

Abstract

Im Deutschen Wasserrecht sind für den Eintrag von Stickstoffverbindungen in Oberflächengewässer Grenzwerte festgelegt, die in den letzten zehn Jahren mehrfach verschärft wurden. Dies machte in vielen Kläranlagen Maßnahmen zur Verbesserung der Stickstoffelimination erforderlich. Bei Kläranlagen mit Schlammfaulungsstufen fällt bei der Faulschlammentwässerung ein Abwasser mit sehr hohen Ammoniumkonzentrationen an. Durch eine getrennte Stickstoffelimination aus diesem Teilstrom kann die Stickstoffeliminationsleistung eines Klärwerks insgesamt verbessert werden. Im Hamburger Klärwerksverbund Köhlbrandhöft/Dradenau wird die Faulschlammentwässerung mit Dampfzentrifugen durchgeführt. Das erhaltene Abwasser wird als Zentrat bezeichnet. Es ist charakterisiert durch eine Ammoniumkonzentration von 75-120 mM und eine Temperatur von 50-55 °C.

Zur separaten Behandlung von Zentrat wurden durch die Hamburger Stadtentwässerung Versuche zur biologischen Stickstoffelimination in einer halbtechnischen Pilotanlage durchgeführt, die aus einem neuentwickelten Biofilmreaktor zur Nitrifikation verbunden mit einem konventionellen Belebtschlammreaktor zur Denitrifikation bestand. Die Nitrifikation wurde in einem Abstromfließbettreaktor durchgeführt. Als Trägermaterial diente kugelförmiges, geschäumtes Polystyrol. Im Nitrifikationsreaktor der Pilotanlage traten große Temperaturunterschiede auf. Die Reaktortemperatur betrug in den Wintermonaten im Mittel 30 °C – 35 °C, während sie bei hochsommerlichen Außentemperaturen auf 37 °C – 42 °C stieg. Die Umsatzleistung der Anlage wurde durch unterschiedliche Betriebstemperaturen nicht beeinflusst und betrug 8-14 kg NO₂⁻-N/m³ Trägermaterial x Tag.

Im Labor wurde parallel zum Reaktorbetrieb das Nitrifikationspotential von Biofilmmaterial unter Standardbedingungen ermittelt. Das Nitrifikationspotential wurde stark von der Betriebstemperatur im Reaktor beeinflusst. Bei einer Reaktortemperatur von 30 °C – 35 °C war das Nitrifikationspotential 2-4fach höher als die Umsatzleistung der Anlage. Im Biofilm war somit eine Leistungsreserve vorhanden. Bei 37 °C – 42 °C Reaktortemperatur war das Nitrifikationspotential hingegen stark reduziert. Bei diesen Temperaturen war keine Leistungsreserve mehr vorhanden. Das Aktivitätsoptimum der Biofilmpopulation wurde in Laboransätzen mit 28 °C – 33 °C bestimmt. Bei Temperaturen oberhalb von 33 °C war die Nitritbildung im Versuchsverlauf zunehmend herabgesetzt, bei 37 °C und 40 °C war die Aktivität nach 4 bzw. 2 Tagen vollständig gehemmt.

Eine Untersuchung der Zusammensetzung der Ammoniakoxidantenpopulation im Biofilm belegte, dass durch die Betriebsbedingungen keine thermophilen bzw. thermotoleranten Stämme Ammoniak oxidierender Bakterien selektiert worden waren. Mit Hilfe der Immunofluoreszenzmethode wurden neun mesophile 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. Daher wurde *Nitrosomonas eutropha* Nm 14 für anschließende Laboruntersuchungen ausgewählt.

Die Versuche mit den Reinkulturen von *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) zeigten, dass der Einfluss superoptimaler Temperaturen auf den Stoffwechsel dieses Stammes sowohl von der Höhe der Temperatur als auch von ihrer Einwirkungsdauer abhängig war.

In Kurzzeitversuchen von acht Stunden Dauer wurden Nitritbildung, Proteinsynthese und Vermehrungsrate durch superoptimale Temperaturen gegenüber einer Kontrolle aus dem optimalen Wachstumsbereich zunächst erhöht. Bei längerer Inkubation wurden diese Prozesse zunehmend unterdrückt. Temperaturen von 37 °C – 43 °C führten zu einer vollständigen Hemmung. Dabei wurden Wachstum und Vermehrung jeweils bereits nach kürzerer Inkubationszeit gehemmt als die Aktivität der Zellen. Die Substratoxidation führte in einem begrenzten Zeitabschnitt somit nicht zu einer messbaren Proteinbiosynthese, was auf eine Entkopplung der Energiegewinnung vom Wachstum hinwies.

Temperaturen von 37 °C - 43 °C waren für *Nitrosomonas eutropha* letal. Die Absterbekurven waren zu Beginn der Inkubation durch eine sogenannte Schulter charakterisiert. Als Schulter war der Zeitabschnitt vom Inkubationsbeginn bis zum Eintritt der Kultur in die exponentielle Absterbephase definiert. Im Schulterbereich blieb die Zellzahl konstant bzw. nahm mit deutlich geringerer Rate ab als in der Absterbephase. Die Zellen waren somit auch bei letalen Temperaturen für eine begrenzte Zeit überlebensfähig. Bei 38 °C war die Schulter besonders stark ausgeprägt. Dieses Ergebnis lieferte somit einen starken Hinweis auf die Induktion von Reparatursystemen bei dieser Temperatur.

Wichtige zelluläre Reparatursysteme werden im Rahmen einer organismusspezifischen Stressantwort induziert. Dazu zählen vor allem die Stressproteine. Auch *Nitrosomonas eutropha* (Nm 14) zeigte bei superoptimalen Temperaturen eine typische Stressantwort mit einer Bildung von Hitzeshockproteinen (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. HSP70-Chaperone sind hoch konservierte Stressproteine, die vor allem die Aggregatbildung neusynthetisierter und denaturierter Proteine verhindern. Das 60 kDa-Protein konnte im Immunoblot den Chaperoninen zugeordnet und als HSP60 identifiziert werden. Chaperonine sind aus oligomeren Strukturen zusammengesetzt und stellen ein vom Zytosol abgeschlossenes Kompartiment für die Faltung von Proteinen zur Verfügung.

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 wurde nach 44 Stunden Inkubation erreicht. Bei 40 °C erfolgte die Bildung von HSP60 in den ersten zwei Stunden mit höherer Geschwindigkeit als bei 38 °C. Dies Ergebnis belegte, dass die Hitzeshockantwort eine Notfallreaktion für die Zellen darstellte.

Unter Hitzestress wurde eine Abnahme des Anteils der Ammoniakmonooxygenase (AMO), einem zentralen Enzym der Ammoniakoxidation am Gesamtproteingehalt der Zellen gemessen. Dies könnte die Folge einer thermischen Denaturierung des Enzyms und damit eine Ursache für die Hemmung der Nitritbildung sein bei Temperaturen von 37–42 °C sein.