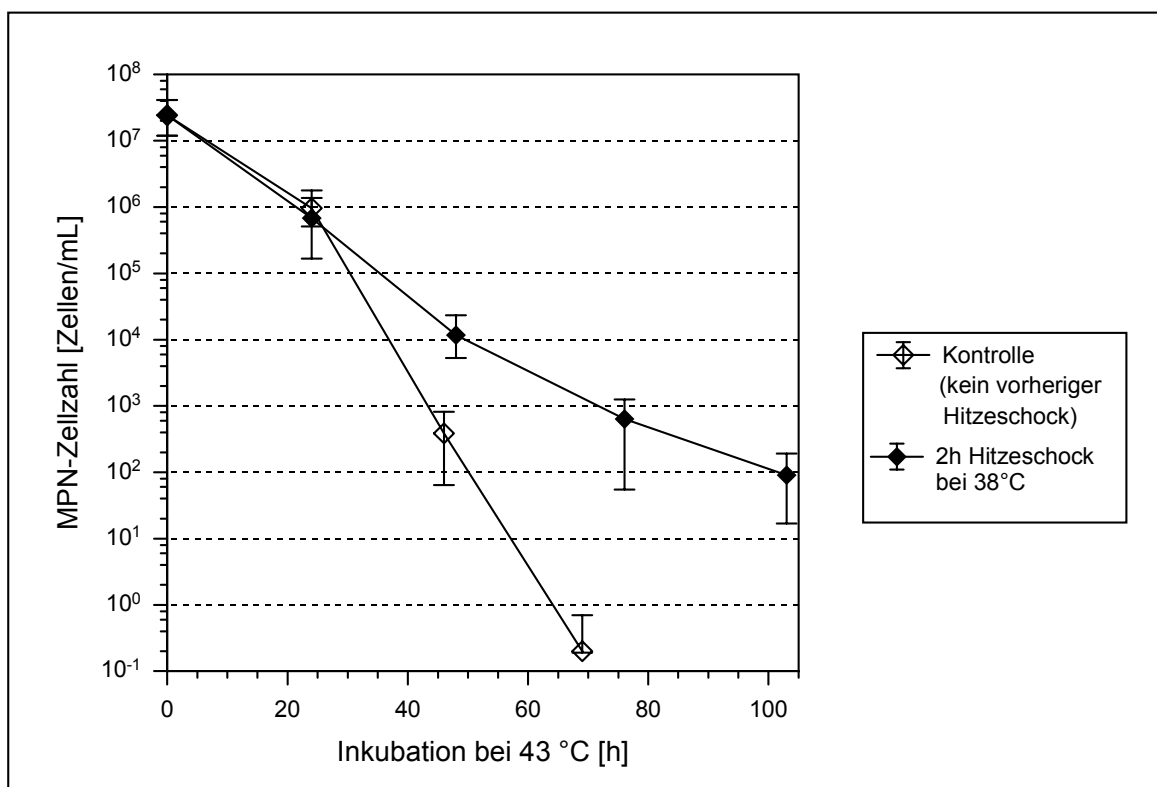


Abb. 30 Einfluss eines Hitzeschocks (2 Stunden, 38°C) auf die Absterbekinetik von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) bei der letalen Temperatur von 43 °C.

Abb. 30 zeigt, dass nach 24 Stunden Inkubation bei 43 °C die Überlebenszellzahl von unbehandelten Kulturen übereinstimmend mit der von hitzegeschockten Ansätzen war. Im weiteren Versuchsverlauf wurden jedoch signifikante Unterschiede der Absterbekurven deutlich. Die Kultur ohne vorherige Induktion von Stressproteinen trat nach 24 Stunden in die exponentielle Absterbephase ein. Die Absterberate betrug $-0,308 \text{ h}^{-1}$. Nach 72 Stunden wurde in

diesen Ansätzen weniger als eine vermehrungsfähige Zelle/mL gefunden. Die Absterberate von Kulturen nach Induktion von Hitzeschockproteinen war dagegen mit $-0,118 \text{ h}^{-1}$ deutlich verringert. Nach 72 Stunden waren noch etwa 700 vermehrungsfähige Zellen/mL vorhanden. *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) konnte nach diesen Ergebnissen durch einen Hitzeschock bei 38°C Thermotoleranz erwerben.

4.5.6 Funktion von Stressproteinen

Anschließend sollten Hinweise auf mögliche Funktionen der Stressproteine ermittelt werden. Stressproteine des HSP70-Chaperonsystems und der Chaperonine sind essentiell für die Renaturierung von Proteinen und stellen daher ein wichtiges zelluläres Reparatursystem dar (LINDQUIST, 1992). Deshalb wurde der Frage nachgegangen, inwieweit sich die Menge an Stressproteinen pro Zelle auf die Überlebenszellzahl auswirkt.

Zur Induktion von Stressproteinen wurden Kulturen analog zu 4.5.5 bei der Stresstemperatur von 38°C inkubiert. Die Dauer der Hitzeschockphase wurde zwischen 0,5 Stunden und 16 Stunden variiert, da nach dem Induktionsverlauf in diesem Zeitraum große Unterschiede in der Stressproteinmenge pro Zelle vorhanden waren (vgl. Absatz 4.5.4). Anschließend wurden die Kulturen 48 Stunden bei 43°C inkubiert und ihre MPN-Zellzahl ermittelt. Vergleichend wurden auch Kulturen ohne vorherige Induktion von Stressproteinen eingesetzt. Die Überlebenszellzahl in Abhängigkeit von der Dauer der vorausgegangenen Hitzebehandlung ist in Abb. 31 dargestellt.

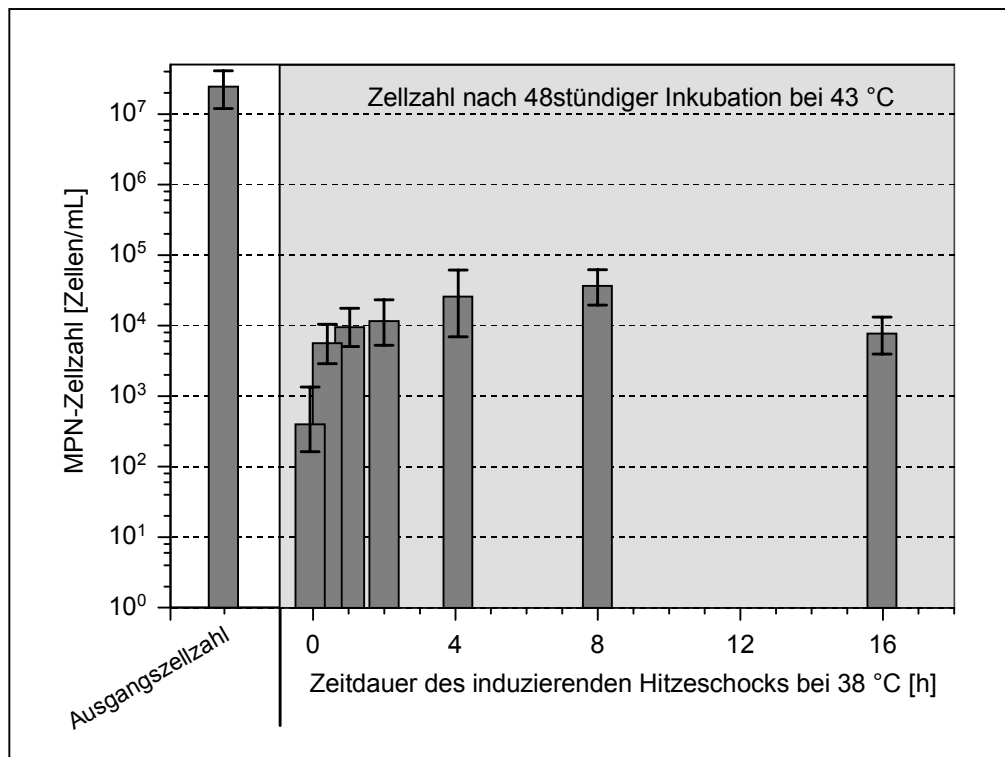


Abb. 31 MPN-Zellzahl nach 48stündiger Inkubation bei 43°C in Abhängigkeit von der Dauer eines vorherigen Hitzeschocks bei 38°C .

Die Ergebnisse zeigen, dass alle Inkubationszeiten zur Ausprägung von Thermotoleranz führten. In der Kontrolle ohne vorherigen Hitzeschock waren nach 48stündiger Inkubation bei 43 °C nur noch 401 Zellen/mL vermehrungsfähig. Bereits nach einer Hitzeinduktion von 30 Minuten betrug die Konzentration der überlebenden Zellen 5600 Zellen/mL und war damit etwa 14fach erhöht (Abb. 31). Die Verlängerung der Induktionszeit von 0,5 bis auf 8 Stunden führte zu einer weiteren Erhöhung der Überlebenszellzahl. Durch einen 8stündigen Hitzeschock konnte die größte Thermotoleranz erzielt werden. Die Zahl vermehrungsfähiger Zellen war gegenüber der Kontrolle fast 100fach erhöht. Auch ein 16stündiger Hitzeschock bei 38 °C induzierte Thermotoleranz. Allerdings war die Zahl vermehrungsfähiger Zellen mit 7800 Zellen/mL erheblich niedriger als nach 8stündiger Induktion.

Aus der Literatur ist bekannt, dass Stressproteine bei der Ausprägung von Thermotoleranz eine wichtige Rolle spielen (WATSON, 1990). Daher wurde überprüft, inwieweit bei *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) zwischen dem Gehalt an Stressproteinen der Zellen (Abb. 29A) und der Ausprägung von Thermotoleranz ein Zusammenhang bestand. In den ersten 8 Versuchsstunden wurde eine starke Bildung dieser Proteine und ein paralleler Anstieg der Thermotoleranz der Zellen nachgewiesen. Nach 16stündiger Induktion war die Stressproteinmenge gegenüber 8stündiger Induktion unverändert (vgl. Abb. 29), während die Thermotoleranz deutlich abnahm. Dies zeigt, dass das Vorhandensein von Stressproteinen allein für die Ausprägung von Thermotoleranz nicht ausreichend war, sondern weitere Faktoren erforderlich waren.

Die Absterbekurven von *N. eutropha* hatten gezeigt, dass dieser Organismus letale Temperaturen für eine gewisse Zeit ohne Rückgang der MPN-Zellzahl überdauern konnte. Dieser Abschnitt der Absterbekurven ist als Schulter definiert (wie in Abb. 21 ausführlich dargestellt). Die Dauer der Schulter war von der Inkubationstemperatur abhängig. Da auch die Menge von induzierten Stressproteinen von der Temperatur abhängig war, wurde geprüft, inwieweit ein Zusammenhang zwischen der Dauer der Schulter und der Menge an Stressproteinen bestand. Berechnungen ergaben, dass die Länge der Schulter mit der HSP60-Menge korrelierte. Die besonders ausgeprägte Schulter bei der Inkubation von 38 °C war somit also auch auf eine starke Induktion von HSP60 zurückzuführen. Eine erhöhte Konzentration von HSP60 in den Zellen ermöglichte offensichtlich eine längere Überlebensdauer bei letalen Temperaturen.

4.6 Einfluss der Temperatur auf die Ammoniakmonooxygenase

Bei konstanter Temperatur von 37 °C wurden bei *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) Proteinbildung, Vermehrung und Nitritbildung in Abhängigkeit von der Inkubationszeit zunehmend unterdrückt bis diese Stoffwechselvorgänge vollständig gehemmt waren. Anschließend verringerte sich die Überlebenszellzahl der Kulturen mit exponentieller Absterberate. Dies stellte ein unerwartetes Ergebnis dar, da viele mesophile Organismen ein Temperaturmaximum von mehr als 40 °C haben. Die Hitzeschädigung eines an der Nitritbildung beteiligten Enzyms könnte die Ursache für die beobachtete Hemmung des Stoffwechsels von *N. eutropha* bei 37 °C sein. Das erste Enzym der Ammoniakoxidation ist die Ammoniakmonooxygenase (AMO), die die Oxidation von Ammoniak zu Hydroxylamin

katalysiert. Daher sollte untersucht werden, ob dieses Enzym möglicherweise besonders thermosensitiv war.

Deshalb wurden Zellen von *Nitrosomonas eutropha* bei Stresstemperaturen von 38 °C und 40 °C inkubiert. Nach unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde der AMO-Gehalt der Zellen untersucht. Zur Ermittlung des Ausgangswertes wurden Zellen direkt aus der bei 28 °C erfolgten Massenzucht untersucht. Der Nachweis der beiden Untereinheiten der AMO erfolgte mit spezifischen Antikörpern im Immunoblot. Anschließend wurden die Proteine densitometrisch quantifiziert.

In Abb. 32A+B ist der Nachweis der beiden Untereinheiten der AMO von *Nitrosomonas eutropha*-Zellen nach Inkubation bei 38 °C dargestellt. Die Antikörper gegen die AmoA zeigten ein positives Signal mit dem 27 kDa-Protein der AmoA (Abb. 32A), die AmoB-Antikörper reagierten spezifisch mit dem 41 kDa AmoB-Protein von *N. eutropha* (Abb. 32B).

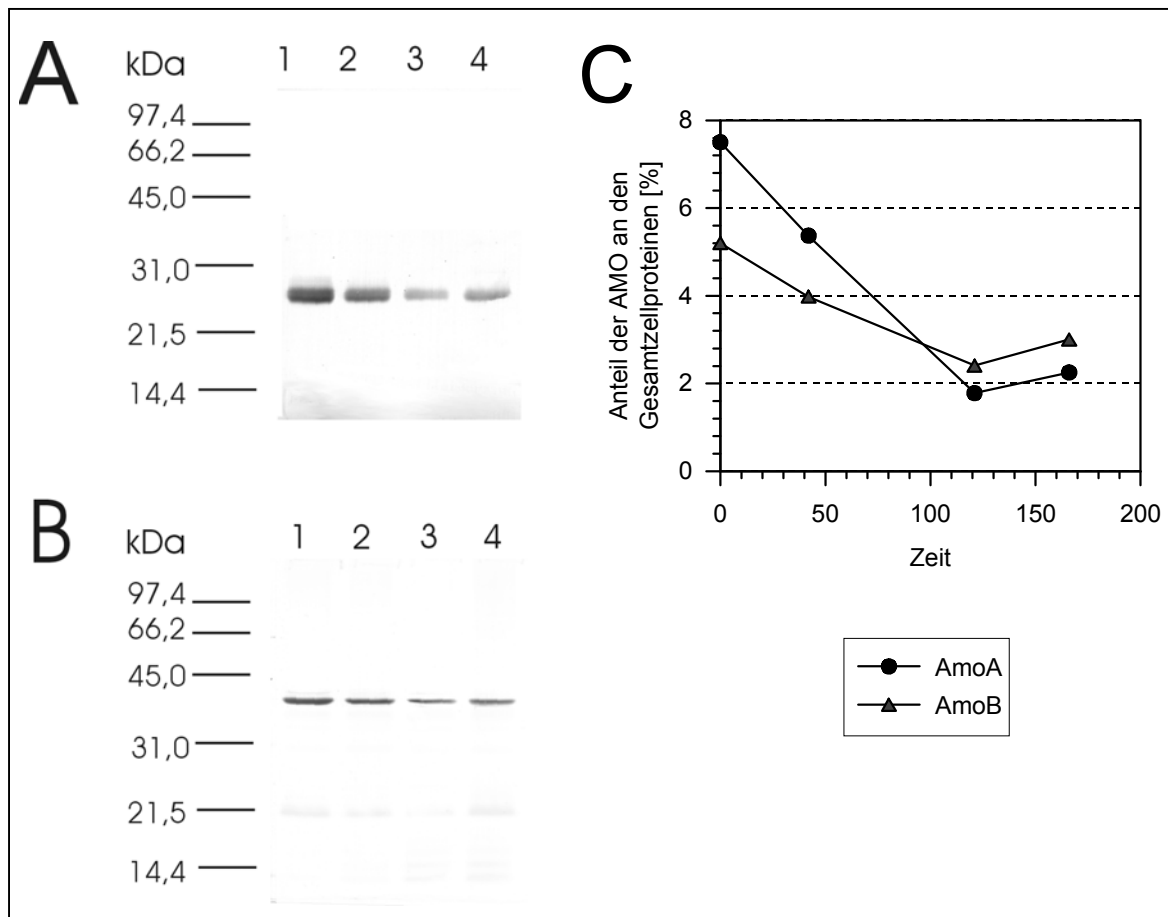


Abb. 32 Einfluss der Temperatur von 38 °C auf den AMO-Gehalt von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) **A:** Immunoblot von Zelllysaten mit antiAmoA, **B:** Immunoblot von Zelllysaten mit antiAmoB Spur 1: Kontrolle bei 28 °C inkubiert, Spuren 2-4 Inkubation bei 38 °C, Spur 2 = 42 Stunden, Spur 3 = 121 Stunden; Spur 4 = 166 Stunden, Links ist das Molekulargewicht [kDa] angegeben **C:** Relative Menge an AMO angegeben als prozentualer Anteil der Gesamtzellproteine.

Zum Beginn der Inkubation betrug der Anteil dieser beiden Proteine an den Gesamtzellproteinen für 7,5 % AmoA bzw. 5,2 % für AmoB. Danach sank der Anteil von AmoA und AmoB am Zellprotein stark ab. Nach 166 Stunden machte das AmoA-Protein noch etwa 2 % und das AmoB-Protein noch etwa 3 % des Gesamtzellproteins aus. (Abb. 32C).

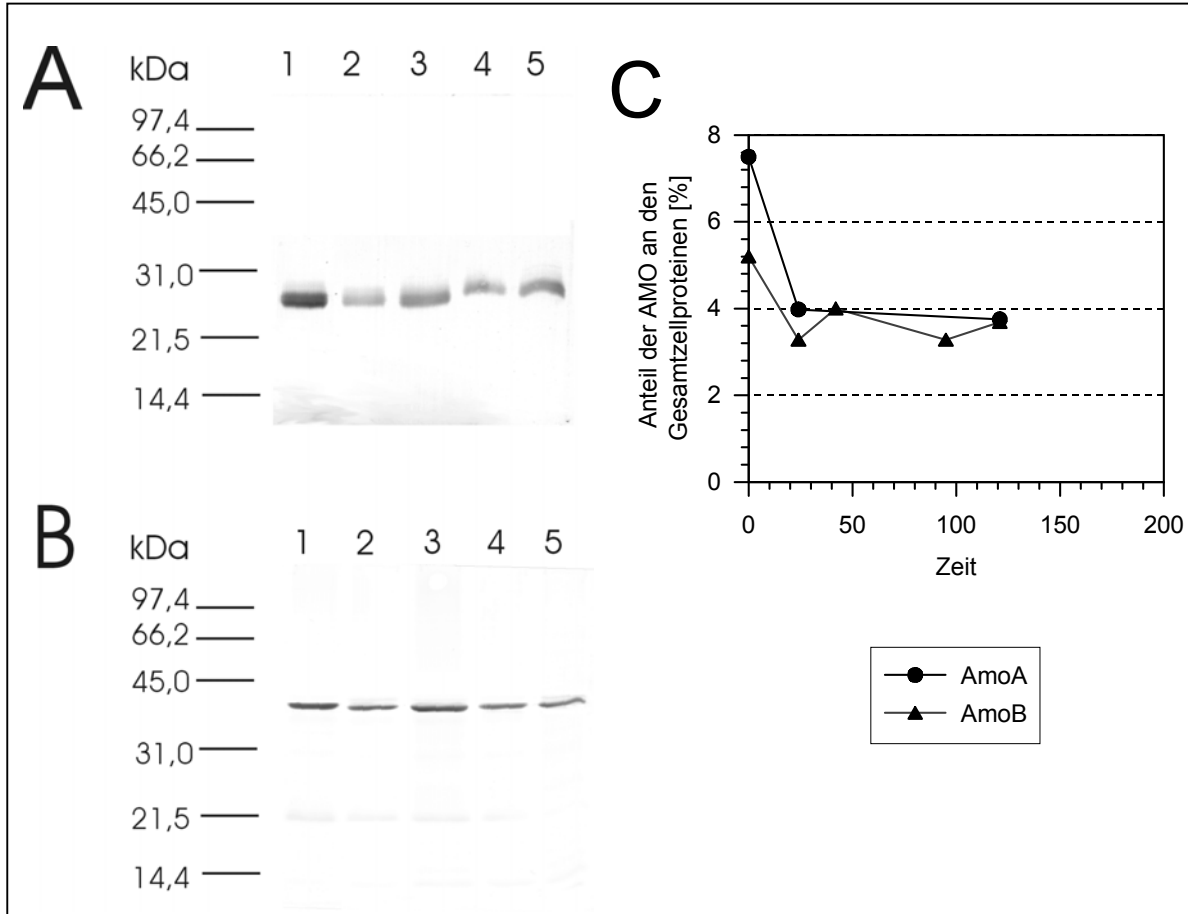


Abb. 33 Einfluss der Temperatur von 40 °C auf den AMO-Gehalt von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) **A**: Immunoblot von Zelllysaten mit antiAmoA, **B**: Immunoblot von Zelllysaten mit antiAmoB Spur 1: Kontrolle bei 28 °C inkubiert, Spuren 2-5 Inkubation bei 40 °C, Spur 2 = 24 Stunden, Spur 3 = 42 Stunden; Spur 4 = 95 Stunden; Spur 5 = 121 Stunden, Links ist das Molekulargewicht [kDa] angegeben **C**: Relative Menge an AMO angegeben als prozentualer Anteil der Gesamtzellproteine.

Auch bei 40 °C wurde eine Abnahme der Anteile von AmoA und AmoB an den Gesamtzellproteinen gefunden (Abb. 33A,B). Bereits nach 24 Stunden war der jeweilige Anteil der beiden AMO-Untereinheiten etwa um die Hälfte zurückgegangen. Im weiteren Versuchsverlauf blieb der Anteil der AMO-Protein in dieser Größenordnung. AmoA und AmoB machten somit 3-4 % des Gesamtzellproteins aus (Abb. 33C).

Diese Ergebnisse zeigten, dass bei den Stresstemperaturen von 38 °C und 40 °C die Konzentrationen beider Untereinheiten der AMO in den Zellen abnahmen, wobei der AmoA-Gehalt stärker herabgesetzt war als der an AmoB. Dies könnte die Folge einer thermischen Denaturierung des Enzyms und damit eine Ursache für die Hemmung der Nitritbildung sein.

5 Diskussion

5.1 Nitrifikation in der Pilotanlage

5.1.1 Stickstoffelimination aus Abwasser mit hohen Ammoniumkonzentrationen

Die Verschärfung der Grenzwerte für Stickstoffverbindungen im Ablauf von Abwasserreinigungsanlagen durch die Europäische Union machte für viele europäische Kläranlagen zusätzliche Maßnahmen zur Stickstoffelimination erforderlich. Effektive Stickstoffelimination aus Abwasserteilströmen mit hoher Ammoniumkonzentration bietet die Möglichkeit bei geringem Raum- und Investitionsbedarf die Stickstoffgrenzwerte im Kläranlagenablauf einzuhalten (VAN KEMPEN et al., 2001). Dabei werden vor allem biologische Verfahren erprobt, da sie kostengünstig betrieben werden können und keine toxischen Endprodukte aufweisen (ROSTRON et al., 2001). Chemische Verfahren, wie das Ammonium-Stripping (ELIASSON, 1994) und die Fällung als Magnesium-Ammonium-Sulfat (WASSBERG und RECKSEN, 1992) sind dagegen in der Praxis von geringerer Bedeutung.

Die Verfahren zur biologischen Stickstoffelimination basieren zumeist auf einer Folge von aerober Nitrifikation mit anschließender anaerober Denitrifikationsstufe, wobei die lithoautotrophe Nitrifikation den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt. Nitrifikanten wachsen auch unter optimalen Bedingungen nur mit einer Wachstumsrate von $0,02\text{--}0,092\text{ h}^{-1}$ (entsprechend einer Generationszeit von 11-50 Stunden, SHARMA und AHLERT, 1977). Daher müssen alle technischen Verfahren zur Stickstoffelimination gewährleisten, dass immer eine ausreichend hohe Zahl nitrifizierender Bakterien im System vorhanden ist.

Für die Nitrifikation von Abwasser mit hohen Ammoniumkonzentrationen wurden verschiedene technische Verfahren entwickelt:

Mit den sogenannten „Sequencing Batch Reaktoren“ kann eine vollständige Stickstoffelimination erreicht werden. In den Reaktoren wachsen nitrifizierende und denitrifizierende Bakterien in Flocken. Zur Kopplung von Nitrifikation und Denitrifikation werden entweder alternierend aerobe und anaerobe Bedingungen in einem Reaktor eingestellt (MOSSAKOWSKA et al., 1997) oder je ein anoxischer und oxischer Reaktor hintereinandergeschaltet (NOWAK et al., 1996; STÜVEN und BOCK, 2001). Bei hoher Durchflussrate des Abwassers muss eine Verringerung der Nitrifikantenzellzahl durch eine Biomasserückhaltung verhindert werden.

Das sogenannte SHARON®-Verfahren (Single reactor system for High Activity ammonia Removal Over Nitrite) ist ein kontinuierliches Nitrifikationsverfahren. Es besteht aus einem durchmischten aeroben Belebtschlammreaktor, der bei einer Temperatur von etwa 35 °C betrieben wird (HELLINGA et al., 1998). Die hohe Wachstumsrate der Ammoniakoxidanten ermöglicht dabei einen Betrieb ohne Biomasserückhaltung (HELLINGA et al., 1998; VAN KEMPEN et al., 2001). Da bei der Reaktortemperatur das Wachstum von Ammoniakoxidan-

ten stärker gefördert wird als das von Nitritoxidanten (HUNIK, 1993), werden letztere bei hohem Abwasserdurchfluss aus dem System ausverdünnung (HELLINGA et al., 1998; JETTEN et al., 1997). Das Produkt des SHARON-Verfahrens ist somit Nitrit. Dies stellt einen Vorteil dar, da für die Denitrifikation von Nitrit weniger Elektronen benötigt werden als für die von Nitrat. In der Startphase des SHARON-Verfahrens wird eine Anreicherung schnellwachsender Ammoniakoxidanten aus nitrifizierendem Belebtschlamm durch eine Betriebstemperatur oberhalb von 25 °C bei einer hohen Durchflussrate erzielt (VAN DONGEN et al., 2001). Dies Verfahren wird nach 2jährigem Laborbetrieb bereits erfolgreich großtechnisch eingesetzt (MULDER et al., 2001).

In Biofilmreaktoren sind Nitrifikanten auf bzw. in Trägermaterial immobilisiert, was eine hohe Durchflussrate des Abwassers bei hoher Biomassekonzentration pro Kubikmeter Reaktorvolumen ermöglicht. Die Organismen wachsen entweder auf der Oberfläche von Trägermaterial oder werden in eine polymere Matrix eingebettet. Trägermaterial aus Polyvinylalkohol (MYOGA et al., 1991), Polyurethanschäumen (MORPER, 1994), geschäumter Cellulose (MATSUMURA et al., 1997) oder Polypropylenröhrchen (KLOEP et al., 2000) wurde bereits erfolgreich eingesetzt. Zur Einbettung von Bakterien wurden u.a. κ -Carrageenan (WIJFFELS und TAMPER, 1989) oder Polyvinylalkohol (ASANO et al., 1992; ROSTRON et al., 2001) verwendet.

Das sogenannte Anammox®-Verfahren ist ein Belebtschlammverfahren unter anaeroben Bedingungen und basiert auf einer Nitritreduktion, bei der Ammonium als Elektronendonator fungiert: $\text{NO}_2^- + \text{NH}_4^+ \rightarrow \text{N}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ (JETTEN et al., 1998). Diese Reaktion wird von autotrophen Organismen der Gattung *Planctomycealis* katalysiert (STROUS et al., 1999). Eine Kombination von SHARON- und Anammox-Verfahren ermöglicht daher eine vollständige Stickstoffelimination ohne externe Zugabe von Elektronendonatoren. In Pilotversuchen mit Abwasser aus der Faulschlammmentwässerung konnten diese Prozesse im Klärwerk Rotterdam-Dockhaven betriebsstabil miteinander gekoppelt werden. Ein großtechnischer Einsatz dieser Technologie scheint somit möglich (VAN DONGEN et al., 2001).

Der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage war ein Biofilmreaktor mit Polystyrol als Trägermaterial zur Biofilmbildung. Da Polystyrol einen geringeres spezifischen Gewicht als Wasser aufweist, wurde der Reaktor als Abstromfließbettreaktor betrieben. Der Sauerstoffeintrag erfolgte im unteren Reaktorbereich. Die gegenläufigen Richtungen vom abwärts gerichteten Abwasserstrom und aufsteigenden Gasblasen ermöglichten eine sehr effektive Sauerstoffausnutzung im Reaktor. Dies Belüftungsverfahren ist als Hypox®-Verfahren patentiert (BRÄUTIGAM et al., 1997).

Die Nitrifikationsleistung der Pilotanlage lag mit 9-16 kg $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{m}^3$ Trägermaterial x Tag in der Größenordnung anderer Biofilmreaktoren (12 kg $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{m}^3$ Trägermaterial x Tag, MATSUMURA et al., 1997). Das untersuchte Verfahren konnte somit im technischen Maßstab die Nitrifikation aus Teilströmen mit hohen Ammoniumkonzentrationen gewährleisten. In Belebtschlammreaktoren wurden dagegen mit 0,6-1,0 kg $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{m}^3$ Reaktorvolumen x Tag deutlich geringere Nitrifikationsleistungen erzielt (MOSSAKOWSKA et al., 1997; BOCK und STÜVEN, 2001). Das hohe Nitrifikationspotential von Biofilmmaterial der Pilotanlage, das bis zu 45 kg $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{m}^3$ Trägermaterial x Tag betrug, lässt zudem die Möglichkeit einer weiteren Leistungserhöhung des Verfahrens erwarten. Die Nitrifikation verlief nur bis

zur Stufe des Nitrits. Dies stellte einen weiteren Vorteil des Verfahrens dar, da bei der Reduktion von Nitrit in der Denitrifikation weniger Elektronendonator benötigt wird, als bei der von Nitrat.

5.1.2 Einfluss der Temperatur auf die Nitrifikation der Pilotanlage

Auf dem Klärwerk Köhlbrandhöft/Dradenau hatte das aus der Faulschlammentwässerung anfallende Abwasser aufgrund der verwendeten Entwässerungstechnik der Dampfzentrifugation eine Temperatur von etwa 55 °C. Eine wichtige Innovation des untersuchten Verfahrens bestand in dem Ziel, die hohe Temperatur des Abwassers unmittelbar für eine Maximierung der biochemischen Umsatzleistung zu nutzen. In der Literatur wurde wiederholt über einen Anstieg der Wachstumsrate nitrifizierender Bakterien bei steigender Temperatur berichtet (QUINLAN 1980; SHARMA und AHLERT, 1977). Allerdings wurden diese Untersuchungen nur in einem Temperaturbereich bis maximal 30 °C durchgeführt.

Für den Nitrifikationsablauf im Temperaturbereich oberhalb von 30 °C liegen dagegen in der Literatur bisher nur wenige Ergebnisse vor, da diese Temperaturen weder für die meisten natürlichen Standorte noch für die großtechnische Abwassereinigung relevant sind. NEUFELD et al. (1986) postulierten eine Abnahme der Nitrifikationsaktivität im Temperaturbereich von 30 °C bis 45 °C, führten aber keine Untersuchungen bei Temperaturen oberhalb von 40 °C durch. Von verschiedenen Autoren wurde bei Temperaturen von 31 °C bis 35 °C eine zunehmende Hemmung der Aktivität Ammoniak oxidierender Bakterien festgestellt (HOOPER und TERRY, 1973; VÖLSCH et al., 1991; FDZ-POLANCO, 1994). ROLS et al. (1994) bestimmten in Anreicherungskulturen von *Nitrosomonas* spec. ein Temperaturoptimum von 25 °C. Die Aktivität dieser Ansätze war bereits bei 30 °C bzw. 35 °C deutlich herabgesetzt. Vereinzelt wurden auch höhere Temperaturen als Temperaturoptimum genannt. HELLINGA et al. (1998) ermittelten die maximale Aktivität von nitrifizierendem Belebtschlamm bei 40 °C. Dieses Material wurde anschließend bei 35 °C in einem Reaktorverfahren eingesetzt. Als Grund für den Betrieb unterhalb des Optimums führten die Autoren an, dass die Nitrifikationsleistung bei 35 °C stabiler war.

Auch der von mir untersuchte Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage sollte bei etwa 35 °C betrieben werden. Die Temperatur wurde dabei durch den Zentratzulauf eingestellt. Der Betrieb zeigte, dass aufgrund fehlender Isolierung des Reaktors ein bedeutender Einfluss der Außentemperatur bestand. Im Verlauf eines Jahres wurden im Reaktor Temperaturen zwischen 27 °C und 42 °C gemessen. In den Wintermonaten betrug die Temperatur im Mittel 30-35 °C, während sie bei hochsommerlichen Außentemperaturen auf 37-42 °C stieg. Es war das Ziel, bei diesen Betriebstemperaturen eine stabile Nitrifikationsleistung sicherzustellen.

Um die Betriebsstabilität bei erhöhten Betriebstemperaturen abschätzen zu können, war eine detaillierte Kenntnis über den Einfluss von Temperaturen oberhalb von 30 °C auf die Aktivität und die Zellzahl von Ammoniakoxidanten im Nitrifikationsreaktor erforderlich. Untersuchungen des nitrifizierenden Biofilms der Pilotanlage ergaben, dass bei einem Anstieg der Betriebstemperatur von 30-35 °C (im Winter) auf 37-42 °C (in den Sommermonaten) ein Rückgang der MPN-Zellzahl Ammoniak oxidierender Bakterien um 2-4 Zehnerpotenzen auftrat. Die Zahl der Ammoniakoxidanten im Biofilm wurde durch hohe Temperaturen stark

herabgesetzt. Parallel dazu sank auch das Nitrifikationspotential des Biofilms, wurde aber mit einem Rückgang von etwa 75 % weit weniger reduziert als die MPN-Zellzahl.

Parallel durchgeführte Laborversuche ergaben, dass die Nitritbildung von Biofilmmaterial bei 37 °C und 40 °C nach 4 bzw. 2 Tagen vollständig gehemmt war, während die Nitrifikationsleistung in der Pilotanlage auch bei Betriebstemperaturen von 37-42 °C nicht herabgesetzt war.

Ein Vergleich der Laborergebnisse mit den Betriebsergebnissen der Pilotanlage zeigte somit eine höhere Temperaturresistenz der Ammoniakoxidanten im Pilotanlagensystem gegenüber den Kolbenansätzen. Nachfolgend sollen mögliche Gründe diskutiert werden, die im Nitrifikationsreaktor die Thermotoleranz der Ammoniakoxidanten verursacht haben könnten.

Die Laborversuche wurden bei Sauerstoffsättigung durchgeführt. In Abhängigkeit von der Temperatur waren 5-8 mg/L O₂ in der Kulturflüssigkeit gelöst. Zudem wurden in den Laboransätzen durch die Schüttelbewegung große Teile des Biofilms vom Trägermaterial abgelöst und die Zellaggregate in der Nährlösung suspendiert. Im Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage waren dagegen über weite Betriebsabschnitte nur etwa 2-5 mg/L O₂ vorhanden. Daher war die Sauerstoffversorgung der Ammoniakoxidanten in den Laborversuchen deutlich besser als im Pilotreaktor. Im Pilotreaktor dürften aufgrund von Diffusionslimitierung durch die Biofilmmatrix die Ammoniakoxidanten des Biofilms nicht ausreichend mit Sauerstoff versorgt worden sein. SCHRAMM et al. (1996 und 1998) zeigten durch Messungen mit Mikroelektroden, dass die Sauerstoffkonzentration im Profil eines nitrifizierenden Biofilms mit zunehmender Biofilmtiefe stark abnahm. Bei Sauerstoffsättigung des Kulturmediums (8,4 mg/L O₂) betrug die Eindringtiefe des Sauerstoffs in den Biofilm nur etwa 100 µm. Nitrifikationsaktivität wurde nur in den oberen 50 µm des Biofilms gefunden. Bei Reduktion der Sauerstoffkonzentration im Medium auf 3,6 mg/L O₂ wurde Sauerstoff nur noch bis zu einer Biofilmtiefe von 25-75 µm nachgewiesen, was die Nitrifikationsaktivität auf die oberen 20-50 µm des Biofilms begrenzte (SCHRAMM et al., 1996). DE BEER et al. (1993) wiesen Sauerstoff dagegen bis 300 µm Biofilmtiefe nach. Nitrifikationsaktivität fanden sie bis etwa 100 µm. Unterhalb von 100 µm war die Sauerstoffkonzentration so gering, dass keine Nitrifikation möglich war.

Im Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage war für das Erreichen der maximalen Nitrifikationsleistung ein dünner Biofilm von 10-40 µm Stärke ausreichend. Vermutlich wurde auch bei stärkerem Biofilm die Oxidationsleistung vor allem in den oberen 50 µm erbracht. Bei der im Reaktor erreichten Biofilmstärke von 200-300 µm waren die Ammoniakoxidanten in den unteren Biofilmbereichen nicht aktiv, sondern durch anoxische Bedingungen gehemmt.

Für die Abtötung hitzegeschädigter Zellen stellen intrazellulär auftretende Sauerstoffradikale einen wichtigen Faktor dar (KNABEL et al., 1990; ALDSWORTH et al., 1998). Bei *Salmonella enteritidis*, einem fakultativ anaeroben Organismus, war die Zahl überlebender Zellen nach Temperaturstress bei anaerober Inkubation gegenüber aerober Inkubation signifikant erhöht (XAVIER und INGHAM, 1997). Außerdem wurde bei *E. coli*-Stämmen mit geringer Aktivität an Superoxidismutase eine sehr viel höhere Temperatursensitivität beobachtet als beim Wildstamm (MCCORD et al., 1973).

Durch Versuche mit Biofilmmaterial aus dem Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage konnten erste Hinweise erhalten werden, dass die Sauerstoffkonzentration auch beim thermisch bedingten Aktivitätsverlust von Ammoniakoxidanten im Biofilm eine wichtige Rolle spielen könnte. Orientierende Versuche ergaben, dass die Stoffwechselaktivität einer Biofilmpopulation von Ammoniakoxidanten nach 24stündiger anaerober Inkubation bei der Letaltemperatur von 40 °C gegenüber einer parallel bei 28 °C aerob inkubierten Kontrolle kaum vermindert wurde. Die Inkubation bei 40 °C unter aeroben Bedingungen führte dagegen zu einem 50%igen Rückgang der Aktivität (HARMS und RÜTHER, 1997). Daher könnten die Ammoniakoxidanten im Biofilm Letaltemperaturen sehr viel länger überdauert haben als in der Suspension der Laboransätze.

In dieselbe Richtung könnten Untersuchungen weisen, dass immobilisierte Biomasse auch gegenüber hohen Temperaturen geschützt ist (WIJFFELS et al.; 1995; ASANO et al., 1992; ITOH et al., 1989; SZEWZYK et al., 2000). ABDELGADIR und ALEXANDER (1997) fanden eine deutlich höhere Hitzeresistenz von *Rhizobium* nach Immobilisierung der Zellen in Alginat oder Adsorption an Tonmineralien.

Zusammenfassend kann vermutet werden, dass die beobachtete erhöhte Thermotoleranz der Ammoniakoxidanten in der Pilotanlage möglicherweise aus der Einbettung der Zellen in die Biofilmmatrix resultierte, wobei die Sauerstoffkonzentration den entscheidenden Faktor darstellen könnte.

5.2 Der Einfluss der Temperatur auf *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14)

5.2.1 Einfluss der Temperatur auf Wachstum, Aktivität und Nutzeffekt

Aus Untersuchungen mit Reinkulturen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) konnten weitere Details zur Auswirkung hoher Temperaturen auf Ammoniak oxidierende Bakterien ermittelt werden.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse belegen, dass die Auswirkungen supermaximaler Temperaturen nicht nur von der Höhe der Temperatur sondern auch von ihrer Einwirkungsdauer abhängig waren. Bei einer Inkubationszeit von acht Stunden war Wachstum bis maximal 41 °C möglich. Im Bereich von 33 °C bis 37 °C war die Wachstumsrate gegenüber 28 °C erhöht. Aktivität wurde im gleiche Versuchszeitraum bis maximal 51 °C gefunden. Bei einwöchiger, konstanter Temperatur wurden Nitritbildung und Wachstum dagegen nur bis zu einer Temperatur von 35 °C festgestellt.

Eine entsprechende Reaktion auf letale Temperaturen wurde bereits von JONES und MORITA (1985) beschrieben, die eine anfänglich hohe Nitritproduktion von *Nitrosomonas spec.* bei Temperaturen oberhalb von 35 °C auf eine Stressreaktion zurückführten. Auch Untersuchungen von *E. coli* und *Lactococcus lactis* ergaben, dass bei einer Stresstemperatur von 42 °C für 2-3 Stunden eine erhöhte Wachstumsrate nachweisbar war, anschließend war das Wachstum vollständig gehemmt (KILSTRUP et al., 1997; VAN BOGELEN et al., 1987; WHITAKER und BATT, 1991). VAN UHDEN (1984) beschrieb für verschiedene *Saccharomyces*-Stämme jeweils unterschiedlich hohe Wachstumsraten bei Kurzzeit- bzw. Langzeitinkubation.

Auswirkungen hoher Temperaturen auf die Aktivität von Ammoniakoxidanten wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen in Versuchen mit wenigen Stunden Dauer festgestellt. WILLERS et al. (1998) bestimmten für die Ammoniakoxidanten des Belebtschlamm der Kläranlage eines Kälbermastbetriebes bei einer Inkubationszeit von einer Stunde ein Temperaturoptimum von 40 °C und ein -maximum von 45-50 °C. Für Ammoniakoxidanten aus der Kläranlage eines Schweinemastbetriebes waren die Kardinalpunkte bei dreistündiger Inkubationszeit mit $T_{opt} = 35$ °C und $T_{max} = 40-45$ °C deutlich geringer. GRUNDITZ und DALHAMMER (2001) bestimmten in vierstündigen Experimenten für einen aus Belebtschlamm isolierten *Nitrosomonas* spec. ein Temperaturoptimum von 35-40 °C und ein -maximum von 50 °C. SÖLTER und ORTH (1998) fanden bei Batchversuchen zur Ammoniakoxidation von Trübwasser mit einer nicht näher definierten Mischkultur ein Temperaturoptimum von 33 °C und ein Temperaturmaximum >40 °C. HELLINGA et al. (1998) bestimmten durch Respirationsmessungen für Ammoniakoxidanten aus Belebtschlamm ein Aktivitätsoptimum von 40 °C.

Ein weiterer Effekt der Temperatur auf *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) war ein starker Abfall des Nutzeffektes bei Temperaturen von 37-40 °C. Der Nutzeffekt Ammoniak oxidierender Bakterien ist variabel. Er ist von verschiedenen Faktoren abhängig, wie dem eingesetzten Stamm, dem physiologischen Alter der Kulturen oder der Akkumulation von Nitrit im Anzuchtmedium (KRÜMMEL und HARMS, 1982). Für Ammoniakoxidanten der Gattung *Nitrosomonas* wurde ein Nutzeffekt zwischen 10–15 % angegeben (WINOGRADSKY, 1906; MEYERHOF, 1917; BÖMEKE, 1951; ENGEL, 1957; ZART, 1997). Der höchst Nutzeffekt wurde mit 40 % in exponentiell wachsenden Kulturen bestimmt (HOFMAN und LEES, 1952). KRÜMMEL und HARMS (1982) ermittelten für *Nitrosomonas* spec. Nm1 einen Nutzeffekt von 4,3–9 %. Bei *Nitrosomonas eutropha* (N904) war der Nutzeffekt unter aeroben Bedingungen mit 20–28 % etwa doppelt so hoch wie unter anoxischen Bedingungen mit 10–14 % (SCHMIDT, 1997). Der im Rahmen dieser Arbeit unter optimalen Bedingungen in exponentiell wachsenden Kulturen bestimmte Nutzeffekt von 8,4 % von *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) ließ auf eine vergleichsweise schlechte thermodynamische Ausbeute dieses Stammes schließen.

Der Rückgang des Nutzeffektes bei *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) von 8,4 % (bei 28 °C) auf minimal 1,3 % (bei 40 °C) könnte folgende Ursachen haben. Bei der Renaturierung denaturierter Proteine durch das Chaperon- und Chaperoninsystem wird Energie in Form von ATP benötigt (HARTL, 1996; MIERNYK, 1999). Da vermutlich der Anteil denaturierter Proteine in der Zelle mit der Temperatur ansteigt, sind ATPspaltende Reparatursysteme vielleicht für die geringere thermodynamische Ausbeute der Zellen bei erhöhten Temperaturen verantwortlich. Außerdem wird auch für den Abbau irreversibel geschädigter Proteinen Energie benötigt. WATSON (1990) und LINDQUIST (1992) beschreiben, dass Prokaryoten ATPabhängige proteolytische Systeme besitzen. Bei *E. coli* sind zwei ATPabhängige Proteasen bekannt, die durch Stress induziert werden und vor allem denaturierte Proteine spalten: die *lon*-Protease (GOFF et al., 1984) und die ClpP-Untereinheit der Clp-Protease (KROH und SIMON, 1990). Auch Ammoniakoxidanten könnten entsprechende Proteasen besitzen. Die Abnahme des Nutzeffektes wäre demnach auch auf eine bei steigender Inkubationstemperatur zunehmende proteolytische Spaltung denaturierter Proteine zurückzuführen.

Möglicherweise wird bei hoher Temperatur auch die Zytoplasmamembran von *N. eutropha* destabilisiert. Bei *E. coli* wurde bei Temperaturstress ein Verlust von Proteinen des Zytoplasmas durch die Membran beobachtet (YATEVIN et al., 1986). Die Abgabe von Aminosäuren ins Medium unter Stressbedingungen wurde auch bei *Nitrosococcus oceanus* und *Nitrosomonas europaea* (KOOOPS, 1969; BOCK, 1965) gefunden. SCHMIDT (1997) fand eine verstärkte Glycinexkretion von *Nitrosomonas eutropha* (N904) bei hohen Ammoniakoxidationsraten unter sauerstofflimitierten Bedingungen. Die Änderungen der Membraneigenschaften unter Hitzestress könnte möglicherweise auch bei *N. eutropha* (Nm14) zu einer Abgabe von organischen Molekülen ins Medium führen und damit den Nutzeffekt herabsetzen.

5.2.2 Einfluss der Temperatur auf die Zellmorphologie

Unter Stressbedingungen wurden in Bakterienkulturen oft auch Änderungen der Morphologie gefunden (ROWAN, 1999). Bei stäbchenförmigen Organismen wurde unter Stress häufig eine Zellverlängerung oder Filamentbildung beschrieben (PAEK und WALKER, 1987; BUKAU und WALKER, 1989; MCCALLUM und INNIS, 1990; MCCARTY und WALKER, 1994; ROWAN, 1999). Diese Zellverlängerungen konnten u.a. durch eine Veränderung der Osmolarität (ROTH et al., 1985; SCHLEYER et al., 1993, RUZAL und SANCHEZ-RIVAS, 1994, BRAZIN, 1973; JØRGENSEN et al., 1995), niedrige pH-Werte (JAN et al., 2001) oder Hungerstress (WOOD und KELLY, 1993) ausgelöst werden. Zellen des tropischen Stickstofffixierers *Sinorhizobium arboris* waren unter Hitzestress von 40 °C 2-4fach vergrößert und zeigten eine große Pleomorphie (RÄSÄNEN et al., 2001). Die Vergrößerung von Zellen deutet auf eine Hemmung der Zellteilung unter Stressbedingungen hin.

Morphologisch auffällige Zellen wiesen häufig eine erhöhte Thermotoleranz auf (JØRGENSEN et al., 1995, MCCALLUM und INNIS, 1990). Ein in Zellketten wachsender Stamm von *Listeria monocytogenes* zeigte gegenüber den als Einzelzellen wachsenden Stämmen eine 2-3fach erhöhte Thermotoleranz (ROWAN und ANDERSON, 1998). Die Ursache für dieses Phänomen konnte bisher nicht ermittelt werden.

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen waren die Zellen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) nach Inkubation bei 37 °C und bei 38 °C ebenfalls deutlich vergrößert, wobei vor allem die Zelllänge zunahm. Dies stand in Zusammenhang mit der Ausbildung von Thermotoleranz.

5.2.3 Stressantwort bei *Nitrosomonas eutropha*

Stressproteine befinden sich bei Prokaryoten hauptsächlich im Zytosol und sind nur zu einem sehr geringen Anteil mit den Membranen assoziiert (BUKAU et al., 1993). Zum Nachweis von Stressproteinen bei *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) wurden daher nur die löslichen Proteine des Zytoplasmas untersucht. Zur Auftrennung wurde eine eindimensionale Gelelektrophorese durchgeführt, da die Trennschärfe in der Regel ausreicht, um in orientierenden Versuchen stark überexprimierte Proteine erfolgreich nachzuweisen (WHITAKER und BATT, 1991; HUBER et al., 1995; SIENKIEWICZ et al., 1997; XAVIER und INGHAM, 1997).

Tab. 10 Nachweis von temperaturinduzierten Stressproteinen in Eubakterien mit spezifischen Antikörpern, n.u. = nicht untersucht

Art	Antiserum gegen		Referenz
	Chaperonine	HSP70-Chaperone	
<i>Acidithiobacillus ferro-oxidans</i> *	GroEL (<i>Escherichia coli</i>)	DnaK (<i>E. coli</i>)	Varela und Jerez, 1992
<i>Bacillus subtilis</i>	GroEL (<i>E. coli</i>)	DnaK (<i>E. coli</i>)	Arnosti et al., 1986
<i>Enterococcus faecalis</i>	GroEL (<i>E. coli</i>)	DnaK (<i>E. coli</i>)	Flahaut et al., 1996
<i>Campylobacter rectus</i>	HSP60 (<i>Homo sapiens</i> , <i>Actinobacillus actinomy-cetemcomitans</i> , <i>Bacillus forsythus</i> , <i>Porphyromonas gingivalis</i>)	n.u.	Hinode et al., 1998
<i>Caulobacter crescentus</i>	GroEL (<i>E. coli</i>)	DnaK (<i>E. coli</i>)	Gomes et al., 1986
<i>Lactococcus lactis</i>	GroEL (<i>Bacillus stearothermophilus</i>)	DnaK (<i>Bacillus subtilis</i>)	Kilstrup et al., 1997
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	GroEL (<i>E. coli</i>)	DnaK (<i>E. coli</i>)	Whitaker und Batt, 1991
<i>Legionella pneumophila</i>	GroEL (<i>E. coli</i>)	n.u.	Lema et al., 1988
<i>Nitrosomonas europaea</i>	GroEL (<i>Rhodobacter sphaeroides</i>)	n.u.	Duncan et al., 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	GroEL (<i>E. coli</i>)	DnaK (<i>E. coli</i>)	Allan et al., 1988
<i>Pseudomonas putida</i>	GroEL (<i>R. sphaeroides</i>)	n.u.	Duncan et al., 2000
<i>Prevotella intermedia</i>	n.u.	DnaK (<i>E. coli</i>) DnaJ (<i>E. coli</i>)	Kadri et al., 1998
<i>Sphingomonas capsulata</i>	GroEL (<i>R. sphaeroides</i>)	n.u.	Duncan et al., 2000
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (und 9 weitere Spezies)	HSP60 (<i>Synechococcus sp.</i>)	n.u.	Koga et al., 1996
<i>Vibrio cholerae</i>	GroEL (<i>E. coli</i>)	n.u.	Taguchi et al., 1996

* früher: *Thiobacillus ferrooxidans* (KELLY und WOOD, 2000)

Bei *Nitrosomonas eutropha* führten Inkubationstemperaturen von 33-40 °C zu einer Änderung der Proteinzusammensetzung mit einer starken Erhöhung der Menge von vier Proteinen. Damit wurde auch bei diesem Organismus eine Hitzeschockantwort belegt. Bei der Inkubationstemperatur von 38 °C (5-10 °C über dem Temperaturoptimum) war die Stressantwort am stärksten ausgeprägt. Nach LINDQUIST (1986) wird bei den meisten Organismen die stärkste Synthese von Stressproteinen durch Temperaturen von etwa 10 °C über dem Temperaturoptimum induziert. Zur Induktion von Stressproteinen mesophiler Organismen mit einem Temperaturoptimum von 30 °C wird häufig eine Temperatur von 42 °C (z.B. *Lactococcus*, *Bacillus*, *Acidithiobacillus*), für Organismen mit einem Temperaturoptimum von 37 °C eine Temperatur von 45-50 °C (z.B. *Escherichia*, *Listeria*, *Prevotella*, *Vibrio*) eingesetzt, um eine maximale Stressantwort zu induzieren (Referenzen in Tab. 10).

Bei *N. eutropha* lag die Temperatur für die maximale Bildung von Stressproteinen somit etwas niedriger.

Im Rahmen dieser Arbeit konnte bei *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) mit Hilfe spezifischer Antikörper bei Stresstemperaturen die Induktion eines HSP60-Chaperonins und eines HSP74-Chaperons gezeigt werden. Die Induktion von Chaperoninen und den Komponenten des HSP70-Chaperonsystems durch Temperaturstress wurden bereits in vielen Prokaryoten belegt (Tab. 10). *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) zeigte somit eine mit anderen mesophilen Organismen vergleichbare Reaktion auf erhöhte Temperaturen. Auch bei *Nitrosomonas europaea* wurde ein HSP60-Protein (DUNCAN et al., 2000) und die Gene der HSP70-Chaperone nachgewiesen. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz von HSP70 hatte eine hohe Homologie von 73,9 % zum DnaK-Protein von *E. coli* (IZUMI und NAKAMURA, 1997 und 1999).

Das HSP70-Chaperonsystem und die Chaperonine zählen zu den Proteinen, die unter Stressbedingungen sofort stark induziert werden (LINDQUIST, 1986). Versuche mit *E. coli* zeigten, dass die Syntheserate der Hitzeschockproteine unmittelbar nach der Temperaturänderung stark anstieg. Die maximale Syntheserate (10-15fache Erhöhung) der Hitzeschockproteine wurde nach 5 min erreicht. Etwa 20 % der insgesamt synthetisierten Proteine waren bei dem Temperaturstress den Hitzeschockproteinen zuzuordnen (LEMAUX et al., 1978). Unter Stressbedingungen haben Stressproteine einen Anteil von 0,5-15 % an den Gesamtzellproteinen (LINDQUIST, 1992).

Bei den von mir durchgeführten Versuchen mit *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) konnte bei der Stresstemperatur von 38 °C eine sofortige Induktion von HSP60 gezeigt werden. Die relative Menge dieses Stressproteins stieg in den ersten 8 Versuchsstunden auf das Dreifache. Nach 24 Stunden war das Vierfache der Ausgangsmenge vorhanden. Der Induktionsverlauf war nahezu übereinstimmend mit der von IZUMI und NAKAMURA (1999) beschriebenen Expression des HSP70-Operons von *Nitrosomonas europaea*. Bei Expressionsanalysen mit einem Reportergen wurde von dieser Arbeitsgruppe bei der Stresstemperatur von 37 °C ein Anstieg der β -Galactosidaseaktivität auf das Achtfache gemessen, wobei in den ersten acht Stunden ein sehr starker Anstieg und im Zeitraum von 8-24 Stunden nur noch eine geringe Zunahme erfolgte.

Stressproteine stellen ein wichtiges zelluläres Reparatursystem dar, das das Absterben von Zellen bei Letaltemperaturen verhindert. An Absterbekurven ist das Vorhandensein von Stressproteinen an einem „Schulter“-Bereich zu erkennen (PAGÁN et al., 1999). Absterbekurven von *Nitrosomonas eutropha* zeigten bei allen Temperaturen einen ausgeprägten Schulterbereich, der auf intrazelluläre Reparaturprozesse zurückzuführen war (CODON et al., 1996; PAGAN et al., 1997; VAN UHDEN, 1984). Die Länge der Schulter war bei den Absterbekurven von *N. eutropha* positiv mit der Konzentration an Stressproteinen in der Zelle korreliert.

Durch moderaten Hitzeschock wird bei vielen Organismen Thermotoleranz induziert. Nach Induktion von Thermotoleranz sind Absterbekurven üblicherweise durch die Ausprägung einer Schulter bzw. eine Verlängerung der Schulter und eine Erhöhung des D₁₀-Wertes charakterisiert (NUSSENZWEIG et al., 1997). HUBERT et al. (1995) fanden bei *Acidithiobacillus ferrooxidans* (früher: *Thiobacillus ferrooxidans*, KELLY und WOOD, 2000) sowohl die

Ausprägung einer Schulter als auch einen erhöhten D_{10} -Wert. Für *Nitrosomonas eutropha* wurde in meinen Untersuchungen ebenfalls eine Erhöhung des D_{10} -Wertes von 7 Stunden auf 18 Stunden dokumentiert. Allerdings war die Länge der Schulter nicht erhöht. Bei *Nitrosomonas eutropha* (Nm14) konnte somit, analog zu anderen Organismen, durch einen moderaten Hitzeschock Thermotoleranz induziert werden.

Nach Induktion der Thermotoleranz durch Temperaturstress bei 38 °C war die Zahl überlebender Zellen im Vergleich zu einer nichtinduzierten Kontrolle bis zu 100fach erhöht. Die Ausprägung der Thermotoleranz war dabei von der Induktionszeit abhängig, wobei der maximale Effekt durch eine Induktionszeit von 8 Stunden erzielt werden konnte. Damit steht das Ergebnis in Übereinstimmung mit Untersuchungen von HUBERT et al. (1995), die eine maximale Thermotoleranz von *Acidithiobacillus ferrooxidans* nach 7-11stündiger Induktionszeit ermittelten.

Verschiedene Arbeitsgruppen berichten, dass bei Bakterien eine positive Korrelation zwischen der Ausbildung von Thermotoleranz und der Synthese von Stressproteinen vorhanden ist (FLAHAUT et al., 1997; XAVIER et al., 1997; MOHAVEDI und WAITES, 2000). Auch für eukaryotische Zelllinien wurden meist Korrelationen zwischen der Menge an Stressproteinen und der Thermotoleranz ermittelt (LANDRY et al., 1989; LASZLO und LI, 1985; LI, 1985). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch für *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) ein Zusammenhang zwischen der Induktion der Stressproteine HSP60 und DnaK und der Ausprägung von Thermotoleranz nachgewiesen.

Bereits vor etwa 10 Jahren schlug SANDERS (1993) die Nutzung von Stressproteinen als Biomarker zur Detektion von Stressbedingungen an Nitrifikationsstandorten vor. Dafür sollten die am höchsten konservierten Stressproteine HSP70 (DnaK) und HSP60 (GroEL) eingesetzt werden. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass Stressproteine auch konstitutiv in den Zellen vorhanden sind. Die Stressproteinmenge wurde daher meist auf den Gesamtproteingehalt der Probe normiert und die Menge des untersuchten Stressproteins als µg Protein/mg Gesamtprotein angegeben (LEWIS et al., 1999). Auch in nitrifizierenden Belebtschlamm konnten DUNCAN et al. (2000) und BOTT und LOVE (2001) polyklonale Antikörper gegen GroEL bereits erfolgreich zur Detektion von Stressbedingungen einsetzen. Möglicherweise kann durch einen routinemäßig durchgeführten Nachweis von Stressproteinen die Störung eines Nitrifikationssystems bereits vor Rückgang der Betriebsleistung erkannt werden.

5.2.4 Einfluss der Temperatur auf die Ammoniakmonooxygenase

Im Folgenden sollen mögliche Ursachen für das Absterben von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) bei Temperaturen von 37-43 °C diskutiert werden. ALLEMANN und PRESTON (1991) vermuteten bereits, dass Temperaturen oberhalb von 35 °C für Ammoniakoxidanten eine „lebensbedrohliche Stresssituation“ darstellen, in der vermutlich Enzyme zerstört werden. Viele andere mesophile Organismen können bei Temperaturen von bis zu 40 °C wachsen, was darauf hindeutet, dass ein Schlüsselenzym der Ammoniakoxidanten eine besondere Thermolabilität aufweisen könnte.

Meine Untersuchungen ergaben, dass bei den Letaltemperaturen von 38 °C und 40 °C der Anteil von AmoA und AmoB an den Gesamtzellproteinen abnahm. Dies resultierte auch in einer Abnahme des AMO-Gehaltes pro Zelle. Bei 40 °C nahm die AMO-Konzentration der Ansätze schneller ab als bei 38 °C. Daraus kann abgeleitet werden, dass diese Abnahme temperaturabhängig war. Nach 24 Stunden (40 °C) bzw. 120 Stunden (38 °C) Inkubation wurde keine weitere Veränderung des Proteinmusters mehr gefunden. Aufgrund dieses konstanten Proteinmusters kann man davon ausgehen, dass eine physikalische, rein thermisch induzierte Spaltung der AMO offensichtlich nicht vorlag.

LOOK (2002) fand bei NO-Begasung und bei Abwesenheit von Ammonium eine Abspaltung von Peptiden am C-terminalen Ende der AmoA und detektierte mit spezifischen Antikörpern ein kleineres Reaktionsprodukt der AmoA. Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei hohen Temperaturen dagegen keine Änderung der Molekülgröße (etwa durch Abspaltung) festgestellt. Zudem bestand keine Relation zwischen der Nitritbildungsrate und der AMO-Menge der Ansätze. Auch erfolgte der Rückgang der Aktivität weit schneller als die Abnahme des AMO-Gehaltes pro Zelle.

Der Grund für die Abnahme des AMO-Gehaltes könnte in einer Hemmung der AMO-Synthese und/oder einem verstärkten Abbau denaturierter AMO begründet sein. Im Rahmen der Stressantwort werden Aggregate denaturierter Proteine markiert und durch stressinduzierbare Proteasen abgebaut (LINDQUIST, 1992; WATSON, 1990). Eine Abnahme der AmoA-Konzentration, wie sie beispielsweise nach 24stündiger Inkubation bei 40 °C gefunden wurde, könnte somit auch Folge eines verstärkten Abbaus dieses Proteins sein. Ein verstärkter Abbau würde auf einen hohen Anteil von denaturiertem Enzymprotein hinweisen und könnte somit eine höhere Temperatursensitivität dieses Enzyms belegen.

Untersuchungen von HYMAN und ARP (1992) und STEIN et al. (1997) deuten außerdem darauf hin, dass die AMO als membranassoziiertes Protein möglicherweise nicht durch Chaperone renaturiert werden kann. Nach spezifischer Hemmung der AMO von *Nitrosomonas eutropha* durch Acetylen bzw. Licht oder unspezifisch durch Trichloressigsäure war für eine erneute Ausbildung von Aktivität Proteinbiosynthese erforderlich (HYMAN und ARP, 1992). STEIN et al. (1997) fanden, dass eine Erhöhung der Ammoniumkonzentration im Medium nur dann zu einer erhöhten Ammoniakoxidationsaktivität führte, wenn die Proteinbiosynthese nicht gehemmt war und eine Neusynthese von AmoA und AmoB erfolgen konnte.

Ein Einfluss der Temperatur auf den AMO-Gehalt von Zellen wurde allerdings nur bei dem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hitzestress (38 °C und 40 °C) gefunden. Im Temperaturbereich von 10–28 °C war der AMO-Gehalt von *Nitrosomonas eutropha* konstant (PINCK, 2001). Außerdem belegten Untersuchungen, dass die Aktivität von *Nitrosomonas spec.* auch unter Kältestress (5–10 °C) vollständig gehemmt war. Dies führte aber im Unterschied zum Hitzestress nicht zu einer irreversiblen Schädigung der Zellen. ANDERSSON et al. (2001) fanden, dass Nitrifizierer auch nach mehrwöchiger Inkubation bei einer Temperatur von 5 °C nach Anheben der Temperatur sofort wieder eine hohe Aktivität aufwiesen.

In hungernden Zellen von *Nitrosomonas eutropha* fanden PINCK et al. (2001) einen im Vergleich zu wachsenden Zellen erhöhten Gehalt an AMO und führten dieses Ergebnis auf

einen gegenüber anderen Zellproteinen besonders ausgeprägten Schutz der AMO vor Abbau zurück.

Mit den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten ersten Versuchen konnte somit nicht geklärt werden, worauf die Abnahme des AMO-Gehaltes der Zellen zurückzuführen war. Zur Klärung dieser Frage müssten die unter Hitzestress gebildeten Proteine radioaktiv markiert werden. Damit könnte belegt werden, inwieweit die Synthese der AMO in Abhängigkeit von der Temperatur gehemmt wird oder die AMO durch stressinduzierbare Proteasen abgebaut wird.

6 Literatur

- ABDELGADIR, A.H. und M. ALEXANDER. 1997. Procedures to enhance heat resistance of *Rhizobium*. PLANT SOIL **188**: 93-100.
- ADAMS, M.W.W. 1994. Enzymes and proteins from organisms that grow near and above 100 °C. ANNU. REV. MICROBIOL. **47**: 627-658.
- ADDINALL, S.G.; E. BI und J. LUTKENHAUS. 1996. FtsZ ring formation in *fts* mutants. J. BACTERIOL. **178**: 3877-3884.
- ALDSWORTH, T.G.; R.L. SHARMAN; C.E.R. DODD und G.S.A.B. STEWARD. 1998. A competitive microflora increases the resistance of *Salmonella typhimurium* to inimical processes: evidence for a suicide response. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **64**: 1323-1327.
- ALEXANDER M.; K.C. MARSHALL und P. HIRSCH. 1960. Autotrophy and heterotrophy in nitrification. TRANS. INT. CONGR. SOIL SCI. **2**: 586-591.
- ALLAN, B.; M. LINSEMAN; L.A. MACDONALD; J.S. LAM und A.M. KROPINSKI. 1988. Heat-shock response of *Pseudomonas aeruginosa*. J. BACTERIOL. **170**: 3668-3674.
- ALLEMAN, J.E. und K. PRESTON. 1991. Behavior and physiology of nitrifying bacteria. PROCEEDINGS OF THE SECOND ANNUAL CONFERENCE ON COMMERCIAL AQUACULTURE, CES 240/IL-IN-SG-E-91-8, BLOOMINGTON, ILLINOIS, USA pp. 1-13.
- ANDERSSON, A.; P. LAURENT; A. KIHN; M. PRÉVOST und P. SERVAIS. 2001. Impact of temperature on nitrification in biological activated carbon (BAC) filters used for drinking water treatment. WAT. RES. **35**: 2923-2934.
- ANDERSSON, K.K. und A.B. HOOPER. 1983. O₂ and H₂O are each the source of one O in NO₂⁻ produced from NH₄⁺ from *Nitrosomonas*: ¹⁵-N-NMR evidence. FEBS LETT. **164**: 236-240.
- ANFENSEN, C.B. 1973. Principles that govern the folding of protein chains. SCIENCE **181**: 223-230.
- ANG, D.; G.N. CHANDRASEKHAR; M. ZYLICZ und C. GEORGOPOULOS. 1986. *Escherichia coli* *grpE* gene codes for heat-shock protein B25.3, essential for both lambda DNA replication at all temperatures and host growth at high temperature. J. BACTERIOL. **167**: 25-29.
- ANTONIOU, P.; J. HAMILTON; B. KOOPMAN; R. JAIN; B. HOLLOWAY; G. LYBERATOS und S. SVORONOS. 1990. Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. WAT. RES. **24**: 97-101.
- APHA. 1995. Standard methods for the examination of water and wastewater, 20th edition, American Public Health Association, Washington DC, 4/117-4/120.
- ARNOSTI, D.N.; V.L. SINGER und M.J. CHAMBERLAIN. 1986. Characterization of heat shock in *Bacillus subtilis*. J. BACTERIOL. **168**: 1243-1249.
- ARRHENIUS, S. 1889. Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Z. PHYS. CHEM. **4**: 226-248.
- ASANO, M.; H. MYOGA; M. ASANO und M. TOYAO. 1992. A study of nitrification utilizing whole microorganisms immobilised by the PVA-freezing method. WAT. SCI. TECHNOL. **26**: 1037-1046.
- BACHMANN, B.J. 1990. Linkage map of *Escherichia coli* K-12, edition 8. MICROBIOL. REV. **54**: 130-197.
- BECKER J. und E.A. CRAIG. 1994. Heat-shock proteins as molecular chaperones. EUR. J. BIOCHEM. **219**: 11-23.

- BERGERON, P. 1978. Untersuchungen zur Kinetik der Denitrifikation. KARLSRUHER BERICHTE H12.
- BLÖCHEL, E.; R. RACHEL; S. BURGGRAB; D. HAFENBRADL; H.W. JANNASCH und K.O. STETTER. 1997. *Pyrolus fumarii*, gen. and sp. nov. represents a novel group of archaea, extending the upper temperature limit of life for 113 °C. EXTREMOPHILES **1**: 14-21.
- BOCK, E. 1965. Vergleichende Untersuchungen über die Wirkungen sichtbaren Lichts auf *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter winogradskyi*. ARCH. MIKROBIOL. **51**, 18-41.
- BOCK, E.; H.-P. KOOPS und H. HARMS. 1986. Cell biology of nitrifying bacteria. In: J. PROSSER (Hrsg.) Nitrification. IRL PRESS, OXFORD, S. 17-38.
- BOCK, E. und M. WAGNER. 2001. Oxidation of inorganic nitrogen compounds as an energy source. In: M. DWORKIN, K.-H. SCHLEIFFER und E. STACKEBRANDT (Hrsg.), The Prokaryotes. SPRINGER-VERLAG, NEW YORK, 3. Auflage, online.
- BOHLOOL, B.B. und E.L. SCHMIDT. 1980. The immunofluorescence approach in microbial ecology. ADV. MICROBIAL ECOL. **4**: 203-241.
- BÖMEKE, H. 1951: *Nitrosomonas oligocarbogenes*, ein obligat autotrophes Nitritbakterium. ARCH. MIKROBIOL. **15**: 414-427.
- BORCHARD, J.A. .1966. Nitrification in the activated sludge process. In: The activated sludge process. DIR. SANIT. WATER RESOURCES ENG., UNIV. OF MICHIGAN, ANN ARBOR.
- BOSTON, R.S.; P.V. VITTANEN und E. VIERLING. 1996. Molecular chaperones and protein folding in plants. PLANT MOL. BIOL. **32**: 191-122.
- BOTT, C.B. und N.G. LOVE. 2001. The immunochemical detection of stress proteins in activated sludge exposed to toxic chemicals. WAT. RES. **35**: 91-100.
- BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgramm quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. ANAL. BIOCHEM. **72**: 248-254.
- BRÄUTIGAM, H.J. 1997. Entwicklung eines Verfahrens zur biologischen Stickstoffelimination aus dem Zentrat der Faulschlammmentwässerung. SCHLUSSBERICHT DES BMBF-VORHABENS 02 WA 9462/9, TEIL B, HAMBURG.
- BRAZIN, B. 1973. The effect of NaCl on the morphology of *Listeria monocytogenes*. ZBL. BAKTERIOL. HYG. I. ABT. ORIG. **A225**: 80-84.
- BREMNER, J.M. 1965. Inorganic forms of nitrogen. In: C.A. BLACK (Hrsg.): Methods of soil analysis. AMERICAN SOCIETY OF AGRONOMY, MADISON, WISCONSIN, S. 24902-24909.
- BUKAU, B. und A.L. HORWICH 1998. The HSP60 and the HSP70 chaperone machines CELL **92**: 351-366.
- BUKAU, B. und G. WALKER 1989. Cellular defects caused by deletion of the *Escherichia coli* dnaK gene indicate roles for heat shock protein in normal metabolism. J. BACTERIOL. **171**: 2337-2346.
- BUKAU, B.; P. REILLY; J. MC CARTY und G.C WALKER. 1993. Immunogold localisation of the DnaK heat shock protein in *Escherichia coli* cells. J. GEN. MICROBIOL. **139**: 95-99.
- BUSWELL, A.M.; T. SHIOTA; N. LAWRENCE und I.V. METER. 1954. Laboratory studies on the kinetics of the growth of *Nitrosomonas* with relation to the nitrification phase of the BOD test. APPL. MICROBIOL. **2**: 21-25.
- CARPER, S.W.; J.J. DUFFY und E.W. GERNER. 1987. Heat shock proteins in thermotolerance and other cellular processes. CANCER RES. **47**: 5249-5255.
- CHARACKLIS, W.G und K.C. MARSHALL. 1990. Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: CHARACKLIS, W.G. und K.C. MARSHALL (Hrsg.): Biofilms, Wiley, New York.

- COLLINS, C.K. und P.M. LYNE.** 1970. Most probable number estimates (MPN). *In*: Laboratory Techniques Series, Microbiological Methods 3rd. ED. BUTTERWORTH, UNIVERSITY PARK PRESS, BALTIMORE.
- CONDÓN, S.; A. PALOP; J. RASO und F.J. SALA.** 1996. Influence of the incubation temperature after heat treatment upon the estimated heat resistance values of spores of *Bacillus subtilis*. *LETT. APPL. MICROBIOL.* **22**: 149-152.
- CORNISH, E.A. und R.A. FISHER.** 1937. Moments and cumulants in the specification of distributions, *REV. INT. STATIST. INST.* **5**: 307-310.
- COSTERTON, J.W.; Z. LEWANDOWSKI; D.E. CALDWELL; D.R. KORBER und G. JAMES.** 1995. Microbial biofilms. *ANNU. REV. MICROBIOL.* **49**: 711-745.
- DAWSON, R.M.C.; D.C. ELLIOT; W.H. ELLIOT und K.M. JONES.** 1969. Data for biochemical research. 2TH EDITION, AT THE CLARENDON PRESS, OXFORD.
- DEBEER, D.; J.C. VAN DEN HEUVEL und S.P.P. OTTENGRAAF.** 1993. Microelectrode measurement of activity distributions in nitrifying bacterial aggregates. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* **59**: 573-579.
- DROZD, Z.W.** 1976. Energy coupling and respiration in *Nitrosomonas europaea*. *ARCH. MICROBIOL.* **110**: 157-162.
- DUBOIS, M.; K.A. GILLES; J.K. HAMILTON; P.A. REBERS und F. SMITH.** 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *ANAL. CHEM.* **28**: 350-356.
- DUNCAN, A.J.; C.B. BOTT; K.C. TERLESKY und N.G. LOVE.** 2000. Detection of GroEL in activated sludge: a model for detection of system stress. *LETT. APPL. MICROBIOL.* **30**: 28-32.
- EHRICH, S.; D. BEHRENS; E. LEBEDEVA; W. LUDWIG und E. BOCK.** 1995. A new obligately chemolithotrophic nitrite-oxidising bacterium *Nitrospira moscoviensis* sp. nov. and its phylogenetic relationship. *ARCH. MICROBIOL.* **164**: 16-23.
- EIGHMY, T.T. und P.L. BISHOP.** 1989. Distribution and role of bacterial nitrifying populations in nitrogen removal in aquatic treatment system. *WAT. RES.* **23**, 945-955.
- ELIASSON, G.** 1994. Utvärdering och Resultatredovisning av Ammoniakstrippingsanläggning i Eslöv. *ERGEBNISSE PRÄSENTIERT AUF EINEM SEMINAR, ESLÖV, SCHWEDEN.*
- ELLIKER, P.R. und W.C. FRAZIER.** 1938. *J. BACTERIOL.* **36**: 83-90.
- ENGEL, H.** 1957. Kritische Betrachtungen zum Nutzeffekt der Nitrifikation. *MITT. STAATSNST. F. ALLG. BOT. HAMB.* **11**: 20-24.
- ESSER, W.** 1978. Über den Temperatureinfluss auf das Abbauverhalten sessiler und suspendierter Organismen im Gewässer. *WASSER UND BODEN* **12**: 313-315.
- FAYET, O.; T. ZIEGELHOFFER und C. GEORGOPOULOS.** 1989. The GroES and GroEL heat shock gene products of *Escherichia coli* are essential for bacterial growth at all temperatures. *J. BACTERIOL.* **171**: 1379-1385.
- FDZ-POLANCO, F.; S. VILLAVERDE und P.A. GARCÍA.** 1994. Temperature effect on nitrifying bacteria activity in biofilters: activation und free ammonia inhibition. *WAT. SCI. TECHNOL.* **30**: 121-130.
- FLAHAUT, S.; A. BENACHOUR; J.-C. GIARD; P. BOUTIBONNES und Y. AUFRAY.** 1996. Defence against lethal treatments and de novo protein synthesis induced by NaCl in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. *ARCH. MICROBIOL.* **165**: 317-324.
- FLAHAUT, S.; J. FRERE; P. BOUTIBONNES und Y. AUFRAY.** 1997. Relationship between the thermotolerance and the increase of DnaK and GroEL synthesis in *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. *J. BAS. MICROBIOL.* **37**: 251-258.
- FLEMMING, H.C.** 1995. Sorption sites in biofilms. *WAT. SCI. TECH.* **32**: 27-33.

- FOCHT, D.D. und W. VERSTAETE (1977):** Biochemical ecology of nitrification and denitrification. *ADV. MICROBIAL ECOL.* **1**, 134-214.
- FOOTMAN, T., HRSG.** 2001. Guinness world records 2001.
- GERNER E.W. und M.J. SCHNEIDER.** 1975. Induced thermal resistance in HeLa cells. *NATURE* **256**: 500-502.
- GHIGO, J.M. und J. BECKWITH.** 2000. Cell division in *Escherichia coli*: role of FtsL domains in septal localization, function, and oligomerization. *J. BACTERIOL.* **182**: 116-129.
- GLATZ, A.; I. VASS; D.A. LOSS und L. VÍGH.** 1999. The *Synechocystis* model of stress: from molecular chaperones to membranes. *PLANT. PHYSIOL. BIOCHEM.* **37**: 1-12.
- GOFF, S.A.; L.P. CASSON und A.L. GOLDBERG.** 1984. Heat shock regulatory gene htpR influences rates of protein degradation and expression of the lon gene in *Escherichia coli*. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* **81**: 6647-6651.
- GOLOVACHEVA R.S.** 1976. Thermophilic nitrifying bacteria from hot springs. *MIKROBIOLOGIJA* **45**: 298-301.
- GOMES, S.L.; M.H. JULIANI; J.C.C. MAIA und A.M. SILVA.** 1986. Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. *J. BACTERIOL.* **168**: 923-930.
- GARGEROV, A; E. NUDLER; N. KOMISSAROVA; G.A. GAITANARIS; M.E. GOTTESMAN und V. NIKIFOROV** 1992. Cooperation of GroEL/GroES and DnaK/DnaJ heat shock proteins in preventing protein misfolding in *Escherichia coli*. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* **89**: 10341-10344.
- GROß, M.** 1997. Exzentriker des Lebens - Zellen zwischen Hitzeschock und Kältestress. *SPEKTRUM AKAD. VERL., HEIDELBERG, BERLIN, OXFORD*, S. 38-62.
- GROSSMAN, A.D.; D.B. STRAUS; W.A. WALTER und C.A. GROSS.** 1987. Sigma 32 synthesis can regulate the synthesis of heat shock proteins in *Escherichia coli*. *GENES DEV.* **1**: 179-84.
- GRUNDITZ, C. und G. DALHAMMAR.** 2001. Development of nitrification inhibition assays using pure cultures of *Nitrosomonas* and *Nitrobacter*. *WAT. RES.* **35**: 433-440.
- GÜNNER, C.** 1997. Separate biologische Trübwasserbehandlung zur Verminderung der Stickstoffbelastung—Erfahrungen aus einer halbtechnischen Pilotanlage auf den Klärwerk Köhlbrandhöft in Hamburg. *AWT ABWASSTERTECHNIK* **5**: 53-55.
- HAJEK, P.-M.** 1984. Stickstoffoxidation in Fließgewässern. *BERICHTE AUS WASSERGÜTEWIRTSCHAFT UND GESUNDHEITSINGENIEURWESEN*, TECH. UNIV. MÜNCHEN, NR. 52.
- HARMS, H.** 2001. Persönliche Mitteilung
- HARMS, H.; H.-P. KOOPS und H. WEHRMANN.** 1976. An ammonium-oxidizing bacterium, *Nitrosovibrio tenuis* nov. gen. nov. sp. *ARCH. MICROBIOL.* **108**: 105-111.
- HARMS, H. und S. RÜTHER.** 1997. Entwicklung eines Verfahrens zur biologischen Stickstoffelimination aus dem Zentrat der Faulschlammentwässerung. *SCHLUSSBERICHT DES BMBF-VORHABENS 02 WA 9462/9, TEIL C, HAMBURG.*
- HARTL, U.** 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *NATURE.* **381**: 571-580.
- HASDAY, J.D. und I.S. SINGH.** 2000. Fever and the heat shock response: distinct, partially overlapping processes. *CELL STRESS & CHAPERONES* **5**: 471-480.
- HEAD, I.M.; W.D. HIORNS; T. MARTIN; A.J. MCCARTHY und J.R. SAUNDERS.** 1993. The phylogeny of autotrophic ammonia-oxidizing bacteria as determined by analysis of 16S ribosomal RNA gene sequences. *J. GEN. MICROBIOL.* **139**: 1147-1153.
- HELLINGA, C.; A.A.J.C. SCHELLEN; J.W. MULDER, M.C.M. VAN LOOSDRECHT und J.J. HEIJNEN.** 1998. The SHARON process: an innovative method for nitrogen removal from ammonium-rich waste water. *WAT. SCI. TECHNOL.* **37**: 135-142.

- HENLE K.J. und L.A. DETHLEFSEN. 1978. Heat fractionation and thermotolerance: a review. *CANCER RES.* **38**: 1843-1851.
- HIGHTOWER, L.E. 1980. Cultured animal cells exposed to amino acid analogues or puromycin rapidly synthesize several polypeptides. *J. CELL PHYSIOL.* **102**: 407-427.
- HINODE, D.; M. YOSHIOKA; S.-I. TANABE; O. MIKI; K. MASUDA und R. NAKAMURA. 1998. The GroEL-like protein from *Campylobacter rectus*: immunological characterization and interleukin-6 and -8 induction in human gingival fibroblast. *FEMS MICROBIOL. LETT.* **167**: 1-6.
- HOFMAN, T. und H. LEES. 1952. The biochemistry of the nitrifying organisms, 2. The free energy efficiency of *Nitrosomonas*. *BIOCHEM. J.* **52**: 140-152.
- HOOPER, A.B. und K.R. TERRY. 1973. Specific inhibitors of ammonia oxidation in *Nitrosomonas*. *J. BACTERIOL.* **115**: 480-485.
- HOSKINS, J.R.; M. PAK; M.R. MAURIZI und S. WICKNER. 1998. The role of the ClpA chaperone in proteolysis by ClpP. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA.* **95**: 12135-12140.
- HUANG, CH. S. und N.E. HOPSON. 1974. Nitrification rate in biological processes. *J. ENVIRON. ENG. DIV. PROC., ASCE.* **100**: EE2.
- HUBERT, W.A.; L.G. LEDUC und G.D. FERRONI. 1995. Heat and cold shock responses in different strains of *Thiobacillus ferrooxidans*. *CURR. MICROBIOL.* **31**: 10-14.
- HUNIK, J. 1993. Engineering aspects of nitrification with immobilised cells DISSERTATION, AGRICULTURAL UNIVERSITY WAGENINGEN.
- HYMAN, M.R. und P.M. WOOD. 1985. Suicidal inactivation and labelling of ammonia monooxygenase by acetylene. *BIOCHEM. J.* **227**: 719-725.
- HYMAN, M.R. und D.J. ARP. 1992. $^{14}\text{H}_2\text{O}_2$ - and $^{14}\text{CO}_2$ -labelling studies of the *de novo* synthesis of polypeptides by *Nitrosomonas europaea* during recovery from acetylene and light inactivation of ammonia monooxygenase. *J. BIOL. CHEM.* **267**: 1534-1545.
- IIZUMI, T. und K. NAKAMURA. 1997. Cloning, nucleotide sequence, and regulatory analysis of the *Nitrosomonas europaea dnaK* gene. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* **63**: 1777-1784.
- IIZUMI, T. und K. NAKAMURA. 1999. Regulatory analysis of the *Nitrosomonas europaea grpE-Dank-dnaJ* operon. *J. BIOSCI. BIOENG.* **87**: 234-237.
- INGRAHAM, J.; I. MAALØE und F.C. NEIDHARDT. 1983. Growth of the bacterial cell. LIBRARY OF CONGRESS CATALOGING IN PUBLICATION DATA, SINAUER ASSOCIATES INC., SUNDERLAND, USA, S. 1-48.
- INGRAHAM, J. und A.G. MARR. 1996. Effect of temperature, pressure, pH, and osmotic stress on growth. In: F.C. NEIDHARDT ET AL. (Hrsg.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology, Vol. 2, 2nd edition, ASM PRESS, WASHINGTON DC.
- ITOH, K.; T. ITADANI; H. YOSIMURA und S. SHINODA. 1989. Immobilisation of nitrifying bacteria and its application for wastewater treatment. *EISEI KAGAKU* **35**: 125-133.
- JAN, G.; P. LEVERRIER; V. PICHEREAU und P. BOYAVAL. 2001. Changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* **67**: 2029-2039.
- JETTEN, M.S.M.; S. HORN und M.C.M. VAN LOOSDRECHT. 1997. Towards a more sustainable municipal wastewater treatment system. *WAT. SCI. TECHNOL.* **35**: 171-178.
- JETTEN, M.S.M.; M. STROUS; K.T. VAN DE PAS-SCHOONEN, J. SCHALK; L. VAN DONGEN; A.A. VAN DE GRAF, S. LONGEMANN; G. MUYZER; M.C.M. VAN LOOSDRECHT und J.G. KUENEN. 1998. The anaerobic oxidation of ammonium. *FEMS MICROBIOL. REV.* **22**: 421-437.

- JONES, R.D. und R.Y. MORITA. 1985. Low-temperature and whole-cell kinetics of a marine ammonium oxidizer. MAR. ECOL. PROG. SER. **21**: 239-243.
- JØRGENSEN, F.; P.J. STEPHENS und S. KNØCHEL. 1995. The effect of osmotic shock and subsequent adaptation on thermotolerance and cell morphology of *Listeria monocytogenes*. J. APPL. BACTERIOL. **79**: 274-281.
- KADRI, R.; D. DEVINE und W. ASHRAF. 1998. Purification and functional analysis of the DnaK homologue from *Prevotella intermedia* OMZ 326. FEMS MICROBIOL. LETT. **167**: 10-14.
- KELETI G. und W.H. LEDERER. 1974. Handbook of micromethods for the biological sciences. VAN NOSTRAND REINHOLD COMPANY, LONDON, TORONTO, MELBOURNE.
- KELLY; D.P und A.P. WOOD. 2000. Reclassification of some species of *Thiobacillus* to the newly designated genera *Acidithiobacillus* gen. nov., *Halothiobacillus* gen. nov. and *Thermithiobacillus* gen. nov. INT. J. SYST. BACTERIOL. **50**: 511-516.
- KILHAM, K. 1986. Heterotrophic nitrification. In: PROSSER, J.I. (Hrsg.) Nitrification. IRL PRESS, OXFORD, WASHINGTON, S. 117-126.
- KILSTRUP; M; S. JACOBSEN; K. HAMMER und F.K. VOGENSEN. 1997. Induction of heat shock proteins DnaK, GroEL and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **63**: 1826-1837.
- KLOEP, F.; I. RÖSKE und T.R. NEU. 2000. Performance and microbial structure of a nitrifying fluidized-bed reactor. WAT. RES. **34**: 311-319.
- KLOTZ, M.G.; J. ALZERRECA und J.M. NORTON. 1997. A gene encoding a membrane protein exists upstream of the amo A/amo B genes in ammonia oxidizing bacteria: a third member of the amo operon? FEMS MICROBIOL. LETT. **150**: 65-73.
- KOGA, T.; Y. NAKAJYO und A. KOMOTO. 1996. Detection of Hsp60 (GroEL)-like proteins in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* species by Western Blotting. LETT. APPL. MICROBIOL. **23**: 295-298.
- KOK, M.; R. OLDENHUIS; M.P.G. VAN DER LINDEN; C.H.C. MEULENBERG, J. KINGMA und B. WITHOLT. 1989. *Pseudomonas oleovorans* alkane hydroxylase: sequence and expression. J. BIOL. CHEM. **264**: 5435-5441.
- KOOPS, H.-P. 2002. Persönliche Mitteilung
- KOOPS, H.-P. 1969. Der Nutzeffekt der NH_4^+ -Oxydation durch *Nitrosocystis oceanus* Watson. ARCH. MIKROBIOL. **65**: 115-135.
- KOOPS, H.-P.; B. BÖTTCHER; U.C. MÖLLER; A. POMMERINING-RÖSER und G. STEHR. 1991. Classification of eight new species of ammonia-oxidizing bacteria: *Nitrosomonas communis* sp. nov., *Nitrosomonas ureae* sp. nov., *Nitrosomonas aestuarii* sp. nov., *Nitrosomonas marina* sp. nov., *Nitrosomonas nitrosa* sp. nov., *Nitrosomonas eutropha* sp. nov., *Nitrosomonas oligotropha* sp. nov., *Nitrosomonas halophila* sp. nov.. J. GEN. MICROBIOL. **137**: 1689-1699.
- KOOPS, H.-P. und U.C. MÖLLER. 1992. The lithotrophic ammonia-oxidizing bacteria. In: M. DWORKIN, K.-H. SCHLEIFFER und E. STACKEBRANDT (Hrsg.), The Prokaryotes. Springer-Verlag, New York, 3. Auflage, online.
- KROH, H.E. und L.D. SIMON. 1990. The ClpP component of Clp protease is the sigma 32-dependent heat shock protein F21.5. J. BACTERIOL. **172**: 6026-6034.
- KRÜMMEL, A. 1978. Vergleichender Untersuchungen zum Einfluß organischer C-Verbindungen auf das Wachstum, das Fettsäuremuster und die Feinstruktur ammoniakoxidierender Bakterien. DISSERTATION, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HAMBURG.
- KRÜMMEL, A. und H. HARMS. 1982: Effect of organic matter on growth and cell yield of ammonia-oxidizing bacteria. ARCH. MICROBIOL. **133**: 50-54.

- KNABEL, S.J.; H.W. WALKER; P.A. HARTMAN und A.F. MENDOCA. 1990. Effects of growth temperature and strictly anaerobic recovery on the survival of *Listeria monocytogenes* during pasteurization. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **56**: 370-376.
- KYHSE-ANDERSON, J. 1984. Electrophotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. J. BIOCHEM. BIOPHYS. METH. **10**: 203-209.
- LAEMMLI, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. NATURE **227**: 680-685.
- LANDRY, J.; P. CHRETIEN; L.M. NICOLE; R.M. TANGUAY und N. MARCEAU. 1989. Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. J. CELL BIOL. **109**: 7-15.
- LASZLO, A. und G.C. LI. 1985. Heat-resistant variants of Chinese hamster fibroblasts altered in expression of heat shock protein. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA **82**: 8029-8033.
- LEBEDEVA, H. 2002. Persönliche Mitteilung
- LEMA, M.W.; A. BROWN; C.A. BUTLER und P.S. HOFFMANN. 1988. Heat shock response in *Legionella pneumophila*. CAN. J. MICROBIOL. **34**: 1148-1153.
- LEMAUX, P.G.; S.L. HERENDEEN; P.L. BLOCH und F.C. NEIDHARDT. 1978. Transient rates of synthesis of individual polypeptides of *E. coli* following temperature shifts. CELL **13**: 427-434.
- LEMMER, H. 1996. Mikrobiologie und Ökologie- Was haben sie der Abwassertechnik zu bieten? In: LEMMER, H.; T. GRIEBE und H.-C. FLEMMING (Hrsg.) Ökologie der Abwasserorganismen, SPRINGER-VERLAG BERLIN, HEIDELBERG, NEW YORK. S.1-10.
- LEWIS, S.; R.D. HANDY; B. CORDI; Z. BILLINGHURST und M.H. DEPLEDGE. 1999. Stress proteins (HSP's): methods of detection and their use as an environmental biomarker. ECOTOXICOL. **8**: 351-368.
- LI, G.C. und A. LASZLO. 1985. Thermotolerance in mammalian cells: a possible role for the heat shock proteins. In: LI, G.C. UND A. LASZLO (Hrsg.), Changes in eukaryotic gene expression in response to environmental stress. ACADEMIC, LONDON, S.349-371.
- LINDQUIST, S. 1980. Varying patterns of protein synthesis during heat-shock. DEV. BIOL. **77**: 463-479.
- LINDQUIST, S. 1986. The heat-shock response. ANNU. REV. BIOCHEM. **55**: 1151-1191.
- LINDQUIST, S. 1992. Heat-shock proteins and stress tolerance in microorganisms. CURR. OPIN. GENET. DEV. **2**: 748-755.
- LINDQUIST, S. und E.A. CRAIG. 1988. The heat-shock proteins. ANNU. REV. GENET. **22**: 631-677.
- LIU, D.; P.T.S. WONG und B.J. DUTKA. 1973. Determination of carbohydrate in lake sediment by a modified phenol-sulphuric acid method. WAT. RES. **7**: 741-746.
- LOOK, C. 2002. NO-Bildung und Bindeproteine bei *Nitrosomonas eutropha*. DISSERTATION, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HAMBURG.
- LOWRY, O.; N.J. ROSENBROUGH; A.L. FARR und R. RANDALL. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. BIOL. CHEM., **193**: 265-275.
- LOYER, M.L. und M.A. HAMILTON. 1984. Interval estimation of the density of organisms using a serial-dilution experiment. BIOMETRICS, **40**: 907-912.
- LURIA, S. 1960. In: GUNSALUS, I.C. UND R.Y. STANIER (Hrsg.) The Bacteria, Vol. I. ACADEMIC PRESS, NEW YORK.
- MAGER W.H und DE KRUIJFF A.J. 1995. Stress-induced transcriptional activation. MICROBIOL. REV. **59**: 506-31.

- MATSUMURA, M.; T. YAMAMOTO; P.-C. WANG; K. SHINABE und K. YASUDA. 1997. Rapid nitrification with immobilized cell using macro-porous cellulose carrier. WAT. RES. **31**: 1027-1034.
- MCCALLUM, K.L. und W.E. INNIS. 1990. Thermotolerance, cell filamentation, and induced protein synthesis in psychrophilic and psychrotrophic bacteria. ARCH. MICROBIOL. **153**: 585-590.
- MCCARTY, J.S. und G.C. WALKER. 1994. DnaK mutants defective in ATPase activity are defective in negative regulation of the heat shock response: expression of mutant DnaK proteins result in filamentation. J. BACTERIOL. **176**: 764-780.
- MCCORD, J.M.; C.O. BEAUCHAMP; S. GOSCIN; H.P. MISRA und I. FRIEDOWICH. 1973. Superoxide and superoxide dismutase. In: T.G. KING, S.H. MASON und M. MORRISON (Hrsg.), Proceeding of the 2nd international symposium on oxidases and related redox systems. UNIVERSITY PARK PRESS, BALTIMORE, S. 51-76.
- MCTAVISH, H.; J.A. FUCHS und A.B. HOOPER. 1993. Sequence of the gene coding for ammonia-monooxygenase in *Nitrosomonas europaea*. J. BACTERIOL. **175**: 2436-2444.
- MEYERHOF, O. 1917. Untersuchungen über den Atmungsvorgang nitrifizierender Bakterien. PFLÜGERS ARCH. GES. PHYSIOL. **166**: 240-280.
- MIERNYK, J.A. 1999. Protein folding in the plant cell. PLANT PHYSIOL. **121**: 695-703.
- MOATS, W.A. 1971. Kinetics of thermal death in bacteria. J. BACTERIOL. **105**: 165-171.
- MOGK, A.; T. TOMOYASU; P. GOLOUBINOFF; S. RÜDIGER; D. RÖDER; H. LANGEN und B. BUKAU. 1999. Identification of thermolabile *Escherichia coli* proteins: prevention and reversion of aggregation by DnaK and ClpB. EMBO J. **18**: 6934-6949.
- MOHAVEDI, S. und W. WAITES. 2000. A two-dimensional protein gel electrophoresis study of the heat stress response of *Bacillus subtilis* cells during sporulation. J. BACTERIOL. **182**: 4758-4763.
- MORPER, M. 1994. Upgrading of activated sludge systems for nitrogen removal by application of the Linpor CN process. WAT. SCI. TECHNOL. **29**: 167-176.
- MOSSAKOVSKA, A.; L.G. REINIUS und B. HULTMAN. 1997. Nitrification reactions in treatment of supernatant from dewatering of digested sludge. WAT. ENVIRON. RES. **69**: 1128-1133.
- MOTOHASHI, K.; Y. WATANABE; M. YOHDA und M. YOSHIDA. 1999. Heat-inactivated proteins are rescued by the DnaK-DnaJ-GrpE set and ClpB-chaperones. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA **96**: 7184-7189.
- MULDER, J., W.; M.C.M. VAN LOOSDRECHT; C. HELLINGA und R. VAN KAMPEN. 2001. Full scale application of the SHARON process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. WAT. SCI. TECHNOL. **43**: 127-134.
- MYOGA, H.; H. ASANO, Y. NOMUR und H. YOSHIDA. 1991. Effects of immobilisation conditions on the nitrification treatability of entrapped cell reactors using the PVA freezing method. WAT. SCI. TECHNOL. **22**: 207-215.
- N.N. 1992. Rahmen-Abwasser-Verwaltungsvorschrift über Mindestanforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Rahmen –Abwasser VwV) in der Fassung der Bekanntmachung vom 25. November 1992 (GMBL. 1994 S.498) geändert durch Art. 1 Allgemeine VwV vom 31.01.1994 (GMBL. S. 545) Art. 1 Allgemeine VwV vom 05.09.1995, (BAnz. S. 10359) Art. 1 Allgemeine VwV vom 15. 04. 1996, (GMBL S. 463).
- N.N. 1994. Gesetz über Abgaben für das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasser-Abgabengesetz AbwAG). Bekanntmachung der Neufassung vom 3. November 1994 (BGBl. I S. 3370).

- N.N. 1998. Gesetz über Abgaben für das Einleiten von Abwasser in Gewässer (Abwasser-Abgabengesetz AbwAG), geändert durch Artikel 3 des Gesetzes vom 25. August 1998 (BGBl. I S. 2455).
- N.N. 2000. Leben im Extrem. GEO-MAGAZIN 04/2000, 238-240.
- NEHLS, R. 1990. Die Populationsdichte freisuspendierter und schwebstoffgebundener Zellen proteolytischer Bakterien an verschiedenen Standorten. DIPLOMARBEIT, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HAMBURG.
- NEHLS, R. 1995. Charakterisierung der äußeren Membran und der extrazellulären polymeren Substanzen von freisuspendierten und aggregierten Zellen ammoniakoxidierender Bakterien. DISSERTATION, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HAMBURG.
- NEUFELD, R.; J. GREENFIELD; und B. RIEDER. 1986. Temperature, cyanide and phenolic nitrification inhibition. WAT. RES. **20**: 633-642.
- NOWAK, O.; K. SVARDAL und H. KROISS. 1996. The impact on phosphorus deficiency on nitrification – case study of a biological pretreatment plant for rendering plant effluent. WAT. SCI. TECHNOL. **24**: 229-236.
- NOVER, L. 1991. Heat shock response. CRC PRESS INC., 1ST EDN. BOCA RATON, FLORIDA.
- NUSSENZWEIG, A.; P. BURGMAN und G.C. LI 1997. The role of heat shock proteins in thermotolerance. ADV. MOL. CELL BIOL. **19**, 261-285.
- PAEK, K-H. und G.C. WALKER. 1987. *Escherichia coli* dnaK null mutants are inviable at high temperatures. J. BACTERIOL. **169**: 283-290.
- PAINTER, H.A. 1986. Nitrification in the treatment of sewage and waste-waters. In: PROSSER, J.I. (Hrsg.) Nitrification. IRL PRESS, OXFORD, WASHINGTON, S. 185-211.
- PAINTER, H.A. und J.E. LOVELESS. 1983. Effect of temperature and pH-value on the growth-rate and constants of bacteria in the activated sludge process. WAT. RES. **17**: 237-248.
- PAGÁN; R.; S. CONDÓN und F.J. SALA. 1997. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **63**: 3225-3232.
- PAGAN; R.; P. MAÑAS; A. PALOP und F.J. SALA. 1999. Resistance of heat-shocked cells of *Listeria monocytogenes* to mano-sonication and mano-thermo-sonication. LETT. APPL. MICROBIOL. **63**: 3225-3232.
- PARDUE, M.L. 1988. The heat shock response in biology and human disease: a meeting review. GENES DEV. **2**: 783-785.
- PARSELL, D.A. und S. LINDQUIST. 1993. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. ANNU. REV. GENET. **27**: 437-496.
- PINCK, C. 2001. Immunologische Untersuchungen am Schlüsselenzylmsystem der Ammoniak-oxidanten. DISSERTATION, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HAMBURG.
- PINCK, C.; C. COEUR; P. PORTIER und E. BOCK. 2001. Polyclonal antibodies recognizing the AmoB protein of ammonia oxidizers of the β -subclass of the class *Proteobacteria*. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **67**: 118-124.
- PORTER, K.G. und Y.S. FEIG. 1980. The use of DAPI for identifying and counting aquatic microflora. LIMNOL. OCEANOGR. **25**: 943-948.
- PURKHOLD, U.; A. POMMERENING-RÖSER; S. JURETSCHKO; M.C. SCHMIDT; H.-P. KOOPS und M. WAGNER. 2000. Phylogeny of all recognized species of ammonia oxidizers based on comparative 16S rRNA and amoA sequence analysis: implications for molecular diversity surveys. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **66**: 5368-5382.
- QUINLAN, A.V. 1980. The thermal sensitivity of nitrification as a function of the concentration of nitrogen substrate. WAT. RES. **14**: 1501-1507.

- RÄSÄNEN, L.A.; A.M. ELVÄNG; J. JANSSON und K. LINDSTRÖM. 2001. Effect of heat stress on cell activity and cell morphology on the tropical rhizobium, *Sinorhizobium arboris*. FEMS MICROBIOL. ECOL. **34**: 267-278.
- RATKOWSKY, D.A.; J. OLLEY; T.A. McMEEKIN und A. BALL. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. J. BACTERIOL. **149**: 1-5.
- RAUNKJAER, K., T. HVITED-JACOBSEN und P. H. NIELSEN. 1994. Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. WAT. RES., **28**: 251-262.
- RIM, J.M. und D.J. HAN. 2000. Process development for nitrogen removal of swine waste. WAT. SCI. TECHNOL. **44**: 239-246.
- RITOSSA, F. 1962. A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in *Drosophila*. EXPERIENTIA **18**: 571-573.
- RODRIGUEZ, G.G.; D. PHIPPS; K. ISHIGURO und H.K. RIDGWAY 1992. Use of a fluorescent redox probe for direct visualization of actively respiring bacteria. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **58**: 1801-1808.
- ROLS, J.L.; M. MAURET; H. RAHMANI; K.M. NGUYEN; B. CAPDEVILLE; J.C. CORNIER und A. DEGUIN. 1994. Population dynamics and nitrite build-up in activated sludge and biofilm processes for nitrogen removal. WAT. SCI. TECHNOL. **29**: 43-51.
- ROSTRON, W.M.; D.S. STUCKEY und A.A. YOUNG. 2001. Nitrification of high strength ammonia wastewaters: comparative study of immobilisation media. WAT. RES. **35**: 1169-1178.
- ROTH, W.G.; S.E. PORTER; M.P. LECKIE; B.E. PORTER und D.N. DIETZLER. 1985. Restoration of cell volume and the reversal of carbohydrate transport and growth inhibition of osmotically upshocked *Escherichia coli*. BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMMUN. **126**: 442-449.
- ROWAN, N.J. 1999. Evidence that inimical food-preservation barriers alter microbial resistance, cell morphology and virulence. TRENDS FOOD SCI. TECHNOL. **10**: 261-270.
- ROWAN, N.J. und J.G. ANDERSON. 1998. Effects of above-optimum temperature and cell morphology on thermotolerance of *Listeria monocytogenes* cells suspended in bovine milk. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **64**: 2065-2071.
- RUZAL, S.M. und C. SANCHEZ-RIVAS. 1994. Physiological and genetic characterization of the osmotic stress response in *Bacillus subtilis*. CAN. J. MICROBIOL. **40**: 140-144.
- SANDERS, B.M. 1993. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective. CRIT. REV. TOXICOL., **23**: 49-75.
- SCHALLENBERG, M.; J. KALFF und J.B. RASMUSSEN. 1989. Solutions to problems in enumerating sediment bacteria by direct counts. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **55**: 1214-1219.
- SCHAULE, G. 1992. Bakterielle Adhäsion und Aggregation auf inerten Oberflächen: Ihre Rolle bei der Bildung von Biofilmen auf Umkehrosmose-Membranen. DISSERTATION, FACHBEREICH BIOLOGIE; EBERHARDT-KARLS-UNIVERSITÄT TÜBINGEN.
- SCHLESINGER M.J. 1986. Heat shock proteins: the search for functions. J. CELL BIOL. **103**: 321-325.
- SCHLEYER M.; R. SCHMID und E.P. BAKKER 1993. Transient, specific and extremely rapid release of osmolytes from growing cells of *Escherichia coli* K-12 exposed to hypoosmotic shock. ARCH. MICROBIOL. **160**: 424-431.
- SCHMIDT, E.L. 1974. Quantitative autecological study of microorganisms in soil by immunofluorescence. SOIL SCI. **118**: 141-149.
- SCHMIDT, I. 1997. Anaerobe Ammoniakoxidation von *Nitrosomonas europaea*. DISSERTATION, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HAMBURG.

- SCHMIDT, E.L. und L.W. BELSER. 1965. Nitrifying bacteria. In: C.A. BLACK (Hrsg.) Methods of soil analysis. AMERICAN SOCIETY OF AGRONOMY, MADISON, WISCONSIN, S. 1027-1042.
- SCHRAMM, A.; L.H. LARSEN; N. P. REVSBECH; N.B. RAMSING; R. AMANN und K.H. SCHLEIFER. 1996. Structure and function of a nitrifying biofilm as determined by *in situ* hybridisation and the use of microelectrodes APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **62**: 4041-4047.
- SCHRAMM, A.; D. DEBEER; H. VAN DE HEUVEL; S. OTTENGRAF und R. AMANN. 1996. *In situ* structure/function studies in wastewater treatment systems. WAT. SCI. TECHNOL. **37**: 413-416.
- SEVERIN, E.; J. STELLMACH und H.-M. NACHTIGAL 1985. Fluorimetric assay of redox activity in cells. ANAL. CHIM. ACTA. **170**: 341-346.
- SHARMA, B. und R.C. AHLERT. 1977. Nitrification and nitrogen removal. WAT. RES. **11**: 897-925.
- SIENCIEWICZ, N.; T.E.J. BUULTJENS; N.A. WHITE und J.W. PALFREYMAN. 1997. *Serpula lacrymans* and the heat shock response. INT. BIODET. BIODEGR. **39**: 217-224.
- SI-SALAH, A.; S.-U. GEISSEN und A. VOGELPOHL. 1991. Einflussparameter auf die biologische Nitrifikation in Festbetteaktoren. WLB WASSER, LUFT UND BODEN. **9**: 60-64.
- SÖLTER, T. und H. ORTH. 1998. Stickstoffentfernung über Nitrit aus Trübwässern. KORRESPONDENZ ABWASSER **45**: 1122-1131.
- SOWITZKI, S.C. 1986. Verteilung und Stoffwechselaktivität Ammoniak oxidierender Bakterien im Wasser und Sediment verschiedener Standorte. DIPLOMARBEIT, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HAMBURG.
- SOWITZKI, S.C. 1992. Populationsdynamik nitrifizierender Bakterien in der Elbe bei Hamburg sowie serologische Spezifität ihrer antigenen Determinanten für die Zellzahlbestimmung mit der Immunofluoreszenz-Technik. DISSERTATION, FACHBEREICH BIOLOGIE, UNIVERSITÄT HAMBURG.
- SPECTOR, T. 1978. Refinement of the coomassie blue method of protein quantitation. ANAL. BIOCHEM. **86**: 142-146.
- SPIECK, E. 2002. Persönliche Mitteilung
- SQUIRES C.L.; S. PEDERSEN; B.M. ROSS und C. SQUIRES. 1991. ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. J. BACTERIOL. **173**: 4254-4262.
- STETTER, K.O. 1990. Hyperthermophilic prokaryotes. FEMS MICROBIOL. REV. **18**: 149-158.
- STEIN, L.Y.; D.J. ARP und M.R. HYMAN. 1997. Regulation of the synthesis and activity of ammonia monooxygenase in *Nitrosomonas europaea* by altering pH to affect NH₃ availability. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **63**: 4588-4592.
- STROUS, M.; J. FUERST; E. KRAMER; S. LONGEMAN; G. MUYZER; K. VAN DE PAS; R. WEBB; J.G. KUENEN und M.S.M. JETTEN. 1999. Missing lithotroph identified as new planctomycete. NATURE **400**: 446-449.
- STÜVEN, R. und E. BOCK. 2001. Nitrification and denitrification as a source for NO and NO₂ production in high-strength wastewater. WAT. RES. **35**: 1905-1914.
- SZEWZYK, U.; R. SZEWZYK; W. MANZ und K.-H. SCHLEIFER. 2000. Microbiological safety of drinking water. ANNU. REV. MICROBIOL. **54**: 81-127.
- TAGUCHI, H.; H. YAMAGUCHI, T. YAMAMOTO und S. KAMIYA. 1996. Immunocytochemical localization of 60-kDa heat shock protein in *Vibrio cholerae*. ZENTRALBL. BAKTERIOL. **284**: 496-500.
- TESKE, A.; E. ALM; J.M. REGAN; S. TOZE; B.E. RITTMANN und D. STAHL. 1994. Evolutionary relationships among ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria. J. BACTERIOL. **176**: 6623-6630.

- TILLY, K.; N. MCKITTRICK; M. ZYLICZ und C. GEORGOPOULOS. 1983. The dnaK protein modulates the heat-shock response of *Escherichia coli*. CELL **34**: 641-646.
- TISSIÈRES, A.; H.K. MITCHELL und U.M. TRACY. 1974 Protein synthesis in salivary glands of *Drosophila melanogaster*: relation to chromosome puffs. J. MOL. BIOL. **85**: 389-398.
- TOWBIN, H.; T. STAHELIN und J. GORDON. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA. **76**: 4350-4354.
- VANBOGELEN, R.; P.M. KELLEY und F.C. NEIDHARDT. 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. J. BACTERIOL. **169**: 26-32.
- VAN DONGEN, U.; M.S.M. JETTEN und M.C.M. LOOSDRECHT. 2001. The SHARON®-Anammox® process for treatment of ammonium rich wastewater. WAT. SCI. TECHNOL. **44**: 153-160.
- VAN KEMPEN, R.; J.W. MULDER; C.A. UIJTERLINDE und M.C.M. LOOSDRECHT. 2001. Overview: full scale experience of the SHARON® process for treatment of rejection water of digested sludge dewatering. WAT. SCI. TECHNOL. **44**: 145-152.
- VAN UHDEN, N. 1984. Temperature profiles of yeasts. ADV. MICROBIAL PHYSIOL. **25**: 195-251.
- VARELA, P. und C.A. JEREZ. 1992. Identification and characterization of GroEL and DnaK homologues in *Thiobacillus ferrooxidans*. FEMS MICROBIOL ECOL. **98**: 149-154.
- VÖLSCH, A.; W.F. NADER; H.K. GEISS; H.-G. SONNTAG und C. BIRR. 1990. Test zur Bestimmung der Aktivität nitrifizierender Bakterien im Belebtschlamm. GWF-WASSER/ABWASSER **131**: 301-306.
- VREDENBREGT, L.H.J.; K. NIELSEN; A.A. POTMA; G.H. KRISTENSEN und C. SUND. 1997. Fluid bed biological nitrification and denitrification in high salinity wastewater. WAT. SCI. TECH. **36**: 93-100.
- WARD, B.B. 1982. Oceanic distribution of ammonia-oxidizing bacteria determined by immunofluorescence assay. J. MAR. RES. **40**: 1155-1172.
- WARD, B.B. und A.F. CARLUCCI. 1985. Marine ammonia- and nitrite-oxidizing bacteria: serological diversity determined by immunofluorescent assay. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **50**: 194-201.
- WASSBERG, G. und L. RECKSEN. 2001. Magnesium-Ammonium-Fosfatfällning- Persmosseverket, Nacka Sverige. NORDISKE SEMINAR OG ARBEIDSRAPPORTER. NORDISK MINISTERRAD, 601, 150.
- WATSON, S.W. 1971. Reisolation of *Nitrosospira briensis* S. WINOGRADSKY AND H. WINOGRADSKY, 1933. ARCH. MICROBIOL. **75**: 179-188.
- WATSON, K. 1990. Microbial stress proteins. ADV. MICROBIAL PHYSIOL. **31**: 183-223.
- WATSON, S.W.; E. BOCK, H. HARMS; H.-P. KOOPS und A.B. HOOPER. 1989. Nitrifying bacteria. In: STALEY J.T.; M.P. BRYANT; N. PFENNIG (Hrsg.) Bergey's manual of systematic bacteriology. Vol. 3, WILLIAMS UND WILKENS CO., BALTIMORE MD, S. 1808-1834.
- WEBER, K. und M. OSBORN. 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl-sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. BIOL. CHEM. **244**: 4406-4412.
- WHITAKER, R.D. und C. BATT. 1991. Characterization of the heat shock response in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. APPL. ENVIRON. MICROBIOL. **57**: 1408-1412.
- WIJFFELS, R. und J. TAMPER. 1989. Performance of growing *Nitrosomonas europaea* cells immobilised in k-carrageenan. APPL. MICROBIOL. BIOTECHNOL. **32**: 108-112.

- WIJFFELS, R.; G. ENGLUND; J. HUNIK; E.J.T.M. LEENAN; A. BAKKETUN; A. GUNTHER; J.M. OBON DE CASTRO und J. TAMPER. 1995. Effects of diffusion limitation on immobilized nitrifying micro-organisms at low temperatures. *BIOTECHNOL. BIOENG.* **45**: 1-9.
- WILLERS, H.C.; P.J.L. DERIKX; P.J.W. TEN HAVE und T.K. VIJN. 1998. Nitrification in animal slurries at high temperatures. *BIORESOURCE TECHNOL.* **64**: 47-54.
- WINOGRADSKYI, S. 1906. Die Nitrifikation. In: G. LAFAR Lafars Handbuch der technischen Mykologie, **Bd. 3**: 132.
- WOESE, C.R.; W.G WEISBURG; B.J. PASTER; C.M. HAHN; R.S. TANNER; N.R. KRIEG; H.-P. KOOPS; H. HARMS und E. STACKEBRANDT. 1984. The phylogeny of purple bacteria, the beta subdivision. *SYST. APPL. MICROBIOL.* **5**: 327-336.
- WOESE, C.R.; W.G WEISBURG; C.M. HAHN; B.J. PASTER; L.B. ZABLEN; B.J. LEWIS; T.J. MACKE; W. LUDWIG und E. STACKEBRANDT. 1985. The phylogeny of purple bacteria, the gamma subdivision. *SYST. APPL. MICROBIOL.* **6**: 25-33.
- WOOD, P.M. 1988. Monooxygenase and free radical mechanisms for biological ammonia oxidation. In: J.A. COLE und S. FERGUSON (Hrsg.) *The Nitrogen and sulfur cycles*. Cambridge University Press, Cambridge.
- WOOD, A.P. und D.P. KELLY. 1993. Reclassification of *Thiobacillus thyasiris* as *Thiomicrospira thyasirae* comb. nov., an organism exhibiting pleomorphism in response to environmental conditions. *BIORESOURCE TECHNOL.* **64**: 47-54.
- YOSHIOKA, T.; H. TERAJ und Y. SAIJO. 1982. Growth kinetic studies of nitrifying bacteria by the immunofluorescence counting method. *J. GEN. APPL. MICROBIOL.* **48**: 1214-1220.
- YATEVIN, M.B. ; K.M. SMITH und F.L. SIEGEL. 1986. Translocation of nascent non-signal sequence protein in heated *Escherichia coli*. *J. BIOL. CHEM.* **261**: 8070-8075.
- YURA, T. und N. NAKAHIGASHI. 1999. Regulation of the heat-shock response. *CURR. OPIN. MICROBIOL.* **2**: 153-158.
- YURA, T.; M. KANEMORI und M.T. MORITA. 2000. The heat shock response: regulation and function. In: STORZ, G. und R. HENGGE-ARONIS (Hrsg.): *Bacterial stress responses*, ASM PRESS, WASHINGTON DC, S. 3-18.
- XAVIER, I.J. und S.C. INGHAM. 1997. Increased D-values for *Salmonella enteritidis* following heat shock. *J. FOOD. PROTEC.* **60**: 181-184.
- ZAMBON, J.J.; P.S. HUBER; A.E. MEYER; J. SLOTS; M.S. FORMALIK und R.E. BAIER. 1984. *In situ* identification of bacterial species in marine microfouling films by using an immunofluorescent technique. *APPL. ENVIRON. MICROBIOL.* **48**: 1214-1220.
- ZART, D. 1997. Entwicklung eines Verfahrens zur Entfernung von Ammonium-Stickstoff mit Hilfe einer Reinkultur von *Nitrosomonas eutropha*. DISSERTATION, FACHBEREICH BIOLOGIE UNIVERSITÄT HAMBURG.
- ZEILSTRA-RYALLS, J.; O. FAYET; C. GEORGOPOULOS. 1991. The universally conserved GroE (Hsp60) chaperonins. *ANNU. REV. MICROBIOL.* **45**: 301-325.
- ZHOU, Y.N.; N. KUSUKAWA; J.W. ERICKSON; C.A. GROSS und T. YURA. 1988. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor sigma 32. *J. BACTERIOL.* **170**: 3640-3649.
- ZOLKIEWSKI, M. 1999. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ and GrpE in suppressing protein aggregation. *J. BIOL. CHEM.* **274**: 28083-28086.

Abkürzungsverzeichnis

A.	Aqua
Abb.	Abbildung
AbwAG	Abwasserabgabengesetz
ADP	Adenosindiphosphat
AMO	Ammoniakmonooxygenase
AmoA	A-Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase
<i>amoA</i>	Gen der AmoA
AmoB	B-Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase
<i>amoB</i>	Gen der AmoB
AmoC	C-Untereinheit der Ammoniakmonooxygenase
<i>amoC</i>	Gen der AmoC
Aqua deion.	deionisiertes Wasser
Aqua deion.(MilliQ)	mit einer MilliQ-Wasseraufbereitungsanlage der Firma Millipore aufgereinigtes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
BMBF	Bundesministerium für Bildung und Forschung
BSA	Rinderserumalbumin
CB	Carbonat Bicarbonat
CTC	5-Cyano-2,3-di-4-tolyl-tetrazoliumchlorid
DAPI	4',6'-Diamidino-2-phenylindol
D ₁₀ -Wert	Dezimale Reduktionszeit (Zeitintervall zur Reduktion der Lebendzellzahl um 90 %)
<i>E.</i>	<i>Escherichia</i>
EPS	Extrazelluläre, polymere Substanzen
EGW	Einwohnergleichwerte
EU	Europäische Union
Fa.	Firma
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde
HAO	Hydroxylaminooxidoreduktase
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-2-Ethansulfonsäure
Hrsg.	Herausgeber
HSP	Hitzeschockprotein
IF	Immunofluoreszenz
kDa	Kilodalton
RahmenAbwVwV	Rahmen-Abwasserverwaltungsvorschrift
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHARON	<u>S</u> ingle reactor system for <u>H</u> igh <u>A</u> ctivity ammonia <u>R</u> emoval <u>O</u> ver <u>N</u> i-
trite	
M	Molarität
m	milli-

MPN	most probable number (wahrscheinlichste Zellzahl)
μ	mikro-
min	Minute
M _r	relatives Molekulargewicht
N	Normalität
<i>N.</i>	<i>Nitrosomonas</i>
PAGE	<u>P</u> oly <u>a</u> crylamidgele <u>l</u> ektrophorese
PBS	phosphate buffered saline
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ₃ O ⁺ -Ionenkonzentration
ppm	parts per million
smHSPs	small HSPs = Kleine Hitzeschockproteine
spec.	species
T	Temperatur
t	Zeit
Tab.	Tabelle
TFLCR	time for the first log cycle reduction = Zeitintervall zur Reduktion der Lebendzellzahl um die erste Zehnerpotenz
T _{max}	Temperaturmaximum
T _{min}	Temperaturminimum
T _{opt}	Temperaturoptimum
Tris	Tris (hydroxymethyl-)aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
VT	Versuchstag
v/v	Volumen pro Volumen

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juni 1995 bis zum März 2002 in der Abteilung für Mikrobiologie des Instituts für Allgemeine Botanik der Universität Hamburg angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. E. Bock für die offizielle Betreuung und das Interesse an meiner Arbeit.

Herrn Dr. H. Harms danke ich für die interessante Themenstellung, seine unermüdliche Unterstützung und seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft.

Herrn Dipl.-Ing. C. Günner danke ich für die gute Zusammenarbeit im Rahmen des „Zentrat“-Projektes.

Herrn Dr. J. Bräutigam und allen Mitarbeitern der Firma Bräutigam Abwassertechnik danke ich für die mir zur Verfügung gestellten Betriebsdaten der Pilotanlage und der Unterstützung bei den Probenahmen.

Herrn Dr. B. Ashraf danke ich für das Überlassen seiner Antikörper zum Nachweis von Stressproteinen.

Herrn Dr. R. Werner danke ich für die Möglichkeit der Nutzung des Programms „ScanPack II“ und die Einweisung in seine Bedienung.

Den Mitgliedern meiner Arbeitsgruppe danke ich für das nette Laborklima und die vielen Tipps zur Lösung der kleinen und großen Laborprobleme. Insbesondere Bärbel Bork sei für die jahrelange freundschaftliche Zusammenarbeit gedankt.

Henrik Gabriel gilt ein herzliches Dankeschön für seine freundschaftliche Unterstützung und seine unermüdliche Hilfsbereitschaft bei allen Computerproblemen.

Meinen Kollegen aus der Arbeitsgruppe Sand danke ich dafür, dass sie mich in den letzten Jahren in ihre Mitte aufgenommen haben. Insbesondere Kerstin Kinzler gilt ein herzlicher Dank für ihre ständige Hilfsbereitschaft, ihr Verständnis und die aufmunternden Worte und nicht zuletzt für das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Allen Mitarbeitern der Abteilung Mikrobiologie sei nochmals für das gutes Arbeitsklima gedankt.

Meinen Eltern danke ich besonders herzlich für die jahrelange Unterstützung meines Studiums und für die vielen Dinge, die sie mir außerhalb der Uni abgenommen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt Andreas, der auch in schwierigen Zeiten immer für mich da war und ohne den diese Arbeit nicht vollendet worden wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten:	Simone Wiegel, geb. Rüther geb. 1970 in Lüneburg Familienstand: verheiratet seit dem 22. 05. 1998 Ehemann: Andreas Wiegel
Schulausbildung:	1976-1980 Grundschule Salzhausen 1980-1982 Orientierungsstufe Salzhausen 1982-1989 Gymnasium Winsen/Luhe mit Abschluss Abitur
Hochschulstudium:	1989-1995 Studium der Biologie an der Universität Hamburg Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Botanik, Genetik/Molekularbiologie 06/94-03/95 Diplomarbeit im Hauptfach Mikrobiologie zum Thema „Verteilung von mikrobieller Aktivität und Exoploysac- chariden bei der mechanischen Trennung von Hafen- Baggergut in der METHA III-Anlage.“ seit 1995 Promotion an der Universität Hamburg, Fachbereich Biologie, Abteilung Mikrobiologie zum Thema: „Einfluss der Temperatur auf die Ammoniakoxidantenpopulation eines Biofilmreaktors und auf Reinkulturen von <i>Nitroso- monas eutropha</i> “
Berufspraxis:	09/91-03/94 Verschiedene Anstellungen als studentische Hilfskraft in Forschungsprojekten und in der Lehre 06/95-01/96 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Hamburg im Rahmen des Forschungsprojektes: „Entkeimung des Klärwerks Stellingener Moor“ 02/96-09/97 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Hamburg im Rahmen des BMBF-Forschungsprojektes: „Entwick- lung eines Verfahrens zur biologischen Stickstoffelimina- tion aus dem Zentrat der Faulschlammentwässerung“ 03/98-10/98 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Hamburg im Rahmen des Forschungsprojektes: „Untersuchungen zur Hemmung der Nitritoxidation“ 11/98-12/98 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Universität Hamburg im Rahmen des Forschungsprojektes: „METHA III“ 01/00-10/00 Freie Mitarbeiterin der Wassergütestelle Elbe (Hamburg), Erstellung eines Gutachtens zum Thema: „Synthetische Moschus-Duftstoffe in der Elbe“