

## Schlussbericht

In situ-Aktivitätsmessungen und Populationsanalysen mittels Mikroelektroden und molekularer Techniken in einem nitrifizierenden Wirbelbettreaktor mit Kalk als Trägermaterial (Deutsch-israelische Kooperation)

02WA0251

Dr. Armin Gieseke, Dr. Dirk de Beer

Mikrosensor-Forschungsgruppe  
Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie, Bremen

*Zuwendungsempfänger:*

Max-Planck-Gesellschaft zur Förderung der Wissenschaften e.V., vertreten durch den geschäftsführenden Direktor des MPI für marine Mikrobiologie, Bremen

*Förderkennzeichen:*

02WA0251

*Vorhabenbezeichnung:*

In situ-Aktivitätsmessungen und Populationsanalysen mittels Mikroelektroden und molekularer Techniken in einem nitrifizierenden Wirbelbettreaktor mit Kalk als Trägermaterial (Deutsch-israelische Kooperation)

*Laufzeit des Vorhabens:*

01.06.2002 – 31.05.2004

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 02WA0215 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

## I. Kurzdarstellung

### 1. Aufgabenstellung

Gegenstand dieses Projektes war die mikrobiologische und physiko-chemische Charakterisierung der Prozesse in einem neuartigen Nitrifikations-Reaktorsystem, das bei niedrigem pH arbeitet. Die Entwicklung und Optimierung dieses Reaktorsystems zur Behandlung von Abwässern bei niedrigem pH war Aufgabe unseres israelischen Kooperationspartners Prof. Dr. Green (Technion, Haifa, BMBF-Projekt WA0101 GR1764). Eine erfolgreiche Optimierung setzt das Verständnis der physiko-chemischen und mikrobiologischen Prozesse voraus. Unsere Aufgabe im Rahmen dieses Projektes war die Charakterisierung der

- Mikroumgebungen innerhalb der Biofilme *in situ*,
- lokalen Umsatzraten in den Biofilmen *in situ*, und
- Struktur der mikrobiellen Gemeinschaften (Populationszusammensetzung)

Die Erkenntnisse aus diesem Projekt lieferten nicht nur wichtige Anhaltspunkte für die laufende Optimierung des technischen Prozesses, sondern gaben darüber hinaus wissenschaftliche Einblicke in das ungewöhnliche mikrobiologische Phänomen der Nitrifikation bei niedrigem pH.

### 2. Voraussetzungen

Das hier dargestellte Projekt stand in Verbindung mit dem BMBF-Projekt WA0101 GR1764 von Prof. Dr. Green (Technion, Haifa, Israel). Ihre Aufgabe war es, einen neuen Nitrifikationsreaktor zur Aufbereitung von Abwässern mit/bei niedrigem pH-Wert zu entwerfen und zu optimieren. Die AG Green am Technion in Haifa brachte ihre langjährige Expertise auf dem Gebiet der Entwicklung von Bioreaktoren zur Abwasserreinigung und die konkreten Ideen zur Realisierung einer Nitrifikation bei niedrigem pH in die Zusammenarbeit ein. Für eine erfolgreiche Optimierung eines solchen technischen Prozesses müssen jedoch die lokalen physiko-chemischen und mikrobiologischen Prozesse verstanden werden.

Daher wurde in den hier dargestellten Arbeiten die Mikrobiologie der nitrifizierende Biofilme und die feinskaligen Prozesse im Biofilm eingehend untersucht. Über molekularbiologische Methoden (Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung, FISH; Klonierung und Sequenzierung sowie phylogenetische Analyse) wurden (die zumeist nicht kultivierbaren) Nitrifikanten identifiziert. Mit räumlich hochauflösenden Mikrosensoren (für O<sub>2</sub>, Ca<sup>2+</sup>, pH) wurden lokale Mikroumgebungen, Pufferprozesse und lokale Umsetzungen in den Biofilmen gemessen. Das Knowhow und die Infrastruktur für die Nutzung der genannten Werkzeuge zur Aufklärung der Aktivität und Struktur von Bakteriengemeinschaften *in situ* (d.h. kultivierungsunabhängig) besteht am Max-Planck-Institut für marine Mikrobiologie in Bremen und konnte im Rahmen der Kooperation mit den Partnern am Technion erfolgreich genutzt werden um die Nitrifikation bei niedrigem pH aufzuklären.

### 3. Planung und Ablauf

Die Planung des Projekts mit einer Laufzeit von 24 Monaten entspricht der Darstellung in der nachfolgenden Tabelle und dem Schema.

Tabelle 1. Planung und Ablauf des Projektes.

Monat 1-3	<i>Lernphase.</i> Molekulare und Mikrosensor-Techniken. Erste Tests der Techniken an Proben aus Haifa.
4-5	<i>Mikrosensormessungen in Haifa.</i> Charakterisierung des Mikromilieus und Messung lokaler Umsatzraten. Mikroprofile der Parameter Sauerstoff, pH, Ammonium, Nitrit, Nitrat und Calcium. Probennahme und Transport der Proben nach Bremen.
6-7	<i>Auswertung der Daten.</i>
8-12	<i>Molekularbiologische Analyse</i> der Bakteriengemeinschaft (rRNS-Zyklus: Klonierung, Sequenzierung, phylogenetische Analyse, ggf. Sondendesign, FISH mit (neuen) Sonden).
13-14	<i>Mikrosensormessungen in Haifa.</i> Experimentelle Studien, in situ-Charakterisierung von Populationen (pH-Resistenz, Substrat-Affinität, Wachstumsraten). Mikroprofile der Parameter Sauerstoff, pH, Ammonium, Nitrit, Nitrat, Kohlendioxid und Calcium.
16-24	<i>Abschlussarbeiten.</i> Datenauswertung, ergänzende Experimente, Anfertigung der Veröffentlichungen.

MPI	1	4	7	10	13	16	19	22	
Lernphase	■								
in situ-Messungen		■		■	■			■	
molekulare Arbeiten			■				■		
Datenauswertung			■			■			
Ergänzende Messungen								■	
Veröffentlichungen								■	

Zentraler Bestandteil der Projektplanung war die Durchführung der Mikrosensormessungen in Form mehrerer Messkampagnen. Da auch ein kurzer Transport lebender Biofilmen ausgesprochen problematisch ist, wurden die funktionellen Untersuchungen direkt in Haifa bzw. einleitend anhand von Material aus verkleinerten Modellreaktoren in Bremen durchgeführt. Insgesamt kam es zu den geplanten Messkampagnen. Am Ende dieser Messkampagnen wurde jeweils Probenmaterial gewonnen für die molekularebiologische Charakterisierung der mikrobiellen Gemeinschaft. Diese Arbeiten, zusammen mit der Datenauswertung, wurden jeweils in den Zeiträumen zwischen den Messkampagnen vorgenommen.

Die Durchführung der Mikrosensormessungen an Biofilmen direkt auf Trägerpartikeln erfolgte in Durchfluskkammern (Gieseke *et al.*, 2002; Gieseke *et al.*, 2003). In den Vorexperimenten konnte eine geeignete Konfiguration gefunden werden, in der die Partikel auf Miniaturträgerelementen aus Glas in den laminaren Strom des Mediums gebracht wurden. Eine solche Konfiguration erlaubt gegenüber anderen Methoden einen weitgehend ungehinderten diffusiven Substrattransport unter kontrollierten Bedingungen in den Biofilm hinein und kommt somit den Reaktorbedingungen eines Flüssigbetts nahe. In ersten Studien zur Struktur der Bakteriengemeinschaft mit der Fluoreszenz-*in situ*-Hybridisierung (FISH) konnten Erfahrungen mit dem Probenmaterial auf Kalkpartikeln und Suspensionen gesammelt und die Präparationsprotokolle optimiert werden.

Während der ersten Messkampagne wurden dann Messungen unter Bedingungen vorgenommen, die exakt dem Milieu im Reaktorsystem entsprachen. Dazu erfolgte

eine Inkubation der Partikel in Reaktormedium über einen Bypass in der Reaktorzirkulation.

In der zweiten Messkampagne war durch den Betrieb mit längeren Retentionszeiten Material mit deutlich höherer Aktivität verfügbar und die *in situ*-Aktivitätsuntersuchungen wurden ausgeweitet. Parallel wurde umfangreiches Probenmaterial für die molekularbiologischen Untersuchungen genommen (FISH, Klonierungsansätze), die in der Folge in Bremen, parallel mit der Meßdatenauswertung, durchgeführt wurden. Dabei bezog sich der Hauptaufwand auf die Optimierung der Extraktion und Amplifikation von DNS aus den Biofilmpollen des Kalkreaktors mit verschiedenen Methoden und Protokollen. Anfängliche Probleme wurden v.a. auf die Existenz von Calciumionen im Extrakt zurückgeführt und konnten abschließend erfolgreich gelöst werden.

Da die Hypothesen der Existenz pH-neutraler Mikroumgebungen wie auch der acidophiler Nitrifikanten falsifiziert wurden, war die Untersuchung des Anpassungspotenzials der Biofilme Gegenstand der dritten Messkampagne. Bei den Untersuchungen mit unterschiedlichen Inkubationsbedingungen lag der Schwerpunkt auf der Veränderung der Nitrifikationsaktivität bei verschiedenem pH. Da Nitrifikation bei einem pH < 5.8 in natürlichen Umgebungen i.a. nur begrenzt oder gar nicht nachweisbar ist und Nitrifikanten empfindlich auf solche Bedingungen reagieren, sollte sich die Erhöhung des pH "stressmindernd" auswirken, d.h. höhere Nitrifikationsraten erwarten lassen. Dies konnte allerdings nicht beobachtet werden. Die Studien zur Struktur der Biofilme wurden mit entsprechendem ergänzendem Probenmaterial weitergeführt.

Während der Nacharbeiten der dritten Messkampagne konnten die Projektpartner am Technion (Haifa) folgerichtig den Prozess auf nicht pufferndem Trägermaterial (Sinterglas) mit vergleichbar hohen Umsatzraten etablieren. Damit war makroskopisch den Nachweis erbracht, dass ein neutrales pH respektive eine (Überschuss-) Pufferkapazität für hohe Nitrifikationsraten nicht erforderlich ist. Hier stellte sich die Frage, wo und in welchem Maße die Nitrifikation im Biofilm ohne jeglichen Puffer stattfindet. Mikrosensormessungen im Rahmen einer abschließenden Meßkampagne konnten zeigen, dass die höchste Aktivität v.a. von sehr dünnen fleckenhaften Biofilmen auf der Oberfläche der Sinterpartikel ausging und die Bedingungen im Biofilm mit denen des Kalkreaktors durchaus vergleichbar sind.

#### 4. Wissenschaftlich-technischer Stand bei Projektbeginn

##### 4.1. Nitrifikation als Problem in der Abwasseraufbereitung

Niedrige N-Konzentrationen sind ein wichtiges Ziel der Abwasseraufbereitung. Dies hat dazu geführt, daß Abwasseranlagen neben Entfernung der organischen Komponenten verstärkt auch Stickstoffverbindungen abbauen müssen. Daraus sind moderne Anlagen entwickelt worden, die auch und gerade im Hinblick auf biologische Nitrifikations- und Denitrifikationsprozesse optimiert sind. Nitrifikation ist ein sehr sensibler und oft umsatzlimitierender Prozess. Nitrifizierende Mikroorganismen reagieren empfindlich auf Schwankungen in der Temperatur, dem Sauerstoffgehalt und dem pH-Wert. Darüber hinaus entstehen Probleme durch die niedrigen Umsatzraten der nitrifizierenden Mikroorganismen und durch die Konkurrenz mit heterotrophen Prozessen. All diese Faktoren machen große Belüftungsbecken erforderlich. Für die Pufferung ist oft eine teure zusätzliche Zudosierung von Natriumcarbonat notwendig.