

Abschlußbericht

Mikrobiologische Untersuchungen zur Nitritakkumulation im Brauchwasser

Joost Groeneweg, Ralf Wilhelm und Wolfgang Tappe

Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre, Institut 6, Institut für Biologie des Stoffaustauschs (ICG-6)

Forschungszentrum Jülich GmbH, 52425 Jülich

BMBF Forschungsvorhaben 02WA9637/6

Laufzeit: 1.4.1996 – 31.3.1998

Projektleitung: Dr. Joost Groeneweg

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	3
2. Ökophysiologische Untersuchungen und Zielsetzung	6
3. Kulturtechnik	8
4. Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Nitritoxidationskinetik	10
5. Untersuchungen an Nitrifikantenmischkulturen zum Einfluß von pH-Wertverschiebungen	16
6. In Israel durchgeführte Arbeiten	19
6.1 Statistische Auswertung der wöchentlichen Proben aus dem Maale Kishon der Jahre 1995 bis 1997	19
6.2 Umwelteinflüsse auf Nitritoxidierer	20
6.3 Hemmung der Nitritoxidierer durch Licht	20
6.4 Hemmung der Nitritoxidierer durch Ammoniak (NH ₃)	22
6.5 Nitritoxidation und Eisenverfügbarkeit	22
6.6 Fazit	23
7. Reaktivierung von <i>Nitrosomonas</i> und <i>Nitrobacter</i> nach Streß	24
8. Zusammenfassung	25
9. Schlußfolgerung	26
10. Literatur	27
Anhang 1	
Anhang 2	

Kurzfassung des Vorhabens

Während der Sommermonate kommt es in Abwasserspeicherbecken in Israel häufig zur Akkumulation hoher Nitritmengen. Die vorgeschriebene Chlorung des Wassers vor der Wiederverwendung in der Landwirtschaft wird dadurch ineffektiv, kostspielig und z.T. unpraktikabel. Ziel des Vorhabens ist die Aufklärung der öko- und bakterienphysiologischen Mechanismen, die zu der Nitritakkumulation führen. Dazu sollten zunächst Experimente mit Reinkulturen und Mischkulturen von NH_3 und NO_2^- -oxidierenden Bakterien bei unterschiedlichen pH-Werten, Sauerstoff- und Lichtverhältnissen durchgeführt werden. Schließlich sollten vor Ort die aus den Laborversuchen hergeleiteten Vorstellungen (die BMBF-Mittel erlaubten den Gastaufenthalt von Dr. R. Wilhelm, ICG-6, von Mai bis November 1997 in Israel) in Experimenten mit Wasser aus den Reservoirs auf ihre Gültigkeit überprüft und daraus Vermeidungsstrategien entwickelt werden.

1. Einleitung

In Kooperation mit dem *Jacob Blaustein Institute for Desert Research* (Environmental Microbiology) der *Ben-Gurion University of the Negev*, Israel, werden im Institut für Chemie und Dynamik der Geosphäre, Institut 6, Institut für Biologie des Stoffaustauschs (ICG-6; vormals IBT 3) des Forschungszentrums Jülich im Rahmen eines BMBF-Vorhabens physiologische Ursachen für die gestörte Nitrifikation in einem Abwasserspeicherbecken in Israel untersucht.

Aufbereitetes Abwasser, das z.B. für die Bewässerung von landwirtschaftlichen Flächen zwischengespeichert wird, hat für Israel aufgrund der herrschenden Wasserknappheit eine besondere Bedeutung. So wird erwartet, daß im Jahr 2010 ca. 20 % des gesamten Wasserbedarfs mit behandeltem Abwasser gedeckt werden können [AZOV & TREGUBOVA 1995].

Das Maale Kishon Reservoir in Israel ist mit einer maximalen Speicherkapazität von 12 Millionen Kubikmetern Wasser das größte Abwasserspeicherbecken Israels. Es wird mit behandeltem Abwasser aus Haifa (Belebtschlammverfahren, Tropfkörper) gespeist und enthält wenig BSB (für 1985 typisch: Gesamt-BSB 6 ± 2 mg/L, filtrierter BSB 4 ± 0.6 mg/L) [ABELIOVICH (1987)], jedoch relativ hohe Ammoniumkonzentrationen (42 ± 16 mg/L NH_4 [ABELIOVICH (1987)] bzw. für 1996 im Südteil des Reservoirs: bis 45 mg/L $\text{NH}_4\text{-N}$ [KAPLAN UND TELTSCH (1997)]). Eine künstliche Belüftung und Durchmischung des Beckens wird nicht vorgenommen. Messungen der Konzentrationen an Ammonium, Nitrit, anorganischem und organischem Kohlenstoff zeigen jedoch eine gute vertikale Durchmischung der Wassersäule, wobei die Messungen lediglich an einer Stelle vorgenommen wurden. Die NH_3 und NO_2^- -oxidierenden Bakterien (Nitrifikanten) sind homogen verteilt. Die Zellkonzentrationen lagen 1996 bei 10^1 bis 10^5 Zellen/mL [KAPLAN UND TELTSCH (1997)].

Als mögliche Ursachen der unvollständigen Nitrifikation kommen unter anderem in Betracht:

- **Licht**
- **begrenzte Angebot an Sauerstoff oder Kohlendioxid**
- **niedrige Temperatur** [PAINTER (1986); JONES AND PASKINS (1982) in: ALLEMAN (1984)]
- **Mangel an Spurenelementen**
- **toxische Substanzen**, z.B. Schwermetalle [RICHARDSON (1985); PAINTER (1986); RANDALL & BUTH (1984B)]
- **Durchmischung** [AZIMI & HORAN (1991), AZOV & TREGUBOVA (1995)]
- **geringe Wachstumsrate und Zellertrag von *Nitrobacter*** [DOMBROWSKI (1991)]
- **pH-Wert und Ammoniak**

In der folgenden Graphik sind einige Zusammenhänge möglicher Einflußfaktoren auf *Nitrobacter* im Speicherbecken zusammenfassend dargestellt.

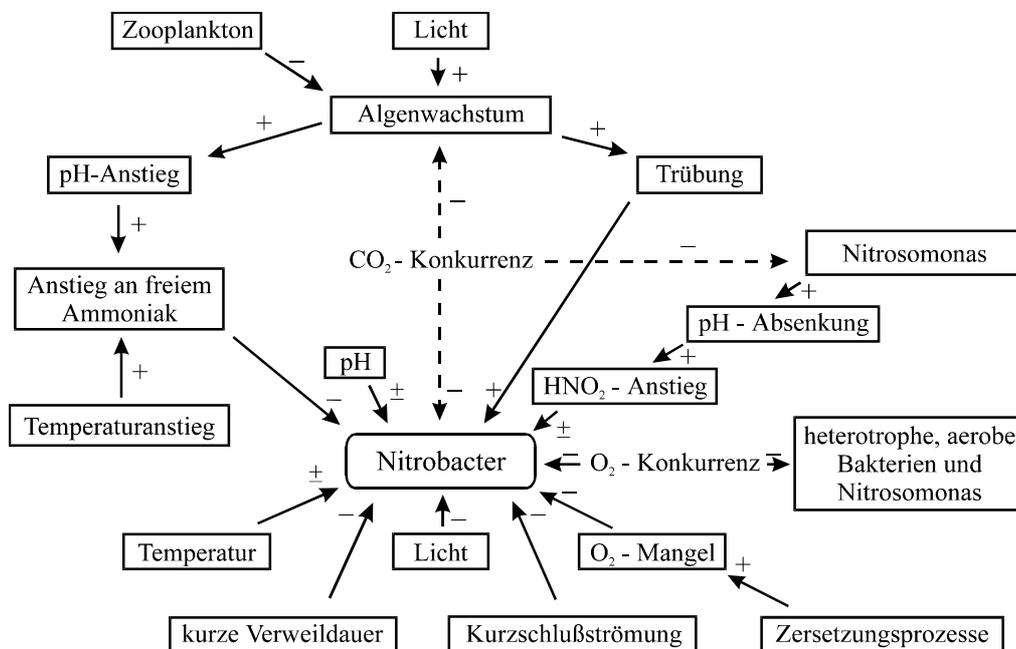


Abbildung 1: Mögliche Einflußgrößen auf *Nitrobacter* in einem Abwasserspeicherbecken

Nitrifikanten werden durch Licht gehemmt [ULKEN (1963) in: RHEINHEIMER ET AL. (1988); ABELIOVICH & VONSHAK (1993); AZOV & TREGUBOVA (1995); BOCK (1980)], wobei *Nitrobacter* empfindlicher reagiert als *Nitrosomonas*. Dem neusten KAPLAN & TELTSCH (1997) zufolge wird Licht als bedeutender Hemmfaktor für die Aktivität der Nitrit-Oxidierer im Maale Kishon Reservoir eingestuft.

Bei einer geringen Sauerstoffkonzentration wird die Nitritoxidation eher gehemmt als die Ammoniakoxidation [HANAKI ET AL. (1990); LAANBROEK & GERARDS (1993)]. Hohe organische Belastung führt aufgrund des vermehrten Kohlenstoffabbaus zu einem erhöhten Sauerstoffbedarf [RHEINHEIMER ET AL. (1988)]. Die von dem israelischen Partner über das ganze Jahr und in verschiedenen Tiefen gemessenen Sauerstoffwerte und anorganischen Kohlenstoffwerte im Maale Kishon Reservoir lassen jedoch nicht auf O₂ oder CO₂-Mangel als mögliche Ursache der gestörten Nitrit-Oxidation schließen.

Wachstum und Umsatz der Nitrifikanten sind von der Temperatur abhängig, und zwar mit unterschiedlichen Konstanten für Wachstum und Oxidationsgeschwindigkeit [ANTONIOU ET AL. (1990); HEGEMANN (1993)]. Bei zunehmender Temperatur wird die Nitritbildung durch *Nitrosomonas* stärker beschleunigt als die Nitratbildung von *Nitrobacter* [BERGERON (1978)], und abnehmende Temperaturen üben auf die Nitratbildung einen größeren Hemmeffekt aus als auf die Nitritbildung [RANDALL & BUTH (1984A)].

Nitrobacter ist fakultativ lithoautotroph. Das Wachstum kann sowohl mit Nitrit und CO₂ als einziger Energie- bzw. Kohlenstoffquelle erfolgen (lithoautotrophes Wachstum), als auch mit Pyruvat/Acetat als Kohlenstoff- und Energiequelle und Ammoniak/Nitrat als Stickstoffquelle (heterotrophes Wachstum). Allerdings ist heterotrophes Wachstum bei *Nitrobacter* immer langsamer als lithoautotrophes [BOCK (1980)].

Lithoautotroph wachsende *Nitrobacter*-Zellen assimilieren CO₂ über den Ribulosebisphosphat-Cyclus. Die für die CO₂-Fixierung benötigten Reduktionsäquivalente (NADPH₂) werden unter ATP-Verbrauch über den rückläufigen Elektronentransport gewonnen [BOCK ET AL. (1991); SCHLEGEL (1992)]. Mit dieser energetisch ungünstigen Synthese der Reduktionsäquivalente begründet man das im Vergleich zu heterotrophen Bakterien langsame Wachstum von *Nitrobacter* [RHEINHEIMER ET AL. (1988)]. So müssen für die Assimilation von einem Mol CO₂ 85-115 Mol Nitrit oxidiert werden [BOCK ET AL. (1991)]. Bei verschiedenen *Nitrobacter*-Stämmen wurden minimale Generationszeiten zwischen 10 und 140 Stunden [BOCK ET AL. (1991)] gefunden.

Nitrifikanten reagieren empfindlich auf verschiedene Umweltbedingungen z.B. auf Licht, pH-Schwankungen und Temperatur-Shifts [MOBARRY ET AL. (1996)]. Im Maale Kishon Reservoir kann der pH-Wert im Zusammenhang mit den hohen Ammonium-Konzentrationen eine besondere Rolle spielen.

Die spezifischen maximalen Wachstumsraten der Nitrifikanten sind von der Temperatur und vom pH-Wert abhängig [ANTONIOU ET AL. (1990); PIRSING & WIESMANN (1994)]. Eine Änderung des pH-Wertes kann die Nitrifikation auch indirekt über eine Verschiebung des Dissoziationsgleichgewichtes zwischen Ammonium/Ammoniak und salpetriger Säure/Nitrit beeinflussen [NYHUIS (1985)].

Durch die Ammoniak-Oxidation werden H^+ -Ionen freigesetzt, die bei einer geringen Pufferkapazität des Wassers zu einer Abnahme des pH-Wertes führen [NOLTING (1989)]. Wird eine schnelle Umwandlung von Nitrit zu Nitrat z.B. durch eine Chemikalie gestört, so kann salpetrige Säure akkumulieren, die auf die Nitritbildner toxisch wirkt [RANDALL & BUTH (1984B)]. Als Folge davon akkumuliert unter Umständen Ammoniak. Schon bei relativ geringen Ammoniak-Konzentrationen von 0,08 bis 0,82 mg/L NH_3 -N (freies Ammoniak) wird *Nitrobacter* gehemmt, während *Nitrosomonas* erst ab 8,24 bis 123,5 mg/L NH_3 -N empfindlich auf überschüssiges Substrat reagiert [ANTHONISEN ET AL. (1976)]. Gegebenenfalls kann die Nitrifikation vollständig unterbleiben [ABELING & SEYFRIED (1993)]. Ammoniak ist auch für Fische und andere Wasserorganismen sehr giftig. In der AGA (1991) wird als Ammoniak-Grenzkonzentration für eine akut toxische Wirkung bei Fischen 0,1 bis 1 mg/L angegeben. Ein Zehntel dieser Konzentrationen führt jedoch schon zu Schäden und Wachstumsdepressionen.

Der pH-Wert kann einerseits durch Denitrifikation, andererseits durch biogenen CO_2 -Entzug photosynthetisch aktiver Algen ansteigen [NOLTING (1989); SCHLEGEL (1992); ABELIOVICH & VONSHAK (1993)]. Bei einem höheren pH-Wert liegt wiederum anteilmäßig mehr freies Ammoniak vor, welches *Nitrobacter* stärker hemmt als *Nitrosomonas* [ANTHONISEN ET AL. (1976); FDZ-POLANCO ET AL. (1994)]. Der Grund für die relativ hohen Ammoniumkonzentrationen im Maale Kishon Reservoir sind bislang noch nicht vollständig geklärt. Im Jahr 1991 kam es im Kfar Baruch „Lake“, einem Speicherbecken, das mit Wasser aus dem Ablauf des Maale Kishon Reservoirs gespeist wird, zu einem erheblichen Fischsterben, für das die gestörte Nitrifikation verantwortlich gemacht wird [AZOV & TREGUBOVA (1995)].

2. Ökophysiologische Untersuchungen und Zielsetzung

Schwach organisch belastete Abwasserspeicherteiche sind normalerweise dadurch gekennzeichnet, daß eine Massenentwicklung von Mikroalgen die obersten Schichten gut biogen belüftet und zwar durch die Photosyntheseaktivität tagsüber. Der damit einhergehende CO_2 -Entzug ändert die Pufferkapazität des Wassers und es erfolgt ein pH-Anstieg.

Wie in der Einleitung beschrieben, verschiebt sich das Gleichgewicht $NH_4^+-NH_3$ zu NH_3 , so daß insbesondere bei höheren Temperaturen und Konzentrationen bis zu 50 mg NH_4^+ -N im Abwasser NH_3 -Konzentrationen vorliegen, die Nitritoxidierer und *Nitrobacter* hemmen bzw. komplett inhibieren sollten.

Eine der Ziele war es deshalb zu untersuchen, ab welcher NH_3 -Konzentrationen mit einer Hemmung von *Nitrobacter* zu rechnen ist. Dazu wurde eine Methode ausgearbeitet, mit deren Hilfe die kurzfristige Wirkung von Streßfaktoren auf Kulturen von Nitrifikanten schnell und reproduzierbar untersucht werden kann. Zu diesem Zweck wurde ein Bioreaktor mit Mikrofiltrationsmodul, ein sogenannter ‚Retentostat‘ eingesetzt. (s. Abschnitt Kulturtechnik). Mit dem Retentostaten können durch (vollständige) Biomasserückhaltung hohe Zellkonzentrationen erreicht werden und die natürlichen Wachstumsbedingungen bezüglich des spezifischen Nährstoffangebotes simuliert werden. Nach Erprobung mit Reinkulturen und synthetischem Substrat sollte dieses Gerät vor Ort in Israel mit entsprechend filtriertem und ggf. modifiziertem Wasser aus dem Maale Kishon Reservoir als Biotestverfahren genutzt werden.

Aus den Daten des israelischen Monitoring-Programms geht hervor, daß die Ammonium-Konzentrationen und die pH-Werte zumindest wöchentlich, erheblichen Schwankungen unterliegen. Eine weitere Fragestellung war deshalb, wie nachhaltig Ammoniumoxidierer wie *Nitrosomonas* und Nitritoxidierer wie *Nitrobacter* jeweils nach eventuellen pH-shifts geschädigt bleiben. Auch dazu wurden, allerdings nicht sterile, Retentostaten (24 l) mit *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter winogradskyi* eingesetzt, um genügend Biomasse gleicher physiologischer Qualität für Fed-Batchversuche zur Verfügung zu haben.

Die Qualität (Nährstoffzusammensetzung) des Wassers im Speichersee gibt keine Hinweise auf ungewöhnliche Faktoren, die ein Wachstum von autotrophen Organismen verhindern sollten. Dennoch gab es in den letzten Jahren überraschenderweise kein nennenswertes Mikroalgenaufkommen im Sommer. Neben externen Einflußfaktoren, wie Lichthemmung, könnte auch die Bioverfügbarkeit von z.B. Spurenelementen für die autotrophen Mikroorganismen wachstumslimitierend sein.

So fand Hegewald (interner Bericht FZJ), daß die Eisenbioverfügbarkeit der hauptlimitierende Faktor für Phytoplanktonentwicklung in den künstlichen Seen des Braunkohlereaktivierungsgebiet bei Köln war. In Israel wurden deshalb von uns mit *Nitrobacter* Wachstumsversuche mit Maale Kishon-Wasser durchgeführt, das mit Eisen angereichert war.

Aus den Berichten des israelischen Partners geht hervor, daß Ammonium-Oxidierer und Nitrit-Oxidierer zu jeder Jahreszeit nachweisbar sind (MPN-Methode), aber nur gelegentlich eine Korrelation zwischen der Zahl der Bakterien und den jeweiligen Endprodukten Nitrit und Nitrat gefunden wurde. Das weist auf eine Entkopplung zwischen Vorhandensein und Aktivität der Nitrifikanten hin.

Eine wesentliche Fragestellung im Rahmen des gemeinsamen Projektes war daher, wie schnell *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* nach Streß reaktivieren. Als Streßfaktor wurden lang andauernde Hungerperioden gewählt, die eine allgemeine Behinderung des Umsatz der energieliefernden Substrate simulieren sollten (etwa bei Substratmangel, Trockenheit usw.). Zum Schluß war geplant, zusammen mit

dem israelischen Partner durch intensivere statistische Analysen der Felddaten und der Laborergebnisse zu einer Aussage über die Mechanismen zu kommen, die zur Nitritanhäufung in Brauchwasserspeicherseen führen. Daraus abgeleitet sollten mögliche Wege zur Vermeidung aufgezeigt werden.

3. Kulturtechnik

Kontinuierliche Kultur von *Nitrobacter winogradskyi* im Retentostat.

Für die Kultur von Nitrifikanten im FZJ Jülich als auch bei einigen in Israel durchgeführten Versuchen, kam ein neuartiges Kultursystem zum Einsatz, das wir in diesem Abschnitt beschreiben.

Zur Kultivierung und Simulation von Streßsituationen, wurde als kontinuierliches Kultursystem ein Retentostat mit vollständiger interner Biomasserückhaltung verwendet [TAPPE ET AL. (1996)] (s. Abbildung 2.1). Mit diesem Fermenter ist es möglich, Bakterien bei extrem niedrigen Nährstoff- zu Biomasseverhältnissen und entsprechend niedrigen Wachstumsraten zu kultivieren.

Der Fermenter bestand aus einem zwischen zwei Edelstahlplatten eingespannten Glaszylinder. Dieser wurde mit einer schwarzen Folie umhüllt, um einer Lichtschädigung der Bakterien vorzubeugen [BOCK (1965)]. Für eine homogene Suspendierung der Mikroorganismen sorgten zwei Prallbleche sowie ein am Deckel frei aufgehängter Rührmagnet, der mit 500 Upm unmittelbar über einem Filter rotierte und so einen „Cross-Flow-Effekt“ erzeugte. Die auftretenden Scherkräfte verhinderten das Zusetzen der Filtermembran mit Biomasse, das sogenannte „clogging“ [TAPPE ET AL. (1996)]. Der Edelstahldeckel war u.a. zur Installation der Substratzufuhr, der Be- und Entlüftung, der Niveausonde und des Probenentnahmesystem mit mehreren Bohrungen versehen.

Das Arbeitsvolumen betrug 325 mL. Die Biomasserückhaltung wurde über einen Membranfilter aus Polyvinylidendifluorid (Fa. Millipore, Porengröße 0,2 µm) erreicht.

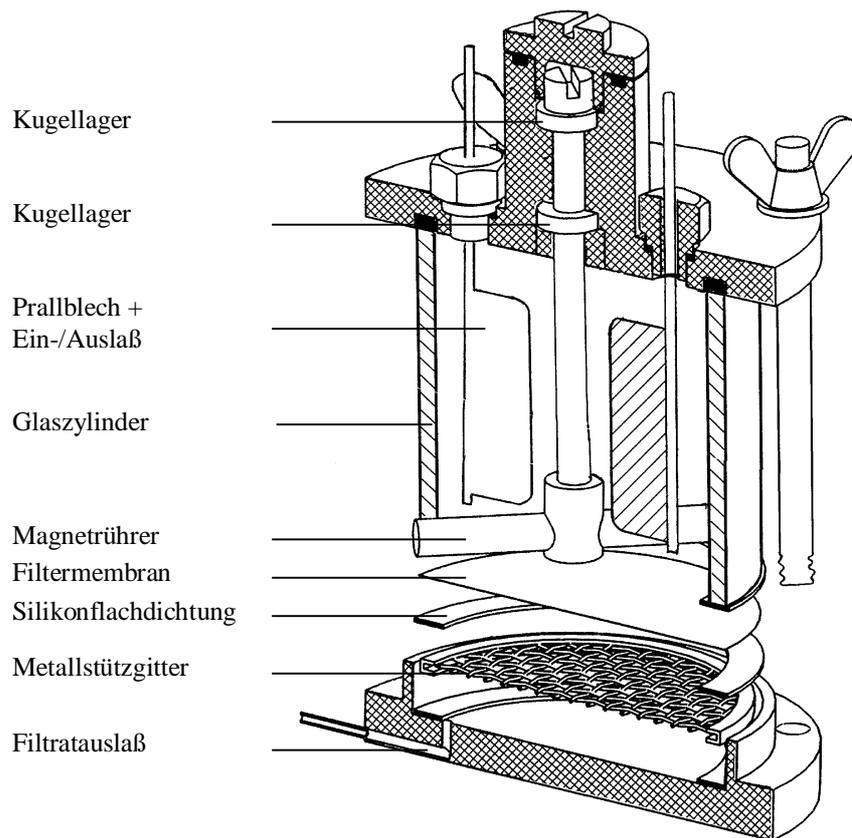


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Retentostaten mit vollständiger interner Biomasserückhaltung, nach TAPPE ET AL. (1996). Sauerstoffelektrode, pH-Elektrode und Niveausonde sind nicht dargestellt.

Die Verwendung eines Retentostaten zur Simulation von Stressituationen und seine Vorteile

Für die Kurzzeitversuche wurde ein Retentostaten mit einer autoklavierbaren Sauerstoff- und pH-Elektrode und einer zusätzlichen Zugabemöglichkeit für Testsubstanzen ausgestattet. Der Umbau des Retentostaten ermöglichte die Untersuchung von Hemmwirkungen auf die respiratorische Aktivität von Bakterien unter reproduzierbaren Bedingungen. Da die Biomasse für die Versuche nicht aus dem Fermenter entnommen werden mußte, konnten die Untersuchungen nahezu unter Kulturbedingungen in-situ durchgeführt werden. Stressfaktoren, die möglicherweise direkt oder indirekt mit der Biomasseentnahme einhergehen, wurden vermieden, so z.B. die beobachtete Schädigung von *N. winogradskyi* durch Licht [MÜLLER-NEUGLÜCK & ENGEL (1961); BOCK (1965)]. Mit dem Retentostaten wurden aufgrund der vollständigen Entkopplung der hydraulischen Verweilzeit von der Verweilzeit der Bakterien, Biomassekonzentrationen von $> 10^9$ Zellen/mL erzielt. Bei gleicher biomassespezifischer Nährstoffzufuhr ist bei dieser Zelldichte ein hoher Gesamtumsatz an Substrat zu erwarten. Aus diesem Grund konnte, um einen möglichen Einfluß auf die respiratorische Aktivität in kurzer Zeit meßbar und quantitativ erfaßbar zu machen, die Substratkomponente der Testpulse entsprechend hoch dosiert werden. Annähernd gleich hohe Zellkonzentrationen sind bei den mit geringem Zellertrag wachsenden Nitrifi-

kanten mit herkömmlicher Durchflußtechnik (Chemostat) nicht erreichbar. Hohe Substratkonzentrationen führen zu Hemmeffekten durch das Substrat bzw. Produkt und sind deshalb ungeeignet für Experimente zur Untersuchung von möglichen Hemmfaktoren auf die respiratorische Aktivität. Aufgrund der vollständigen Biomasserückhaltung im Retentostaten war es möglich, eine hohe Verdünnungsrate D_{Substrat} einzustellen und bei der Kultivierung eine so geringe Substratkonzentration einzusetzen, daß eine Substrat- bzw. Produkthemmung unwahrscheinlich war [TAPPE ET AL. (1996)].

4. Einfluß von Ammoniumchlorid auf die Nitritoxidationskinetik

Die Kurzzeitwirkung von Streßfaktoren auf die Atmungsaktivität von *N. winogradskyi* wurde in einem konstant belüfteten Retentostaten untersucht. Zunächst wurden Substratpulse (nur Nitrit) zugegeben und die Änderung der Konzentration an gelöstem Sauerstoff im Fermenter gemessen. Anschließend wurden Testpulse (Substrat + NH_4Cl bzw. NaCl) verschiedener Konzentrationen zudosiert und ermittelt, ob sich die respiratorische Aktivität von *N. winogradskyi* im Verlaufe der Versuchsreihe ändert. Als Maß für die Aktivität diente die Sauerstoffverbrauchsrate.

Die Änderung der Sauerstoffkonzentration im belüfteten Retentostaten resultiert aus der Überlagerung von Sauerstoffverbrauch durch die Bakterien und Sauerstoffeintrag durch die konstante Belüftung. Sauerstoffzehrung und Sauerstoffeintrag werden zunächst getrennt betrachtet.

Theoretisch läßt sich die bakterielle Sauerstoffverbrauchsrate direkt über einen Zehrungskoeffizientz bestimmen:

$$\left. \frac{dC}{dt} \right|_{\text{Zehrung}} = -z \cdot C \quad (1)$$

Ausgehend von 100 % -iger Luftsättigung zu Versuchsbeginn und ohne Wiederbelüftung folgt für den Verlauf der Sauerstoffkonzentration C nach Integration von (1):

$$C(t) = C_s \cdot e^{-z \cdot t} \quad \text{mit } C_s = \text{Sättigungskonzentration} \quad (2)$$

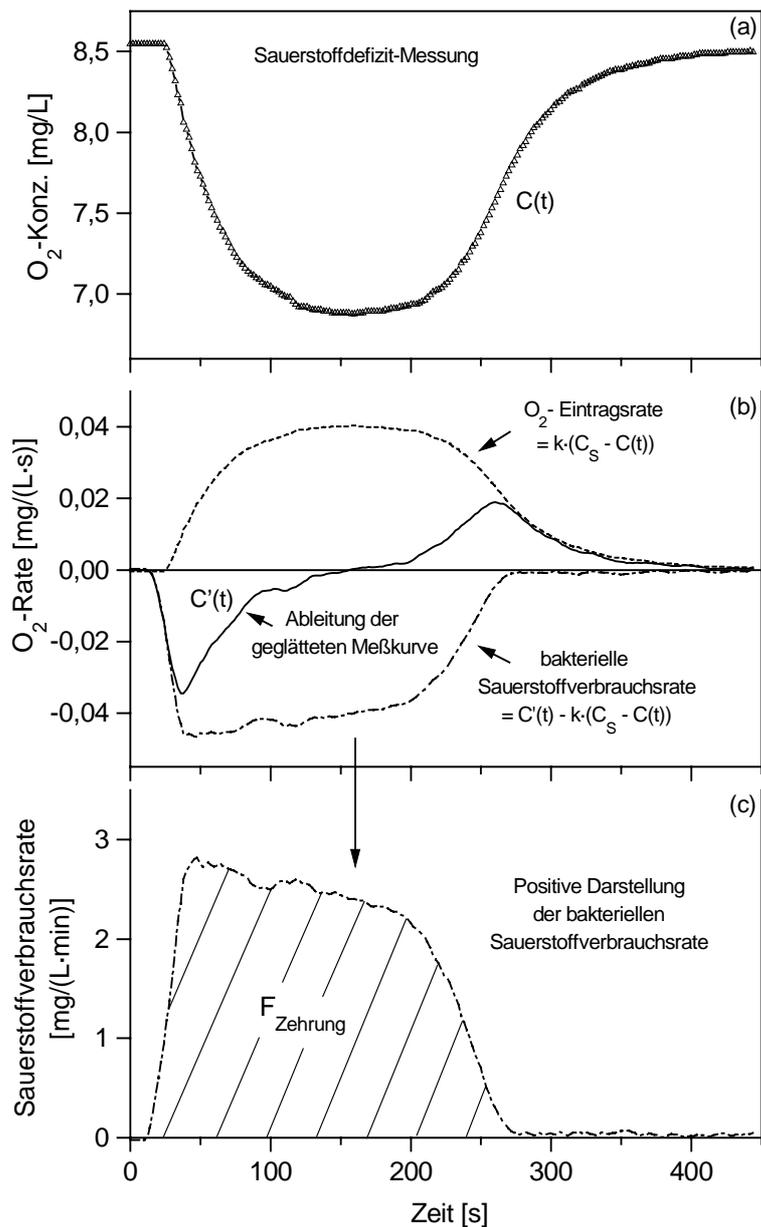


Abbildung 3 : Übersicht zur Berechnung der bakteriellen Sauerstoffverbrauchsrate aus den Daten der Sauerstoffdefizitmessungen über deren Ableitung und den Sauerstoffeintrag; Substratpuls (7,5 mg/L NO_2 -N)

Als Beispiel sind in Abbildung 4 die ungeglätteten Meßdaten der Sauerstoffdefizitmessungen, die berechneten Sauerstoffverbrauchsrate und die kumulative Konzentration der Ammoniak-Konzentration eine Versuchsreihe dargestellt. Die Sauerstoffverbrauchskinetiken der Versuchsreihen lassen den zeitlichen Verlauf der Atmungsaktivität mit zunehmender Konzentration der Testsubstanz (NH_3 -N) erkennen.

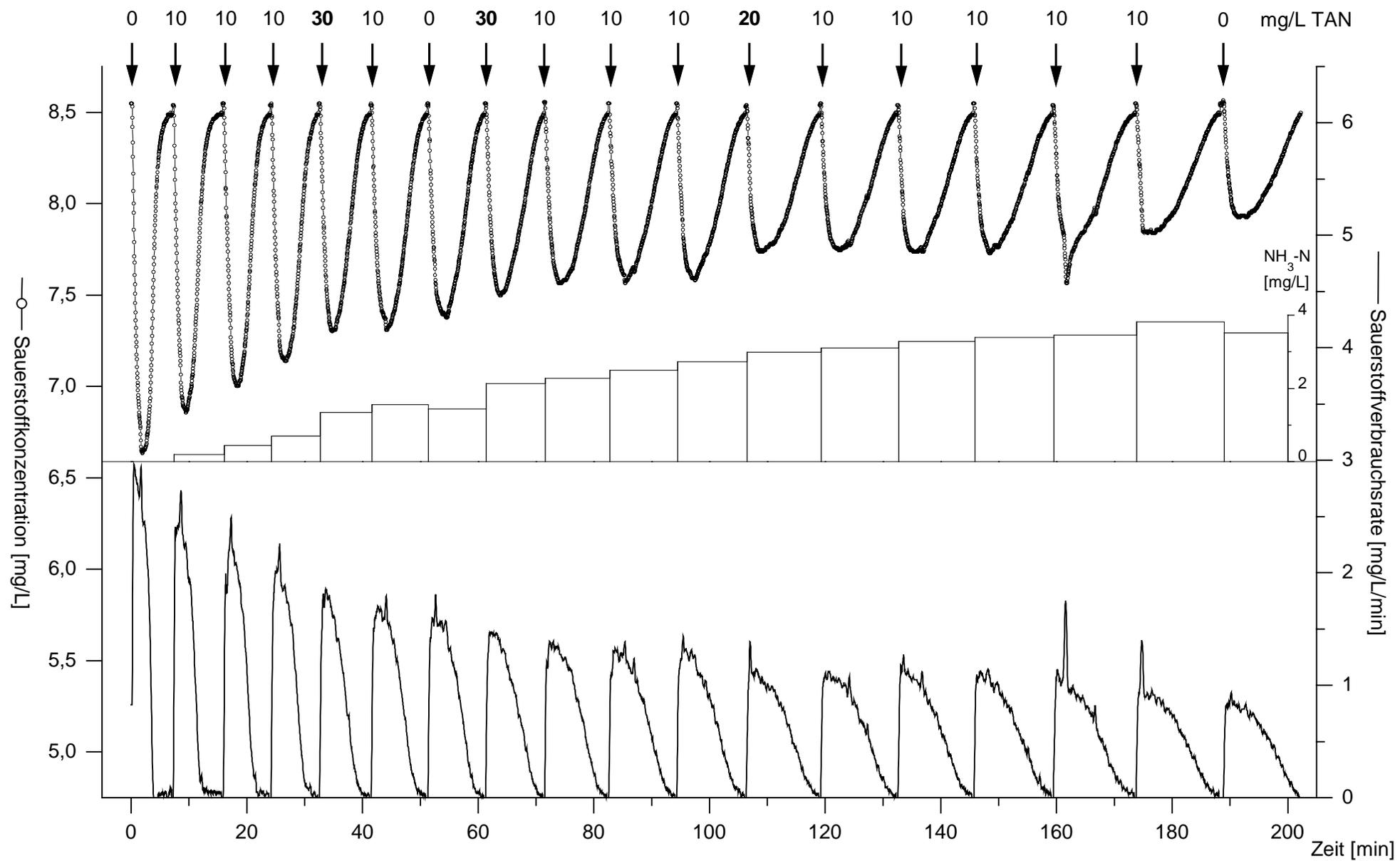


Abbildung 4: Kumulativer Einfluß wiederholter Ammonium-Dosierungen auf die Sauerstoffverbrauchskinetik, Versuchsreihe I (18 Pulse à 7,5 mg/L NO₂-N + 0/10/20/30 mg/L TAN).
Mitte: Resultierende Ammoniak-Konzentration im Retentostaten bei pH 7,72 und 24°C

Um die Hemmwirkung der Testsubstanzen zu quantifizieren wurde eine wirksame Konzentration ermittelt, bei der die maximale spezifische Sauerstoffverbrauchsrate um 50 % abnahm. Nach EN ISO 8192 L39 ist der EC₅₀-Wert die wirksame Konzentration einer Testsubstanz, die eine berechnete oder interpolierte 50 %ige Hemmung einer gemessenen Stoffwechselleistung der Sauerstoffverbrauchsrate ergibt. Die prozentuale Hemmung des Sauerstoffverbrauchs (*I*) wurde wie folgt berechnet:

$$I = \frac{(O_2 - Rate_{Substratpuls}) - (O_2 - Rate_{Testpuls})}{(O_2 - Rate_{Substratpuls})} \cdot 100$$

- I* = Hemmung des Sauerstoffverbrauchs in Prozent
*O*₂-*Rate*_{Substratpuls} = Sauerstoffverbrauchsrate des Substratpulses (7,5 mg/L NO₂-N)
*O*₂-*Rate*_{Testpuls} = Sauerstoffverbrauchsrate bei einer bestimmten Ammoniak- bzw. Natriumchlorid-Konzentration im Retentostaten

Die halblogarithmische Auftragung der prozentualen Hemmung *I* gegen die Konzentration der Testsubstanz ergibt eine „Hemmkurve“, aus der sich der EC₅₀-Wert graphisch bestimmen läßt EN ISO 8192 L39. Für Versuchsreihe I (18 Pulse à 0/10/20/30 mg/L TAN) wurde eine EC₅₀ von 2,76 mg/L NH₃-N und für Versuchsreihe II (22 Pulse à 0/10 mg/L TAN) eine EC₅₀ von 2,58 mg/L NH₃-N ermittelt. Die EC₅₀-Werte von Versuchsreihe I und II differieren um weniger als 7 %. Im getesteten Konzentrationsbereich von 0,20 mg/L bis 3,82 mg/L NH₃-N (Versuchsreihe I) bzw. 0,19 mg/L bis 3,34 mg/L NH₃-N (Versuchsreihe II) erkennt man bei beiden Versuchsreihen eine annähernd logarithmische Dosis-Wirkungs-Beziehung, d.h. im untersuchten Bereich führt ein exponentieller Anstieg der Ammoniak-Konzentration zu einer linearen Hemmung der Sauerstoffverbrauchsrate. In einem weiteren Versuch mit Natriumchlorid ließ sich keine EC₅₀ bestimmen, womit gezeigt wurde, dass die gemessenen Effekte nicht auf osmotische Hemmungen beruhten.

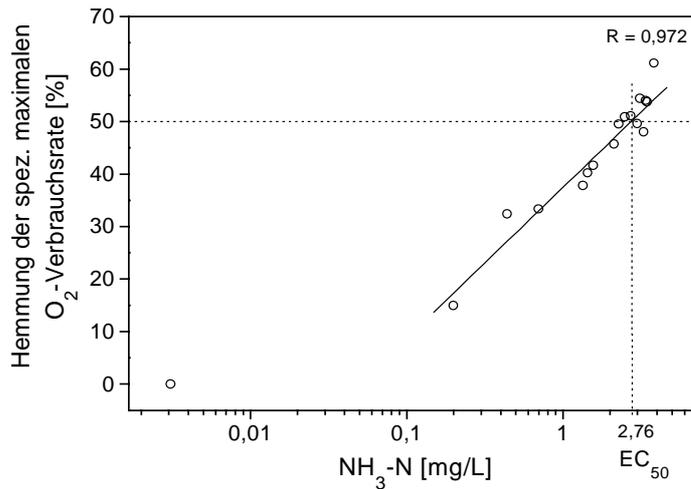


Abbildung 5: Mittlere effektive Ammoniak-Konzentration (EC_{50}) bei 50%iger Hemmung der maximalen spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate im belüfteten Retentostat. Versuchsreihe I (18 Pulse à 0/10/20/30 mg/L TAN)

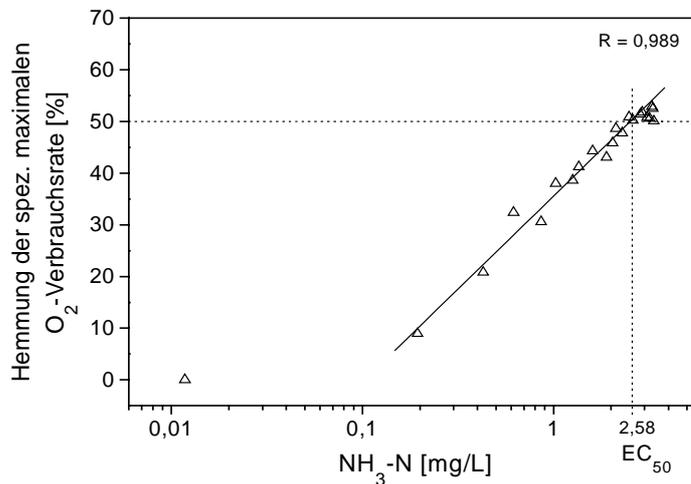


Abbildung 6: Mittlere effektive Ammoniak-Konzentration (EC_{50}) bei 50%iger Hemmung der maximalen spezifischen Sauerstoffverbrauchsrate im belüfteten Retentostat. Versuchsreihe II (22 Pulse à 0/10 mg/L TAN)

Bei den mit einer *Nitrobacter*-Reinkultur durchgeführten in-situ Messungen des Sauerstoffverbrauchs wurde ein Einfluß von freiem Ammoniak auf die Nitritoxidation in einem Konzentrationsbereich gemessen der mit Literaturangaben für andere *Nitrobacter*-Stämme und nitrifizierenden Mischkulturen übereinstimmt. Ein Schwellenwert für eine Hemmung konnte durch Extrapolation der Daten mit 0,05 - 0,1 mg/L NH_3^- -N bestimmt werden. (s. Abbildung 5 u. 6) Dieser Wert stimmt ziemlich genau mit dem arbiträr gewählten Wert von umgerechnet 0,082 mg/L NH_3^- -N durch ANTHONISEN ET AL. (1976) überein.

Die Hemmung durch Ammoniak kann eine Ursache für die beobachteten Nitrit-Spitzen im Maale Kishon Reservoir sein. Die geringe Abundanz der Nitrit-Oxidierer im Speichersee ist zunächst darauf zurückzuführen, daß das Substrat Nitrit erst zögernd im Frühjahr gebildet

wird. Wenn zusätzlich Ammoniak die Nitrit-Oxidierer hemmt, wird es bei dem langsamen Wachstum entsprechend lange dauern, bevor genügend *Nitrobacter* nachgewachsen sind, um das angebotene Substrat oxidieren zu können.

5. Untersuchungen an Nitrifikantenmischkulturen zum Einfluß von pH-Wertverschiebungen

Täglich oder wöchentlich schwankende pH-Werte im Maale Kishon Reservoir und eine Verschiebung des pH-Wertes in dem basischen Bereich könnten die Oxidationsleistung der Ammonium- und Nitritoxidierer beeinflussen. Bekannt ist die Hemmwirkung von NH_3 auf *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter* (s. vorhergehender Abschnitt). Unseres Wissens ist nicht bekannt, wie sich ein über einige Stunden andauernder pH-Anstieg auf die NH_3 und NO_2^- -Oxidierer auswirkt bzw. ob eventuelle Hemmungen nachhaltige Wirkung zeigen.

Um genügend Biomasse gleicher physiologischer Qualität zur Verfügung zu haben, kam ein 20 L Reaktor mit externer Biomasserückhaltung zum Einsatz. Der Reaktor wurde mit *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter winogradskyi* angeimpft und langsam hochgefahren, bis sich 1 bzw. 3 TS-Gehalt g/L Biomasse im Reaktor befand und das zugeführte Substrat NH_4^+ -N vollständig in NO_3^- -N umgewandelt war. Durch tägliche Biomasseentnahme wurden auf diese Werte über mehrere Monate konstant gehalten.

Reaktorparameter:

Reaktorvolumen:	20 l	Substrat $\text{NH}_4\text{-CL}$:	10 g/l
hydr. Verweilzeit:	133,3 h	pH- Wert:	7,5 pH
Zulauf Substrat	150 ml/h	Sauerstoff:	5,0 mg/l
Fracht $\text{NH}_4\text{-N}$	19,6 mg/h*1	Temperatur:	18-22°C

Bei der vorgegebenen Fracht betrug die spezifische Aktivität bei 1 g Biomasse Trockensubstanz 20 mg N/g TS · h; bei 3 g Biomasse etwa 7 mg N/g TS · h:

Die nahezu täglich entnommene Biomasse wurde in kleineren Reaktoren (1,2 L) umgefüllt und mit vollständiger Biomasserückhaltung weiterbetrieben.

Reaktorparameter:

Reaktorvolumen:	1,2 l	Substrat $\text{NH}_4\text{-CL}$:	1,8 g/l
hydr. Verweilzeit:	24 h	pH- Wert:	7,5 pH
Zulauf Substrat	50 ml/h	Sauerstoff:	5,0 mg/l
Fracht $\text{NH}_4\text{-N}$	19,6 mg/h*1	Temperatur:	20°C

Die erwünschte pH-Wert-Verschiebungen wurden über eine automatisierte langsam verlaufende Titration (30 min) eingestellt und über unterschiedlich lange Perioden gehalten. Die Rücktitration auf den Ursprungs-pH-Wert von 7,5 erfolgte ebenfalls innerhalb von 30 min. Der Untersuchungszeitraum erstreckte sich je nach Ausmaß der Hemmungen über 1 - 3 Tage.

Die Versuche zeigen folgende Ergebnisse:

Ein pH-Shift von 7,5 auf 9,0 über 2 bzw.5 Stunden beeinträchtigt die Nitrifikationsleistung nicht, es kommt weder zu Nitrit noch zu Ammonium-Anreicherung.

Erst eine Erhöhung auf pH 10,0 über 2 Stunden (Abb. 7) führte dazu, daß sich sofort Nitrit anreicherte, und zwar zunächst mit der gleichen Rate mit der $\text{NH}_4\text{-N}$ zugeführt wurde. Nach ca. 30 min reduzierte sich die Ammoniumoxidationsrate auf die Hälfte der ursprünglichen Rate und das zugeführte $\text{NH}_4\text{-N}$ reicherte sich an. Bei pH 10,0 wird nun schnell die NH_3 -Konzentration erreicht, die die Ammoniumoxidierer hemmen und es kommt zu einer vollständigen Hemmung der Oxidationsleistung. (Abb. 8) Nach Rücktitration auf pH 7,5 setzt die Nitritoxidation sofort wieder ein. Die Ammoniakoxidierer benötigen dagegen etwa 30 - 50 min um eine Oxidationsleistung, wie zuvor im 20 L Reaktor, zu erreichen. Die potentielle Ammoniakoxidationsleistung, die in Batchversuche ermittelt wurde, lag bei $30 \text{ mg N/g} \cdot \text{h}$. Diese wurde nach dem pH-Shift nicht mehr erreicht, so daß von einer nachhaltigen Schädigung der ammoniakoxidierenden Biomasse ausgegangen werden muß. pH-Shifts auf pH 10,0 über 5, 6 und 7 Stunden zeigen im wesentlichen das gleiche Bild.

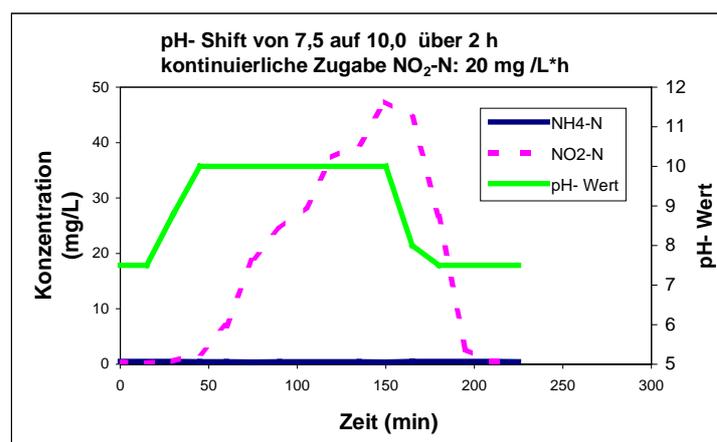


Abbildung 7: Verlauf der Ammonium- und Nitritkonzentration im Bioreaktor mit vollständiger Biomasserückhaltung (1 gTS/L) bei kontinuierlichem Zufuhr von $20 \text{ mg NH}_4^+ \text{- N/L} \cdot \text{h}$ und einem pH-Shift von 7,5 auf 10,0 über 2 Stunden

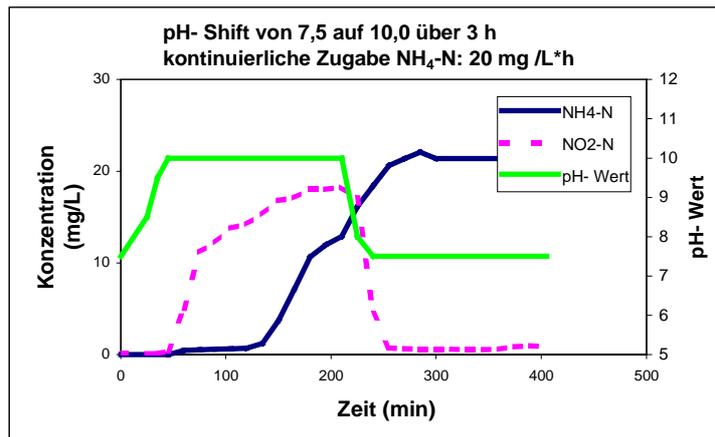


Abbildung 8: Verlauf der Ammonium- und Nitritkonzentration im Bioreaktor mit vollständiger Biomasserückhaltung (1gTS/L) bei kontinuierlichem Zufuhr von 20 mg NH₄⁺-N/L · h und einem pH-Shift von 7,5 auf 10,0 über 3 Stunden

Ein Versuch mit kontinuierlicher Zugabe von Nitrit und einer Anhebung des pH-Wertes auf 10,0 zeigte, daß einzig die pH-Erhöhung die NO₂⁻-Oxidationsleistung voll zum Erliegen brachte. Weder die vorübergehend höheren pH-Werte noch die vorübergehend hohe Ammoniumwerte beeinträchtigen die Nitritoxidationsleistung nachhaltig.

Nach Erhöhung der Biomasse durch verringerte Entnahme aus dem 20 L Reaktor auf 3 – 3,2 g/L betrug die spezifische Aktivität nur noch 7 – 8- mgN/g · h.

Wurde diese Biomasse pH-Shifts auf pH 10,0 über 2,5 und 7 Stunden unterworfen, erfolgte weder ein Anstieg des Nitritgehaltes, noch des Ammoniums.

Eine hohe Biomassekonzentration mit relativ niedriger spezifischer Aktivität scheint demnach, bezüglich was die Leistung angeht, weniger empfindlich auf Streßsituationen zu reagieren.

Die potentielle Aktivität für die Ammoniakoxidierer lag in Batch-Versuchen mit 20 ± 2 mg NH₄-N/g circa 3 fach höher als die aktuelle spezifische Aktivität im kontinuierlich betriebenen Reaktor.

Für die Nitritoxidierer lag die potentielle Aktivität mit bis zu 60 mg NO₂⁻-N/g · h etwa 7 bis 8 fach höher als die aktuelle spezifische Aktivität. Diese ‚Reserve‘ ist möglicherweise eine Erklärung dafür, daß Aktivitätseinbuße durch Streßfaktoren in diesem Versuch nicht zu einem meßbaren Ergebnis führten.

6. In Israel durchgeführte Arbeiten

6.1 Statistische Auswertung der wöchentlichen Proben aus dem Maale Kishon der Jahre 1995 bis 1997

Im Maale Kishon wurden vom Israelischen Projektpartner wöchentlich Wasserproben entnommen und vor Ort bzw. nach gekühltem Transport im Labor analysiert (s. israelischen Abschluß-Bericht). Unter Mitarbeit eines delegierten Wissenschaftlers des ICG-6 wurden die Messdaten erneut statistisch aufbereitet, um zu ermitteln, welche Umwelteinflüsse im Jahresverlauf wesentlichen Einfluss auf die Hemmung der Nitrifikation ausüben. Mittels schrittweiser Regressionsanalyse konnten signifikante Korrelationen zwischen Temperatur (positive Korrelation) und Sichttiefe (Attenuationskoeffizient des Wassers; negative Korrelation) zur Ammonium- und Nitrit-Konzentration ermittelt werden ($R^2=0.74$). Andere Faktoren (Sauerstoffkonzentration, pH, Ammoniak-konzentration, gelöster organischer Kohlenstoff, Phosphatkonzentration, Zelldichten [MPN] der Nitrit- und Ammonium-oxidierenden Bakterien) zeigten keine signifikanten Korrelationen zum beobachteten annualen Verlauf der Nitritakkumulation im Maale Kishon. Die Schwankung der Daten zwischen den wöchentlichen Probenahme deuteten jedoch eine hohe Variabilität der Messwerte auf kürzeren Zeitskalen an (< 1 Jahr). Der jährliche Trend der Nitrifikationsleistung wurde also durch grundlegende meteorologische Größen bestimmt, während die Nitrifikationsaktivität kurzfristig (> Tagen) variablen Umweltbedingungen ausgesetzt war. Auf unterschiedlichen Zeitskalen kann auch die teilweise Entkopplung der beiden Nitrifikationsschritte Ammoniakoxidation und Nitritoxidation im Maale Kishon begründet sein, die zu problematischen Nitritspitzen führte: Auf der langfristigen Zeitskala kann die Adaptation bzw. Kompensation der Lichthemmung bei Ammoniakoxidierern rascher erfolgen als bei Nitritoxidierern, kurzfristig kann die Oxidationsleistung der Nitritoxidierer stärker gehemmt sein, was auch langfristige Adaptationsprozesse blockieren kann.

Aus den vorliegenden Messungen vergangener Jahre (Analysenberichte der Mekoroth Wasserwerke, Jahresberichte Israelischer Partner) konnte geschlossen werden, daß eine Hemmung der Nitrifikation - insbesondere der Nitrit-Oxidation - nicht auf zu niedrige Sauerstoffkonzentrationen zurückzuführen ist. Auffällig war zudem, daß trotz anscheinend optimaler Lebensbedingungen keine Massenentwicklungen von Algen beobachtet wurden. Es war daher anzunehmen, daß Algen und Nitrifikanten zusätzlich durch andere Faktoren als Temperatur und Einstrahlung limitiert bzw. gehemmt wurden. Deshalb widmeten sich die gemeinsam von deutschem und israelischem Partner in Israel durchgeführten Arbeiten zur Hemmung der Nitrifikation

- zusätzlichen, kurzzeitig wirkenden Umweltfaktoren
- der Stressphysiologie und Adaptation von Nitrifikanten

6.2 Umwelteinflüsse auf Nitritoxidierer

Einsatz allochthoner Biosensoren

Die vorab im Rahmen des Projektes durchgeführten Analysen zeigten, daß bei der Nitrifikation im Maale Kishon die Nitritoxidation langfristig von der Ammoniak-oxidation entkoppelt wurde. Wie zuvor dargestellt wurde ist unklar, ob die autochthonen Nitritoxidierer permanent gehemmt wurden oder ausgedehnte Anpassungsphasen benötigen, um die Nitritbildung durch Ammoniakoxidierer zu kompensieren. Deshalb wurde eine Serie von Laborexperimenten durchgeführt, bei denen allochthone *Nitrobacter winogradskyi* bekannter Aktivität den Gewässerproben zugesetzt wurden. Diese Bakterien wurden in einem verdunkelten Retentostaten vorkultiviert. Der Retentostat gewährleistete die kontinuierliche Produktion aktiver bakterieller Biomasse bei hohen Zelldichten. Die weiteren Versuche wurden daraufhin mit gefilterten Wasserproben aus dem Maale Kishon durchgeführt, die mit aktiven *Nitrobacter*-Populationen angereichert wurden. (Die Filtration entfernte grobe Partikel; i.W. Algen und Zooplankton)

6.3 Hemmung der Nitritoxidierer durch Licht

In 2 l-Glaszylindern mit 8 cm Durchmesser wurde der Boden mit Sediment aus dem Maale Kishon bedeckt, die Zylinder mit filtriertem Probenwasser befüllt, das aufgewirbelte Sediment absetzen gelassen und die Wasserprobe mit 10^7 *Nitrobacter*-Zellen/ml beimpft. Die Zylinder waren mit Aluminiumfolie umwickelt um seitlichen Lichteinfall zu verhindern. Pro Versuch wurden 2 Zylinder völlig verdunkelt und 2 Zylinder oben offen gelassen was einen Lichteinfall mit von $700-1000 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ erlaubte. Die Zylinder wurden mit Druckluft ohne Aufwirbelung des Sediments belüftet. Es wurden 3 Versuchsserien durchgeführt (Mai bis Juli '97). Die verschiedenen Parameter (Ammonium, Nitrit, Nitrat, Sauerstoff, $\text{pH}<8$) wurden täglich zweimal gemessen und der pH-Wert nachreguliert.

Ein typischer Experimentverlauf ist in Abbildung 9A dargestellt. Die anfänglich niedrige Ammoniakoxidationsrate ist auf die Ausdünnung der Nitrifikantenpopulation durch die Filtration zurückzuführen. Nach Erholung wurden dann in den verschiedenen Gewässerproben Oxidationsraten zwischen $3,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($\text{NH}_x\text{-N}$) und $9,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ ($\text{NH}_x\text{-N}$) gemessen. Ein Effekt der Belichtung auf die Ammoniakoxidation wurde nicht nachgewiesen (6 Parallelen, Mann-Whitney U-test; $p=0,52$). Theoretisch hätte damit die angeimpfte aktive *Nitrobac-*

ter-Population die Nitritbildung durch Ammoniakoxidation kompensieren müssen. Stattdessen beobachteten wir innerhalb von 5 bis 10 Tagen in den belichteten Kulturen eine NO_2^- -N-Akkumulation auf 12%-27% der eingesetzten NH_4^+ -N-Konzentration, während in den völlig verdunkelten Ansätzen nur 5% Nitrit akkumulierte und zugegebene geringe Nitritmengen oxidiert wurden. Weitere Zugaben von Ammonium führten dann aber auch in den verdunkelten Ansätzen zur äquivalenten Anreicherung von Nitrit (s. Abb. 9B). Damit ist es wahrscheinlich, daß zusätzliche Faktoren insbesondere die Nitritoxidation durch *Nitrobacter* inhibierten oder limitierten.

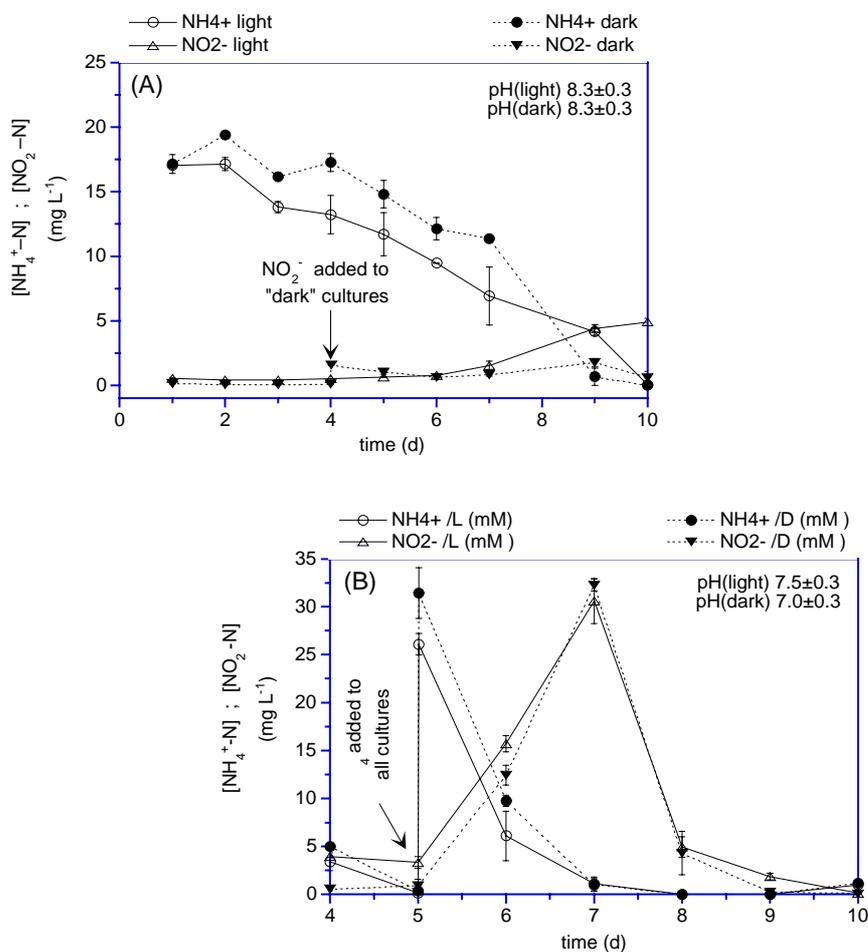


Abbildung 9: Nitrifikation in belüfteten Wasserproben (1,5 L) from Maale Kishon, die mit 10^7 Zellen mL^{-1} aktiven *Nitrobacter winogradskyi* angereichert und bei Tageslicht ($900 \text{ mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) oder Dunkelheit inkubiert wurden. A) Anfängliche Nitrifikationsphase B) Nitrifikation nach zusätzlicher Gabe von 14 mg L^{-1} NH_4^+ -N und pH-Einstellung auf 7 bis 7.5. (Nicht dargestellt: NO_3^- -N akkumulierte auf über 80% der eingesetzten Ammoniumkonzentration wenn Nitrit vollständig oxidiert wurde). Fehlerbalken zeigen obere und untere Meßwerte bei Doppelansätzen.

6.4 Hemmung der Nitritoxidierer durch Ammoniak (NH₃)

Im Maale Kishon wurden bis zu 2.24 mg L⁻¹ NH₃-N bei pH>8 ermittelt. In vorausgegangenen Untersuchungen an Laborkulturen haben wir festgestellt, daß bei dieser Konzentration eine 50% Reduktion der Sauerstoffverbrauchsrate (=Nitritoxidationsrate) von *Nitrobacter* zu erwarten ist, während der No-effect-Level unter 0,07 mg L⁻¹ NH₃-N liegt. Deshalb testeten wir, ob anhaltende moderate Ammoniakkonzentrationen (0,7 mg L⁻¹ NH₃-N), wie sie häufig für das Maale Kishon zu erwarten waren, die Nitritoxidation langfristig hemmen. Es stellte sich jedoch heraus, daß bei hohen pH-Werten und 0,7 mg L⁻¹ NH₃-N nur anfänglich und vorübergehend die Nitritoxidation gehemmt wurde und nach spätestens 2 Wochen eine vollständige Adaptation eintrat (s. Abb. 10).

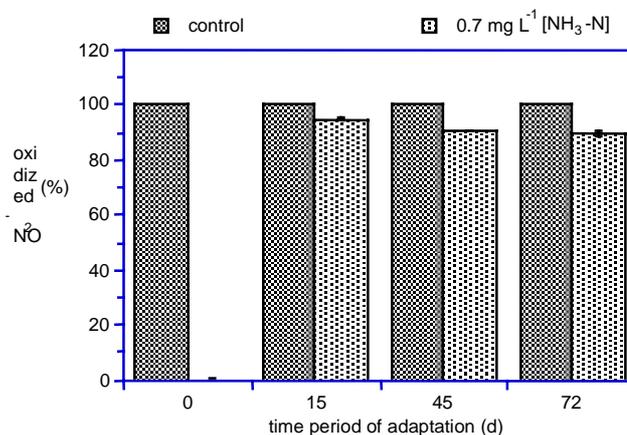


Abbildung 10: Nitritoxidation innerhalb von 3 Tagesperioden in Wasserproben nach Zugabe von aktiven *Nitrobacter winogradskyi* und in Anwesenheit von 0,7 mg NH₃-N. Die Wasserproben wurden mit 10⁸ Zellen mL⁻¹ bei 0 d beimpft. Zu den Zeitpunkten 0d, 15d, 45d und 72d wurden 7 mg L⁻¹ NO₂⁻-N (Endkonzentration) Zugegeben. Die Kontroll-Ansätze enthielten kein NH₃ oder NH₄⁺. Der pH wurde auf pH 8.0±0.1 eingestellt. Die Daten beziehen sich auf Mittelwerte von Doppelbestimmungen, die Abweichungen lagen unter 1%.

6.5 Nitritoxidation und Eisenverfügbarkeit

Die Routine-Qualitätskontrolle des Reservoirwassers (Kishon Monitoring Project 1985-1996) zeigte anscheinend optimale Wachstumsbedingungen für Mikroorganismen und Algen an. Allerdings fehlten Informationen zur Bioverfügbarkeit von Eisen. Deshalb untersuchten wir, ob Zugaben von 200 µg L⁻¹ Fe³⁺ und aktiven *Nitrobacter*-Zellen zu filtrierten Wasserproben die Nitritoxidation förderten (3 Versuchsreihen, Doppelbestimmungen; pH 8.3±0.2, 21±1.4 mg L⁻¹ NH₄⁺-N). Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 dargestellt. Bei hohen Nitritkonzentrationen (207 mg L⁻¹ NO₂⁻-N) führte die Eisenzugabe zu gleichen Nitritoxidationsraten im

Kontrollansatz mit *Nitrobacter* Mineralmedium und den Ansätzen mit Gewässerproben, während ohne Eisenzugabe nur 50% der Oxidationsrate der Kontrollen gemessen werden konnte. Bei niedrigen, Maale Kishon typischen Nitritkonzentrationen ($8,4 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_2^- \text{-N}$) erhöhte Eisenzugabe die Nitritoxidraten um 21% (Mann-Whitney U-test, 6 samples; $p=0,05$). Da die Eisenverfügbarkeit auch pH-abhängig ist und die Effekte mit hohen Ammoniakkonzentrationen wechselwirken können, stellten wir in einem Vergleichsexperiment pH $7,3 \pm 0,1$ (statt pH 8,3) ein. Unter diesen Bedingungen konnten wir keinen Unterschied zwischen Kontrolle und Gewässerproben mit und ohne Eisenzugabe messen. Ebenso führte Eisenzugabe zu Wasserproben, die am Ende der Bewässerungsperiode (September 97) gezogen wurden und einen hohen Trübstoffanteil besaßen zu keinem Effekt (Daten nicht dargestellt). Wir können aus den Ergebnissen schließen, daß Eisenmangel einen begrenzten Einfluß auf die Nitritoxidation hat und insbesondere kurzzeitige Variationen mitbegründen kann, da die Eisenverfügbarkeit an den pH-Wert gekoppelt ist und damit auch mit der kurzfristigen Hemmung durch Ammoniak interagiert.

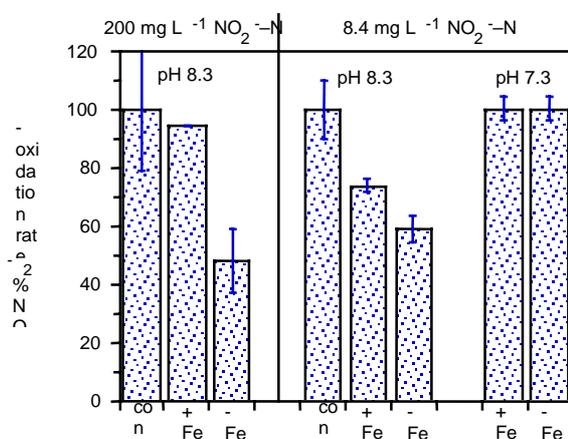


Abbildung 11: Einfluß der Zugabe von Eisen ($207 \mu\text{g L}^{-1} [\text{Fe}^{3+}]$) und *Nitrobacter winogradskyi* (10^7 Zellen mL^{-1}) auf die Nitritoxidation in Wasserproben vom Maale Kishon. Kontrollansätze (Con) wurden mit Nährmedium durchgeführt. "+Fe" und "-Fe" kennzeichnen die Ansätze mit und ohne Eisenzugabe. Die Daten umfassen drei Versuchsreihen mit Doppelansätzen. Die Fehlerbalken kennzeichnen die Standardabweichung.

6.6 Fazit

Die Untersuchungen haben bestätigt, daß Licht einen wesentlichen Hemmfaktor der Nitrifikation im Maale Kishon darstellt. Anscheinend werden insbesondere die Populationen nitritoxidierenden Bakterien gehemmt. Zumindest kurzfristig (Tage - Wochen) können unterschied-

liche Umweltfaktoren die Nitritoxidation zusätzlich hemmen bzw. limitieren: hohe pH-Werte, hohe Ammoniakkonzentrationen, mangelnde Eisenverfügbarkeit. Es ist nicht auszuschließen, daß weitere (noch unbekannt) Faktoren einwirken, die neben der Nitrifikation auch offenbar das Algenwachstum limitieren.

7. Reaktivierung von *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* nach Streß

Nicht nur im Maale Kishon Reservoir, sondern auch in Flüssen, [SCHMITH ET AL. (1997)], Belebtschlammanlagen [RANDALL UND BUTH (1984)], Trinkwassersysteme [CSANADY (1992)] und Böden kommt es gelegentlich zur Nitritanreicherung.

Als Ursache kommen unterschiedliche Wachstumsraten der Ammoniak- und Nitritoxidierer, Substrat- und Produktinhibierung und reduzierte oder fehlende Aktivität der Nitritoxidierer in Betracht. Ein weiterer Grund könnte das unterschiedliche Reaktivierungsvermögen der vorhandenen Ammoniak- bzw. Nitritoxidierer nach Streßsituationen sein. (Immerhin wurden im Maale Kishon Reservoir zu jeder Jahreszeit Ammoniak- und Nitritoxidierer nachgewiesen, aber offenbar inaktiv, weil die Stoffwechselprodukte Nitrit und Nitrat nicht meßbar waren.)

Insbesondere längere Zeiträume ohne energieliefernde Substrate müssen in natürlichen und technischen Ökosystemen überdauert werden. Im Maale Kishon Reservoir herrscht zwar kein Substratmangel für Ammoniakoxidierer, aber die Inaktivität, durch welche Faktoren auch immer herbeigeführt, setzt eine Reaktivierung im Frühjahr voraus, weil dann tatsächlich Nitrit gemessen wird. Für *Nitrobacter* bzw. die Nitritoxidierer gilt, daß sie lange Zeiten ohne energielieferndes Substrat überdauern müssen.

Um festzustellen, ob Ammoniakoxidierer und Nitritoxidierer eventuell unterschiedliche Anpassungsstrategien haben, um Hungerperioden zu meistern, führten wir Versuche mit Reinkulturen von *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter winogradskyi* durch, die im Retentostat, unterschiedlich lange Perioden ohne Substratzufuhr ausgesetzt wurden.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind als Teil einer größeren Publikation zusammen mit der Vrije Universiteit Amsterdam veröffentlicht und als Kopie beigefügt. (Anhang 1)

Zusammenfassend fanden wir, daß die spontane Aktivität (gemessen als Sauerstoffverbrauch nach erneuten Substratpuls) von sowohl *Nitrosomonas* als auch *Nitrobacter* mit zunehmender Hungerdauer abnahm, diese Abnahme für *Nitrobacter* aber erheblich schneller erfolgte.

Entsprechend schneller erholte sich die Aktivität von *Nitrosomonas* im Vergleich zu *Nitrobacter* nach Hungerphasen. Versuche mit der Proteinensynthese Inhibitor Chloramphenicol

lassen den Schluß zu, daß in *Nitrobacter* zur Wiedererlangung und Aufrechterhaltung der Aktivität eine Neusynthese von Proteinen erforderlich ist.

Zusammen mit dem israelischen Partner konnte gezeigt werden, daß *Nitrosomonas* auch nach fast einem Jahr im Hungerzustand die Fähigkeit nicht verloren hatte, Ammoniak oder Hydroxylamin spontan zu Nitrit zu oxidieren, ohne daß dafür eine Proteinsynthese notwendig war. Gehungerte Zellen von *Nitrosomonas* behalten über lange Zeit hohe aktive Konzentrationen der Schlüsselenzyme Ammoniumoxygenase und Hydroxylaminoxidoreduktase. Diese Ergebnisse sind veröffentlicht in Journal of Biochemistry und als Kopie beigelegt. (Anhang 2)

8. Zusammenfassung

Zur Aufklärung von bakterienphysiologischen Mechanismen, die zur Akkumulation von Nitrit in Abwasserspeicherbecken in Israel führen, haben wir eine Reihe von Experimenten mit Rein- und Mischkulturen von *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter winogradskyi* durchgeführt. Weitere Untersuchungen fanden mit Originalwasser des Speicherbeckens und autotrophen Organismen vor Ort in Israel statt. Nach Analysen vorliegender Daten des israelischen Projektpartners wurden folgende Untersuchungsschwerpunkte identifiziert:

- Einfluß des Lichts auf die Nitrifikantenaktivität
- Einfluß von erhöhten Ammoniakkonzentrationen
- Möglicher Nährstoffmangel
- Adaptationsvermögen der Nitrifikanten

Eine statistische Analyse der vorhandenen physikalischen, chemischen und biologischen Daten des Maale Kishon Reservoirs führten zu der Ansicht, daß die Lichteinstrahlung die Nitrifikanten inhibiert und hier insbesondere die Nitritoxidierer. Versuche im Labor mit Wasser vom Maale Kishon unter kontrollierten Bedingungen (pH, Sauerstoff, Licht) bestätigten eine mögliche, vornehmliche Hemmung der Nitritoxidation durch Licht. Allerdings sind Licht und Temperatur nicht als alleinige Faktoren für das Unterbleiben von Nitrifikation (und Algenwachstum) anzusehen, da bei längerer Kultivierung im Laborversuch auch im Dunkeln eine Nitritanreicherung nach vorausgegangener Ammoniumzugabe beobachtet wurde.

Der Nitritoxidierer *Nitrobacter winogradskyi* wurde ab einer Konzentration von 0,05 – 0,1 mg NH₃/L in der Respirationsleistung beeinträchtigt. Eine 50% Hemmung der Respirationsleistung wurde bei 2,6 mg NH₃/L erreicht. Im Maale Kishon Speicherbecken mit Ammoniakkonzentrationen

trationen bis zu 2,3 mg NH₃ wäre demnach die Nitritoxidation inhibiert. Maale Kishon Wasser mit 0,7 mg NH₃/L, angeimpft mit aktiven *Nitrobacter* Zellen, bewirkte zunächst eine vollständige Hemmung der Aktivität des Nitritoxidierer. Nach 15 Tagen war die Inhibierung nicht mehr nachweisbar und die vollständige Aktivität der Nitrobacterkultur läßt auf eine Adaption schließen. Mehrstündige pH-Wert-Anhebungen führten zu Nitritakkumulation, jedoch war die Hemmung der Nitritoxidationsrate durch diese pH-Werte-Erhöhung und die hohen Ammoniakkonzentrationen voll reversibel. Die Ammoniakoxidationsleistung war dagegen nachhaltig vermindert.

Die Zugabe von Eisen hatte einen positiven Einfluß auf die Oxidationsaktivität von *Nitrobacter* in Maale Kishon Wasser bei einem pH-Wert von 8,3. Demnach könnte sich die Bioverfügbarkeit von Eisen im Reservoir limitierend auf das Wachstum von autotrophen Mikroorganismen auswirken.

Nach Streßperioden reaktiviert der Ammoniakoxidierer *Nitrosomonas europaea* wesentlich schneller als der Nitritoxidierer *Nitrobacter winogradskyi*. Das kann damit begründet werden, daß *Nitrosomonas*, die für die Oxidations von HN₃ notwendige Enzyme konserviert, während *Nitrobacter* die notwendigen Proteine neu synthetisieren muß. Die unterschiedliche Reaktivierungsgeschwindigkeit kann eine zusätzliche Ursache für Nitritakkumulation sein.

9. Schlußfolgerung

Im Brauchwasserreservoir Maale Kishon treffen offenbar mehrere Faktoren zusammen, die eine vollständige Nitrifikation unterbinden. Wenn eine vollständige Nitrifikation angestrebt wird, müssen Bedingungen geschaffen werden, die ein ausgewogenes Wachstum beider Nitrifikanten-Gruppen erlauben. Dazu gehört die Einrichtung von Zonen, die ein Ausschluß intensiver Sonnenstrahlung ermöglichen und das Einbringen von Aufwuchskörpern, die einen Aufbau von nitrifizierenden Biofilmen mit hohen Biomassedichten erlauben.

Vorstellbar wären Flöße mit nach unten hängenden Kunststoffaufwuchskörpern, wie sie aus der Klärtechnik bekannt sind.. Einfacher zu realisieren (aber kostspieliger) wäre allerdings, wenn das gereinigte Abwasser mit dem das Reservoir befüllt wird, vorher vollständig nitrifiziert würde.

Eine weitreichende Entleerung des Speicherbeckens (etwa unter 2 m Wassertiefe) sollte vermieden werden, um vorhandene suspendierte Biomasse nicht auszuwaschen, Umweltstreß zu vermindern und kürzere Regenerationszeiten zu gewährleisten.

10. Literatur

- Abeling U. and Seyfried C.F.** (1992) : Anaerobic-aerobic treatment of high-strength ammonium wastewater - nitrogen removal via nitrite. *Wat. Sci. Tech.* 26 (5-6) : 1007-1015
- Abeliovich A.** (1987) : Nitrifying bacteria in wastewater reservoirs. *Appl. Environ. Microbio.* 53 (4) : 754-760
- Abeliovich A. and Vonshak A.** (1993) : Factors inhibiting nitrification of ammonia in deep wastewater reservoirs. *Wat. Res.* 27 (10) : 1585-1590
- AGA** (Allgemeine Güteanforderungen für Fließgewässer), Entscheidungshilfe für die Wasserbehörden in wasserrechtlichen Erlaubnisverfahren. RdErl. d. Ministeriums f. Umwelt, Raumordnung u. Landwirtschaft (NRW) v. 14.5.1991
- Alleman J.E.** (1984) : Elevated nitrite occurrence in biological wastewater treatment systems. *Wat. Sci. Tech.* 17 : 409-419
- Anthonisen A.C., Loehr R.C., Prakasam T.B.S. and Srinath E.G.** (1976) : Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Water Pollut. Control Fed. J.* 48 : 835-852
- Antoniou P., Hamilton J., Koopman B., Jain R., Holloway B., Lyberatos G. and Svoronos S.A.** (1990) : Effect of temperature and pH on the effective maximum specific growth rate of nitrifying bacteria. *Wat. Res.* 24 (1) : 97-101
- Azimi A.A. and Horan N.J.** (1991) : The influence of reactor mixing characteristics on the rate of nitrification in the activated sludge process. *Wat. Res.* 25 (4) : 419-423
- Azov Y. and Tregubova T.** (1995) : Nitrification processes in stabilisation reservoirs. *Wat. Sci. Tech.* 31 (12) : 313-319
- Balmelle B., Nguyen K.M., Capdeville B., Cornier J.C. and Deguin A.** (1992) : Study of factors controlling nitrite build-up in biological processes for water nitrification. *Wat. Sci. Tech.* 26 (5-6) : 1017-1025
- Bergeron P.** (1978) : Untersuchungen zur Kinetik der Nitrifikation. *Karlsruher Berichte zur Ingenieurbiologie*, Heft 12. Dissertation Universität Karlsruhe
- BMBF Forschungsbericht, Kaplan D. and Teltsch B.** (17.2.1997) : Unbalanced nitrogen fluxes during the nitrification process in wastewater reservoirs. Joint german-israeli research project
- Bock E., Koops H.-P., Harms H. and Ahlers B.** (1991) : The biochemistry of nitrifying organisms. In: *Variations in autotrophic life* (ed. by Shively J.M. and Barton L.L.). Academic Press Ltd, London : 171-199
- Bock E.** (1965) : Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung sichtbaren Lichtes auf *Nitrosomonas europaea* und *Nitrobacter winogradskyi*. *Arch. Mikrobiol.* 51 : 18-41
- Bock E.** (1980) : Nitrifikation - die bakterielle Oxidation von Ammoniak zu Nitrat. *forum mikrobiologie* 1/80 : 24-32
- Bock E., Koops H.-P., Harms H. and Ahlers B.** (1991) : The biochemistry of nitrifying organisms. In: *Variations in autotrophic life* (ed. by Shively J.M. and Barton L.L.). Academic Press Ltd, London : 171-199
- Both G.J., Gerards S. and Laanbroek H.J.** (1992) : Kinetics of nitrite oxidation in two *Nitrobacter* species grown in nitrite-limited chemostats. *Arch. Microbiol.* 157 : 436-441

- Csanady, M.** (1992) Nitrie formation and bacteriological deterioration of water quality in distribution networks. *Water Supply* 10: 39-53
- Dombrowski T.** (1991) : Kinetik der Nitrifikation und Reaktionstechnik der Stickstoffeliminierung aus hochbelasteten Abwässern. *Fortschr.-Ber. VDI Reihe 15: Umwelttechnik*, Nr. 87, VDI-Verlag, Düsseldorf
- Fdz-Polanco F., Villaverde S., García P.A.** (1994) : Temperature effect on nitrifying bacteria activity in biofilters: Activation and free ammonia inhibition. *Wat. Sci. Tech.* 30 (11) : 121-130
- Gupta S.K. and Sharma R.** (1996) : Biological oxidation of high strength nitrogenous wastewater. *Wat. Res.* 30 (3) : 593-600
- Hanaki K., Wantawin C. and Ohgaki S.** (1990) : Nitrification at low levels of dissolved oxygen with and without organic loading in a suspended-growth reactor. *Wat. Res.* 24 (3) : 297-302
- Hegemann W.** (1993) : Grundlagen der biologischen Stickstoffeliminierung und Verfahrensüberblick. In: *Stickstoffeliminierung aus höher belasteten Abwässern. Kolloquium an der TU Berlin*, 19. bis 20. November 1992. Schriftenreihe Biologische Abwasserreinigung 2, TU Berlin : 3-14
- Laanbroek H.J. and Gerards S.** (1993) : Competition for limiting amounts of oxygen between *Nitrosomonas europaea* and *Nitrobacter winogradskyi* grown in mixed continuous cultures. *Arch. Microbiol.* 159 : 453-4
- Mobarry B.K., Wagner M., Urbain V., Rittmann B.E. and Stahl D.A.** (1996) : Phylogenetic probes for analyzing abundance and spatial organization of nitrifying bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (6) : 2156-2162
- Müller-Neuglück M. und Engel H.** (1961) : Photoinaktivierung von *Nitrobacter winogradskyi* Buch. *Arch. Mikrobiol.* 39 : 130-138
- Nolting B.** (1989) : Simultane Stickstoff- und Phosphorelimination in einstufigen Belebungsanlagen - Einflußparameter, Randbedingungen, Wechselwirkungen -. Verein zur Förderung des Lehrstuhls für Wasserwirtschaft und Umwelttechnik II (Siedlungswasserwirtschaft) an der Ruhr-Universität Bochum e.V. (Hrsg.). *Schriftreihe Siedlungswasserwirtschaft Bochum*, 16
- Nyhuis G.** (1985) : Beitrag zu den Möglichkeiten der Abwasserbehandlung bei Abwässern mit erhöhten Stickstoffkonzentrationen. *Veröffentlichungen des Institutes für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik*, Heft 61, Universität Hannover
- Painter H.A.** (1986) : Nitrification in the treatment of sewage and waste-waters. In: *Nitrification* (ed. by Prosser J.I.), Special publications of the Society for General Microbiology, Vol. 20, IRL Press, Oxford : 185-211
- Pirsing A. und Wiesmann U.** (1994) : Dynamische Modellierung des pH-Einflusses bei der Nitrifikation hochbelasteter Abwässer. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 22 (6) : 270-279
- Randall C.W. and Buth D.** (1984a) : Nitrite build-up in activated sludge resulting from temperature effects. *Water Pollut. Control Fed. J.* 56 (9) : 1039-1044
- Randall C.W. and Buth D.** (1984b) : Nitrite build-up in activated sludge resulting from combined temperature and toxicity effects. *Water Pollut. Control Fed. J.* 56 (9) : 1045-1049
- Rheinheimer G., Hegemann W., Raff J., Sekoulov I.** (Hrsg.) (1988) : Stickstoffkreislauf im Wasser, Stickstoffumsetzungen in natürlichen Gewässern, in der Abwasserreinigung und Wasserversorgung. R. Oldenbourg Verlag, München

Richardson M. (1985) : Nitrification inhibition in the treatment of sewage. Royal Society of Chemistry and Thames water, London

Schlegel H.G. (1992) : Allgemeine Mikrobiologie. 7. Aufl., Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Schmith R.V.; Burns, L.C.; Doyle, R.M.; Lennox, S.D.; Kelso, B.H.L.; Foy, R.H.; Stevens, R.J. (1997) Free ammonia inhibition of nitrification in river sediments leading to nitrite accumulation. J. Environ. Qual. 26: 1514-1521

Szwerinski H., Arvin E. and Harremoës P. (1986) : pH-decrease in nitrifying biofilms. Wat. Res. 20 (8) : 971-976

Tappe W., Tomaschewski C., Rittershaus S. and Groeneweg J. (1996) : Cultivation of nitrifying bacteria in the retentostat, a simple fermenter with internal biomass retention. FEMS Microbiology Ecology 19 : 47-52