

Verfahrenstechnische und mikrobiologische Optimierung von Biofiltersystemen in Aquakulturanlagen

Projektphase III - Abschlussbericht
AZ: 23821/03

Bewilligungsempfänger und Projektleitung:
Burkard T. Watermann

LimnoMar- Labor für limnische/marine Forschung und vergleichende Pathologie
Bei der Neuen Münze 11 - 22145 Hamburg



Weitere Autoren: Sabine Keuter, Simon Klatt, Jan Schröder,
Jürgen Schrötz, Eva Spieck, Sven Würtz

Hamburg, Oktober 2012

gefördert durch



Deutsche Bundesstiftung Umwelt

Projektkennblatt
der
Deutschen Bundesstiftung Umwelt



AZ	23821/03	Referat	23	Fördersumme	252.505,00 €
----	-----------------	---------	-----------	-------------	---------------------

1 Antragstitel

Verfahrenstechnische und mikrobiologische Optimierung von Biofiltersystemen in Aquakulturanlagen

Stichworte Abwasser, Kreislauf, Marikultur

Laufzeit	Projektbeginn	Projektende	Projektphase(n)
24 Monate	01.01.2010	31.05.2012	3

Zwischenberichte Phase II Zwischenbericht und Abschlussbericht, August 2009

Bewilligungsempfänger LimnoMar- Labor für limnische/marine Forschung und vergleichende Pathologie Burkard T. Watermann Bei der Neuen Münze 11 D - 22145 Hamburg	Tel 040-678 9911
	Projektleitung Herr Watermann
	Bearbeiter

Kooperationspartner

GMA Gesellschaft für marine Aquakultur, Büsum
 Universität Hamburg, Abteilung Mikrobiologie und Biotechnologie
 Universität Duisburg-Essen, Campus Duisburg – Biofilm Centre, Abteilung Aquatische Biotechnologie
 GEA 2H Water Technologies, Wetztingen
 Kunststoff Spranger GmbH, Plauen

1.1 Zielsetzung und Anlass des Vorhabens

Bei wachsendem wirtschaftlichem und ökologischem Interesse an Aquakulturen fokussiert sich die angewandte Anlagentechnik zunehmend auf nachhaltige Produktionsverfahren mit integrierter Wasseraufbereitung („Kreislaufanlagen“). Für die verfahrenstechnische Umsetzung eines wesentlichen Prozesses der biologischen Wasseraufbereitung - die bakterielle Nitrifikation (Oxidation der fischtoxischen Stickstoffverbindungen Ammonium und Nitrit zum wesentlich unschädlicheren Nitrat) - fehlen gesicherte Kennzahlen für die Auslegung und den Betrieb, denn besonders in der Startphase eines Biofilters kann es zu der Akkumulation von Ammonium oder Nitrit kommen. Ziel des Projektes war es, einige wichtige dieser Kennzahlen bereitzustellen.

1.2 Darstellung der Arbeitsschritte und der angewandten Methoden

In der 3. Projektphase wurden verschiedene Kunststoffe und Zuschläge auf ihre Eignung für Marikultur-Kreislaufanlagen in Bezug auf die Anheftung und Hydrophobizität überprüft. Des Weiteren wurden Füllkörperoberflächen durch einfache Behandlungen konditioniert und der Effekt mittels Aktivitätstests ermittelt. Verschiedene gängige Kunststoffe wurden auf ihre hormonelle Wirkung mittels YES/YAS Test überprüft. In Hinblick auf eine mögliche Beeinträchtigung des Umsatzes im Biofilter wurde die Toleranz gegenüber dem Stoffwechselprodukt Nitrat und den Reaktionsprodukten von Ozon an Referenzorganismen im Labor und in Versuchsanlagen der GMA getestet. Die Nitrifikation in der Anlaufphase in vier von der Fa. Spranger konzipierten und bereitgestellten Bewegtbett-Reaktoren, die jeweils über ein alternatives Belüftungsverfahren verfügen, wurde untersucht. Die Einlaufphase von drei Biofiltern der GMA mit unterschiedlichen initialen Fütterungen (Mineralsalze/Fischfutter) wurde über >1 Jahr mit Aktivitätstests und Identifizierung der nitrifizierenden Gemeinschaft begleitet. Die Anreicherung Ammoniak oxidierender Bakterien aus der Ecomares Anlage wurde fortgesetzt. Benutzte Füllkörper wurden bis zu einem Jahr unter verschiedenen Bedingungen gelagert und deren Restaktivitäten bestimmt. Ein Bioreaktor mit online-Überwachung der wichtigsten Parameter wurde gefertigt und die heterotrophe Begleitfauna auf Füllkörpern mittels MPN quantifiziert.

1.3 Ergebnisse und Diskussion

Es konnte eine Formulierung für Kunststoffe als vorteilhaft gegenüber Vergleichsmaterialien herausgestellt werden, welche von der GEA 2H Water Technologies zur Herstellung von Füllkörpern (FK) verwendet werden kann. Neben der quantitativen Bestimmung der Anheftung von Bakterien konnten Polysaccharidkomponenten in der EPS der Referenzorganismen durch Lektinfärbung visualisiert werden. Die Oberflächen aller untersuchten Kunststoffe wurden als hydrophob charakterisiert. Es stellte sich heraus, dass die Behandlung von neuen Füllkörpern mit verschiedenen Methoden (z.B. UV, Säure, Tannin, Harnstoff) keine bessere Anheftung von nitrifizierenden Bakterien (AOB und NOB) bewirkt. Allein die Verwendung bereits benutzter und gesäuberter FK zeigte eine solche Wirkung im Vergleich zu neuen FK. Mittels YES/YAS Test wurde nur eine sehr geringe hormonelle Wirkung durch Substanzen in den untersuchten Kunststoffen gemessen. Versuche mit verschiedenen Nitratkonzentrationen in Versuchsreaktoren zeigten, dass schon bei 125 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$ die Nitrit-Oxidation beeinträchtigt werden kann; die Unterschiede waren allerdings erst ab 500 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$ signifikant. Dennoch scheinen die NOB sensibler auf hohe Nitratkonzentrationen zu reagieren als AOB, bei denen eine Reduzierung der Ammoniak-Oxidation erst bei 500 mg/l $\text{NO}_3\text{-N}$ nachgewiesen wurde. Steinbutte wurden bereits durch 125 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$ in ihrem Wachstum beeinträchtigt. Anders als bei hohen Nitratwerten wurde eine leichte Erhöhung der Nitrifikationsleistung durch TRO Konzentrationen von 0,05 bis 0.15 mg/l Cl_2 gemessen. Die optimale Ozondosierung wird durch die Fischgesundheit limitiert. Die Verringerung der Belüftung durch reduzierte Einblastiefe oder mechanische Durchmischung erwies sich als für NOB von Vorteil während der Einlaufphase, die AOB dagegen zeigten geringere Aktivitäten bei mechanischer Durchmischung und Intervall-Belüftung. Die Langzeituntersuchungen der Einlaufphasen von 3 baugleichen Biofiltern zeigten, dass Aktivitätstests im Labor ein geeignetes Werkzeug sind, um die Entwicklung von Nitrifikationspotentialen zu verfolgen. Solange keine Fische eingesetzt werden, ist eine sehr hohe Gabe an Ammonium und Nitrit zu empfehlen, um anfängliches Wachstum zu unterstützen. Die unterschiedlichen Methoden der Beimpfung hatten keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der NOB; die dominierenden AOB Stämme in dem mit und ohne Futter beimpften Modulen waren jedoch unterschiedlich. Es ist möglich, dass Futter oder andere organische Substanzen das Wachstum von NOB beschleunigen. Ozon sollte erst eingeleitet werden, wenn die Menge der Substanzen, die dem Nitrit gegenüber bevorzugt oxidiert werden (z.B. Gelbstoffe), ausreichend ist, um den NOB genug Substrat zum Wachstum zu lassen. Die Identifikation der beteiligten Bakterien zeigte, dass sich vor allem NOB aus 3 verschiedenen Gattungen an die FK angeheftet haben, aber nur AOB aus der Gattung *Nitrosomonas*. *Nitrospira* dominiert die Nitrit-Oxidation, wobei bis zu 100% Sequenzähnlichkeiten mit dem zuvor isolierten *Nitrospira* aus der Ecomares Anlage gefunden wurden. Ein AOB sowie ein weiterer *Nitrospira* aus der Ecomares Anlage konnten hoch angereichert werden. Füllkörper, die in Meer- und Leitungswasser bei 4° und 17 °C gelagert wurden, zeigten noch relativ hohe Restaktivitäten auch nach mehreren Monaten, wobei die der NOB stets höher als die der AOB waren. Trockene Lagerung bei 17°C verminderte die Nitrifikationsleistung am stärksten. Ein Bioreaktor wurde konstruiert und eine dauerhafte Online-Überwachung mittels potentiometrischer Messung war (bedingt) möglich. Auf den FK waren Bakterien des Schwefel-, des Stickstoff-, des Eisen- und des Mangankreislaufes sowie heterotrophe Pilze und Bakterien in z.T. sehr hohen Zellzahlen nachweisbar.

1.3.1 Öffentlichkeitsarbeit und Präsentation

Die Ergebnisse aus dem Projekt wurden national und international in 6 Zeitschriften-Artikeln veröffentlicht und in 7 Vorträgen und auf 8 Postern präsentiert. Zudem wurden 4 Graduationsarbeiten angefertigt.

1.3.2 Fazit

Die vielseitigen Untersuchungen zur Nitrifikation im Rahmen des DBU Projektes haben zu Erkenntnissen geführt, die zur Optimierung solcher Anlagen beitragen und dadurch die Anwendung der Kreislauftechnik in der Aquakultur attraktiver macht. Dabei sind Erkenntnisse zur Anheftung, Lagerung von bewachsenen Füllkörpern, Nitrat- und Ozonhemmung sowie Belüftung erlangt worden. Dominierende Nitrifikanten konnten identifiziert und in Laborkultur gebracht werden. Neue Ansätze für Einlaufphasen wurden konzipiert, mikrobiologisch begleitet und bewertet. Die Ergebnisse der Laborexperimente wurden erfolgreich auf Versuchsreaktoren übertragen und können zum Teil direkt von Betreibern von marinen Anlagen bzw. bei der Herstellung von Füllkörpern verwendet werden.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	1
Einleitung	3
Untersuchungen zur Optimierung von Kunststoff - Trägermaterialien	7
Freisetzung endokrin wirksamer Substanzen aus ausgesuchten Füllkörpern	22
Einfluss der Ozonisierung auf die Nitrifikationsleistung eines Bewegtbett - Filters	25
Einfluss der Nitrat - Konzentration auf die Nitrifikationsleistung eines Bewegtbett - Filters	29
Einfluss der Belüftungsintensität auf die Nitrifikationsleistung eines Bewegtbett - Filters	31
Untersuchung der Startphasen von drei Bewegtbett - Filtern	34
Nitrifizierende Mikroorganismen in marinen Aquakulturanlagen	40
Lagerung von bewachsenen Füllkörpern	45
Konstruktion eines Versuchsbioreaktors mit online - Messung	48
Fazit	50
Literaturverzeichnis	51

Abkürzungen

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

Umrechnung von Stickstoff von molar zu mg/l: $1 \text{ mM N} = 14 \text{ mg/l N}$

Zusammenfassung

Für die verfahrenstechnische und mikrobiologische Optimierung von Bewegtbettfiltern (moving-bed) wurden auch in der dritten Phase des Projekts unterschiedliche Faktoren untersucht, die die Nitrifikation in den Biofiltern von Marikulturanlagen beeinflussen (können). Die Versuche wurden dabei im Anlagen- sowie Versuchsanlagen- und im Labormaßstab ausgeführt. Die Ergebnisse können zum Teil direkt von Betreibern von marinen Anlagen bzw. bei der Herstellung von Füllkörpern verwendet werden. Die erlangten Erkenntnisse bilden zudem eine gute Basis für zukünftige weitere Optimierungen. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen lag auf Einlaufphasen von Biofiltern, die bekanntlich gerade in marinen Anlagen sehr lange dauern können. Die sehr langsam wachsenden nitrifizierenden Bakterien sollen sich möglichst schnell auf den Oberflächen der Kunststoffkörper (Füllkörper) ansiedeln.

Es wurden verschiedene Kunststoffe, zum Teil mit Beimischungen oder Beschichtungen direkt durch Mikroskopie und indirekt durch Aktivitätstests daraufhin untersucht, ob sich die Bakterien bevorzugt an bestimmte Oberflächen anheften. Die Ergebnisse zeigten, dass die Art des Kunststoffes und der Additive oder Beimischungen, durchaus eine Auswirkung auf die Anheftung oder den Stoffwechsel haben. Als mögliche Faktoren wurden dabei auch die Oberflächenspannungen der Kunststoffe als auch die Wirkung von migrierenden Substanzen aus den Kunststoffen auf die Nitrifikation untersucht.

Die Behandlung von neuen Füllkörpern mit verschiedenen Methoden (z.B. UV, Säure, Tannin, Harnstoff) erwirkte keine stärkere oder schnellere Anheftung von nitrifizierenden Bakterien an die FK, die in laufenden Biofiltern inkubiert wurden. Allein die Verwendung bereits benutzter und gesäuberter FK zeigte eine solche Wirkung im Vergleich zu neuen FK.

Verschiedene Kunststoffe bzw. darin enthaltene Additive wurden auf ihre hormonelle Wirkung mittels YES/YAS Test untersucht, da hormonelle Substanzen im Systemwasser die Fische beeinträchtigen können. Es zeigten sich nur sehr geringe hormonelle Aktivitäten.

Weiterhin wurde der Effekt von hohen Nitratkonzentrationen und Ozon, bzw. TRO (total residual oxidants) auf die Nitrifikation untersucht. In Laborversuchen zeigte sich keine Wirkung von Nitrat auf Ammoniak oxidierende Bakterien (AOB), jedoch auf Nitrit oxidierende Bakterien (NOB), zum Teil in Konzentrationen, die in Anlagen zu messen sind. Die Ergebnisse der Versuche in den Versuchsanlagen deuteten auch darauf hin, dass die NOB Nitrat gegenüber empfindlicher sind. Die Nitrifikationsleistung beider Gruppen wurde bei einer Nitratkonzentration von 500 mg/L $\text{NO}_3\text{-N}$ herabgesetzt. Erhöhte Konzentrationen von TRO allerdings hatten einen positiven Effekt auf die Nitrifikationsleistung. Wie beim Nitrat bestimmt hier die Gesundheit der Fische die Grenze der Konzentrationen.

Drei baugleiche Module der GMA mit Bewegtbett-Biofiltern wurden nacheinander in Betrieb genommen und die Biofilter dabei unterschiedlich angeimpft (mit Ammoniumchlorid und Natriumnitrit, Futter und bereits bewachsene Füllkörper). Die Entwicklungen der nitrifizierenden Aktivitäten wurden mit der Zunahme an eingebrachtem Stickstoff (Futter), den Konzentrationen von Ammonium, Nitrit und Nitrat im Biofilterwasser, pH, Temperatur, gelöstem Sauerstoff und Salinität sowie anlagen- und hälterungsbedingten Ereignissen verglichen. Die Anlaufzeiten dauerten insgesamt extrem lang (> 6 Monate), wobei sich die potentiellen Nitrifikationsleistungen der AOB früher und schneller entwickelten als die der NOB. Die Aktivitäten von AOB und NOB korrelierten mit der Zunahme des Stickstoffeintrages in Form von Futter. Die unterschiedlichen Methoden der Beimpfung hatten keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der NOB; die dominierenden AOB Stämme in dem mit und ohne Futter beimpften Modulen waren jedoch unterschiedlich. Es ist möglich, dass Futter oder andere organischen Substanzen das Wachstum von NOB beschleunigen. Ozon sollte erst eingeleitet werden, wenn die Menge der Substanzen, die vom Ozon dem Nitrit gegenüber bevorzugt oxidiert werden (z.B. Gelbstoffe) ausreichend ist, um den NOB genug Substrat zum Wachstum zu lassen.

Die Identifikation der beteiligten Bakterien zeigte, dass sich vor allem NOB aus 3 verschiedenen Gattungen an die FK angeheftet haben, aber nur AOB aus der Gattung *Nitrosomonas*. *Nitrospira* dominiert die Nitrit-Oxidation, wobei bis zu 100% Sequenzähnlichkeit mit dem zuvor isolierten *Nitrospira* aus der Ecomares Anlage gefunden wurde. Ein AOB sowie ein weiterer *Nitrospira* aus der Ecomares Anlage konnten hoch angereichert werden

Restaktivitäten von AOB und NOB auf Füllkörpern wurden nach langer Lagerung (bis 1 Jahr, trocken oder in Wasser, bei 4 und 17 °C) gemessen. Füllkörper, die in Meer- und Leitungswasser bei 4° und 17 °C gelagert wurden, zeigten noch relativ hohe Restaktivitäten auch nach mehreren Monaten, wobei die der NOB stets höher waren als die der AOB. Trockene Lagerung bei 17°C verminderte die Nitrifikationsleistung am stärksten.

Ein Labor-Bioreaktor wurde konstruiert und eine dauerhafte online-Überwachung mittels potentiometrischer Messung war (bedingt) möglich. Auf den FK, die als Inokulum dienten, waren Bakterien des Schwefel-, des Stickstoff-, des Eisen- und des Mangankreislaufes sowie heterotrophe Pilze und Bakterien mit wenigen Ausnahmen und in z.T. sehr hohen Zellzahlen nachweisbar. Die höchsten Zellzahlen wurden mit Medien für Nitrat-reduzierende und Manganionen-oxidierende Bakterien gefunden.

Einleitung

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

Intensive Aquakulturen produzieren Abwässer mit vielen Abfallprodukten, insbesondere eutrophierenden Stickstoffverbindungen (1 kg Futter produziert ca. 30 g Stickstoff), die bei Durchflussanlagen in das nächst liegende Gewässer entsorgt werden. Durch die Kreislauftechnologie kann dagegen mehr als 90% des Wassers aufgereinigt werden und den Produktionsbecken wieder zugeführt werden. Weitere Vorteile der Kreislaufsysteme sind eine saisonunabhängige Produktion, die Verminderung von eingebrachten Krankheitserregern, die Reduktion von Medikamenten sowie kontrollierte Hälterungsbedingungen und damit höhere Bestandsdichten. Landbasierte Farmen können in Marktnähe produzieren, somit kann Transportenergie eingespart werden. Ebenso wird Energie bei der Produktion von Warmwasserarten gespart, da das aufgeheizte Wasser rezirkuliert.

Da das Hälterungswasser zu einem hohen Prozentsatz rezirkuliert wird, reichert sich schnell Ammonium an. Ammonium wird von Fischen oder Shrimps über die Kiemen und über den Urin ausgeschieden und ist bereits in geringen Konzentrationen giftig. Die Entfernung von fischtoxischem Ammonium erfolgt in den Biofiltern der Anlagen durch nitrifizierende Mikroorganismen, die Ammonium über das ebenfalls giftige Nitrit in das erst in sehr hohen Konzentrationen schädliche Nitrat umwandeln. Um die erwünschten nitrifizierenden Bakterien im Biofilter zurückhalten zu können, werden so genannte Füllkörper (FK) eingesetzt, die die Aufwuchsfläche für diese Mikroorganismen darstellen (Biofilm). Es handelt sich hierbei häufig um dreidimensionale Strukturen aus Kunststoff, die in den Biofiltern von Rezirkulationsanlagen im Wasser schweben und durch Einströmung von Luft verwirbelt werden (moving-bed-, Bewegtbett- oder Schwebbettverfahren). Als autotrophe Bakterien wachsen Nitrifizierer sehr langsam (Generationszeiten von > 8 h) und müssen sich im Biofilm gegenüber den schnell wachsenden heterotrophen Bakterien behaupten, besonders bei hohen Konzentrationen an organischen Substanzen (Michaud et al., 2006). Zudem sind Nitrifizierer generell sensibler z.B. gegenüber Schwankungen des pH Wertes, der Temperatur, oder der Sauerstoffkonzentration sowie Schwermetallen, etc. (Villaverde et al., 2000).

Besonders in der Startphase eines Biofilters, und hier vor allem in Meerwasseranlagen, jedoch auch im späteren Verlauf, können Verminderungen der Nitrifikationsleistung zu

Ammonium- oder Nitritpeaks führen. Wodurch es zu solchen Ausfällen in der Nitrifikation kommt, ist noch weitestgehend ungeklärt, was z.B. auch für Nitrifikationsbecken in Kläranlagen gilt.

Es gibt sehr viele Faktoren in Kreislaufanlagen, die einen Einfluss auf die Fitness und das Wachstum der nitrifizierenden Bakterien haben, und von denen einige auch noch gar nicht als solche bekannt sind. Zudem sind gerade in marinen Anlagen die beteiligten Bakteriengruppen noch wenig erforscht. Da die Investitions- und laufenden Kosten in der Kreislauftechnologie im Gegensatz zu anderen Aquakultursystemen sehr hoch sind, ist praxisnahe Forschung in diesem Bereich notwendig. Optimierungen einzelner Parameter steigern nicht nur die Attraktivität dieser Systeme insgesamt, sondern können auch im Einzelnen direkt zu Einsparungen von Energiekosten und Abwasser bzw. Frischwasser führen.

Die Forschungs-Arbeiten im DBU Projekt „Verfahrenstechnische und mikrobiologische Optimierung von Biofiltersystemen in Aquakulturanlagen“ richteten sich an eine Reihe von Faktoren, die die Nitrifikation in Biofiltern beeinflussen bzw. beeinflussen könnten. Zum Teil wurde auf Ergebnissen aus den vorangegangenen Phasen aufgebaut, es wurden aber auch eine Reihe neuer Faktoren untersucht. Durch die Nutzung der Anlagen und Versuchsreaktoren der GMA gingen ein großer Teil der Experimente in der 3. Phase über den Labormaßstab hinaus. Die Zusammenfassung der Ergebnisse der 2. Phase ist im Anhang zu finden.

Ebenso ist eine zusammenfassende Dokumentation der Ergebnisse des Projektes angefügt, die während des Abschlusstreffens in der DBU in Osnabrück von allem Projektpartnern diskutiert und verabschiedet wurde.

Im Folgenden werden die einzelnen, in Phase 3 bearbeiteten Aspekte aufgeführt:

Die Anheftung der gewünschten Bakterien an die Füllkörper in den Biofiltern blieb nach Phase 1 und 2 ein Schwerpunkt der Untersuchungen. Kunststoffe aus verschiedenen Materialien und nach unkomplizierten Behandlungen oder mit speziellen Beschichtungen sollten hinsichtlich ihrer Eignung als Aufwuchskörper für nitrifizierende Bakterien untersucht werden. Dazu gehörte auch die Bestimmung der Hydrophobizität der Oberflächen einiger Kunststoffe. Auch die Wirkung von migrierenden Substanzen aus den Kunststoffen auf die Nitrifikation wurde weiterhin geprüft. Da Bakterien in Biofilmen in einer Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) zusammengehalten werden, die wahrscheinlich schon an der primären Anheftung der Zellen beteiligt ist, wurde versucht, die Zusammensetzung der EPS von ausgewählten marinen Vertretern auf ihre Inhaltsstoffe hin zu untersuchen.

Es ist bekannt, dass Substanzen (z.B. Weichmacher) in Kunststoffen zum Teil eine hormonähnliche (endokrine) Wirkung hervorrufen können und deren Anreicherung im Kreislaufsystem sich nachteilig auf die gehälterten Fische auswirken kann (z.B. Verweiblichung oder Vermännlichung). Diese endokrinen Effekte sollten mittels molekularbiologischer Verfahren (sog. Yes/Yas-Test) quantifiziert werden.

Da sich Nitrat in Anlagen ohne Denitrifizierungsstufe sehr hoch anreichert, sollte der Einfluss des Endproduktes der Nitrifikation auf diese untersucht werden. Die geschah sowohl mit Reinkulturen und Biofilmprouben im Labor, als auch in Versuchsreaktoren.

Ähnliche Experimente, ebenfalls in Versuchsreaktoren und mit Reinkulturen im Labor, sollten auch mit Ozon, bzw. den Reaktionsprodukten von Ozon (TRO =Total Residual Oxidants) im Hälterungswasser durchgeführt werden. Ozon wird als Oxidierungsmittel zur Reduzierung pathogener Bakterien in der marinen Aquakultur weitläufig eingesetzt.

Nitrifikanten sind aerob wachsende Bakterien, die Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor benötigen. Es gibt jedoch Hinweise, die auf eine Hemmung der Abbauleistung eines nitrifizierenden Biofilters bei sehr hoher Luftzufuhr schließen lassen. Anhand experimenteller Untersuchungen mit einer speziellen Versuchsanordnung mit mehreren identischen Biofiltersystemen sollte unter Berücksichtigung der Strömungsverhältnisse sowie des Sauerstoffangebots eine optimale Belüftungsintensität für Bewegtbettfilter entwickelt werden. Damit verbunden ist auch die Möglichkeit zur Energieeinsparung.

Da die Startphasen mariner Biofilter oft sehr lang sind (bis zu einem Jahr) und es häufig zu Leistungsabfällen kommt, sobald die Fische eingesetzt werden, sollten verschiedene Ansätze der Beimpfung (mit und ohne Fischfutter) von 3 baugleichen Biofiltern der GMA Aufschluss über mögliche Vorteile geben. Sich entwickelnde AOB- (Ammonium-oxidierende Bakterien) und NOB- (Nitrit-oxidierende Bakterien) Aktivitäten wurden im Labor ermittelt und mit den Werten in den Biofiltern verglichen. Die nitrifizierenden Mikroorganismen auf den Füllkörpern der Biofilter wurden über die Startphase hinaus durch molekularbiologische Methoden identifiziert.

Durch die Identifizierung der nitrifizierenden Arten und Untersuchungen der Wachstumsparameter von Laborkulturen können Hinweise für die Dimensionierung, die Startphasen oder Fehlfunktionen in der Biofiltration erbracht werden. Neben einem bereits isolierten NOB aus der Ecomares Anlage sollten auch neue AOB angereichert und ggf. isoliert werden.

Da Nitrifikanten für ihr langsames Wachstum und Überleben von Hungerphasen bekannt sind, war ein weiteres Ziel, durch Aktivitätstests mit bewachsenen Füllkörpern nach verschiedenen Lagerungszeiten zu zeigen, wie und wie lange FK gelagert und wieder im Biofilter eingesetzt werden können.

Des Weiteren sollte in der Phase 3 ein Versuchsbioreaktor mit online-Messungen der wichtigsten Parameter im Labor der Universität Duisburg konstruiert werden. Als Inokulum dienten bewachsene Füllkörper, deren heterotrophe und autotrophe Aufwuchsflora quantitativ bestimmt wurde.

Untersuchungen zur Optimierung von Kunststoff-Trägermaterialien

Einleitung

Die Firma GEA 2H Water Technologies hatte zwei Chargen von Kunststofffolien mit unterschiedlichen definierten Zusammensetzungen zur Verfügung gestellt. Auf Basis der Ergebnisse der ersten Versuchsreihe (DBU 1-7) wurde zur Optimierung die zweite Charge hergestellt (DBU 8-15). Damit wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. In die Versuchsreihe 2 (DBU 8-15) wurde auch die Folie DBU 3 aus der ersten Versuchsreihe (DBU 1-7) mit aufgenommen.

Für die Kunststofffolien wurde Polypropylen (PP) und/oder Polyethylen (PE) als Neu-/A-Ware sowie recyceltes Material verwendet. Darüber hinaus wurden Zusätze (Talkum, Ruß, Additive von BYK-Chemie GmbH, HT-Komponente, Rezyklat) mit unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Des Weiteren beauftragte GEA 2H Water Technologies GmbH das Fraunhofer Institut für Fertigungstechnik und Angewandte Materialforschung (IFAM) in Bremen mit der Plasmabeschichtung einer Polypropylen-Folie mit PEG (Polyethylen-Glykol). Zwei Varianten wurden hergestellt, von denen eine unter Stickstoffatmosphäre beschichtet wurde.

Quantitative Analyse der Anheftung mit den Reinkulturen *Nitrosomonas marina* 22, *Nitrospira marina* 295 und Ecomares Stamm 2.1

Die Anheftung von marinen Nitrifikanten an die 15 unterschiedlich zusammengesetzten Kunststofffolien wurde quantitativ bestimmt. Für diese Anheftungsversuche wurden zwei Versuchsreihen durchgeführt. In Reihe 1 wurden die Reinkulturen von *Nitrosomonas marina* 22 und *Nitrospira marina* 295 verwendet und *Nitrospira* Stamm Ecomares 2.1 in Versuchsreihe 2. Mittels Epifluoreszenzmikroskopie (EFM) und Bildbearbeitung wurde die Anheftung von marinen Nitrifikanten, wenn diese vorher mit Fluoreszenzfarbstoff markiert worden waren, quantifiziert.

Durchführung der Anheftungsversuche

Folienstücke an einer Probenhalterung („Strickleiter“; Abb. 1.1) wurden in AOB bzw. NOB Medium mit den jeweiligen Referenzorganismen im Dunkeln bei 26-28 °C inkubiert. Die Medien wurden mit steriler Druckluft belüftet und gerührt (300 U/min).

Zur Bestimmung der besiedelten Oberfläche in Prozent der DBU Folien wurde jeweils eine der „Strickleitern“ (Probenhalterung, Abb. 1) nach 1, 2 und 3 Wochen Inkubation für die Versuchsreihe 1 und nach 1 und 2 Wochen für die Versuchsreihe 2 dem Medien mit den jeweiligen Referenzorganismen entnommen. Alle Folien wurden von der Unterseite untersucht, um sich durch Sedimentation auf der Oberfläche ablagernde Zellen ausschließen zu können.

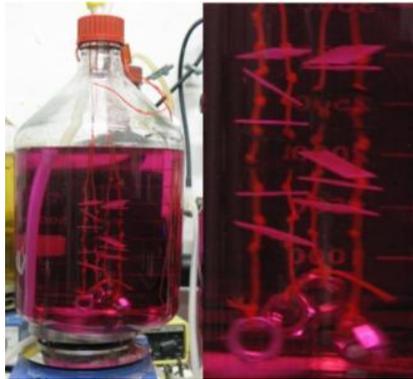


Abb. 1: Versuchsaufbau zur Anheftung von Referenzorganismen an die DBU Folien.

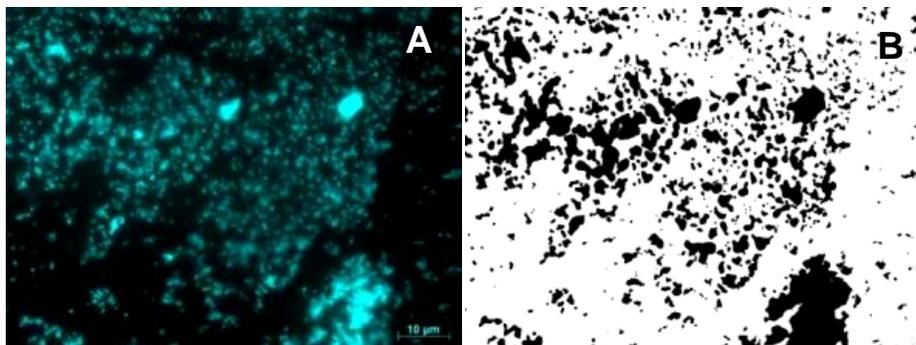


Abb. 2: EFM-Abbildungen von einer mit Bakterien besiedelten PP-Folie nach DAPI-Färbung (A) und konvertierte Abbildung für die Quantifizierung der besiedelten Oberfläche (B)

Die besiedelte Fläche wurde am EFM visualisiert und die Größe der besiedelten Fläche durch Abbildungsanalyse ermittelt (Abb. 2). Mit allen so bearbeiteten Einzelabbildungen wurde eine Fehlerrechnung nach Burington (1973) durchgeführt. Insgesamt wurden pro Versuchswoche, Folie und Reinkultur je 150 Abbildungen zur statistischen Auswertung herangezogen, die Standardabweichungen mit $t=0,05$, $n=3$ berechnet.

Ergebnisse der Anheftungsversuche

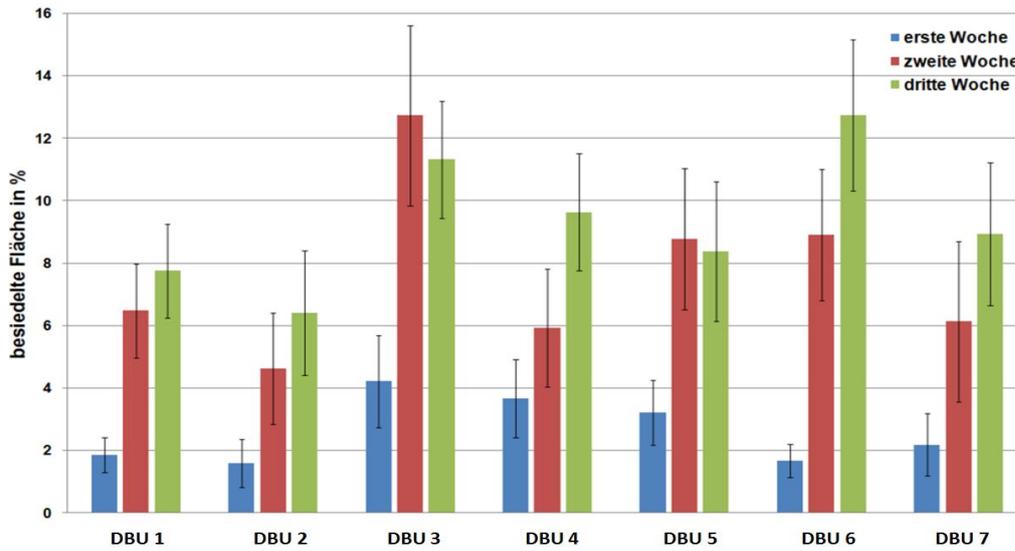


Abb. 3: Prozentuale Oberflächenbesiedelung durch *Nitrosomonas marina* 22 auf Folie DBU 1 - 7. Die blauen Balken zeigen die besiedelte Oberfläche nach einer Woche Inkubation, die roten Balken nach 2 und die grünen nach 3 Wochen Inkubation.

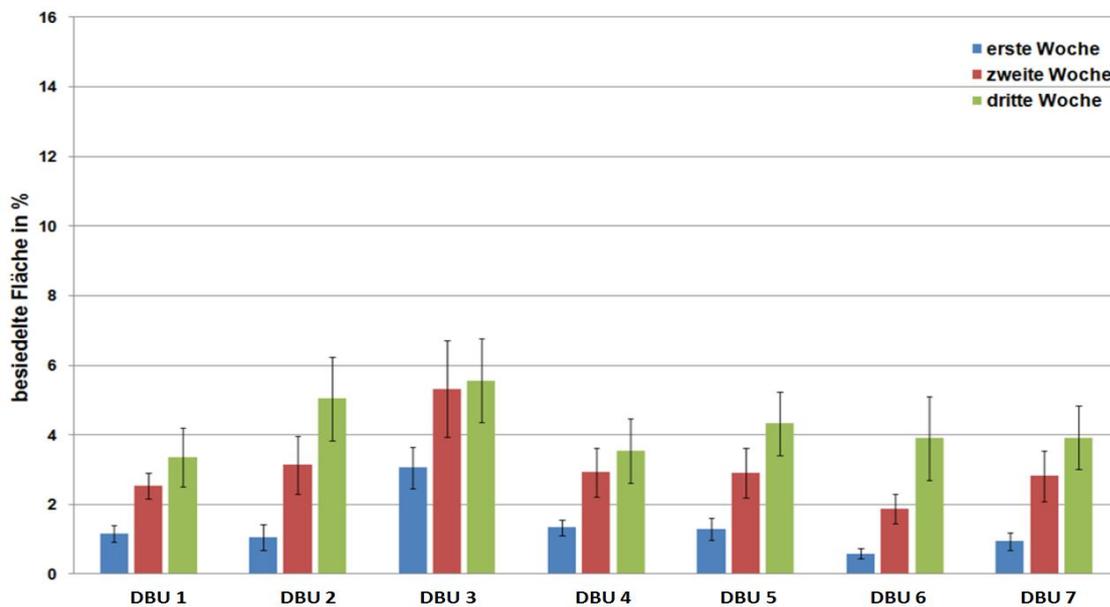


Abb. 4: Prozentuale Oberflächenbesiedelung durch *Nitrospira marina* 295 auf Folie DBU 1 - 7. Die blauen Balken zeigen die besiedelte Oberfläche nach einer Woche Inkubation, die roten Balken nach 2 und die grünen nach 3 Wochen Inkubation.

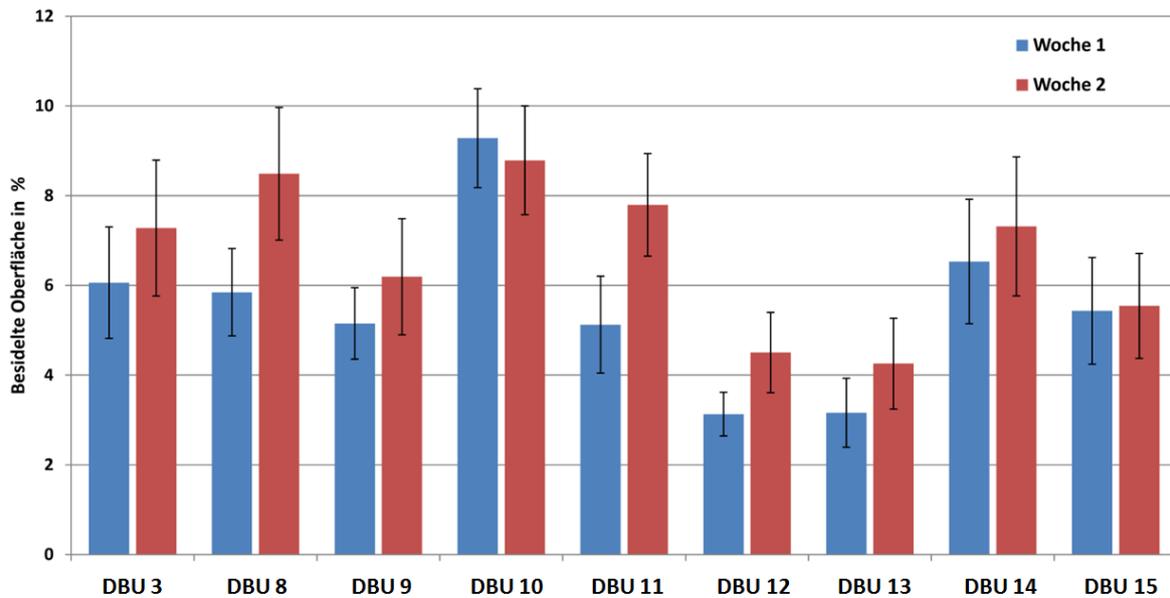


Abb. 5: Die blauen und roten Balken zeigen die besiedelte Oberfläche in Prozent auf den Folien DBU 3, 8 – 15 nach ein und zwei Wochen Inkubation mit dem *Nitrospira* Stamm Ecomares 2.1.

Bei Anheftungsversuchen mit *Nitrosomonas marina* 22, *Nitrospira marina* 295 und *Nitrospira* Stamm Ecomares 2.1 war über einen Versuchszeitraum von 3 Wochen eine Erhöhung der besiedelten Oberfläche bei allen Folien zu erkennen. Einzige Ausnahme bildete die Folie DBU 3. Beim Vergleich der Anheftungsversuche mit *Nitrosomonas marina* 22 und *Nitrospira marina* 295 (Abb. 3 und 4) ist eindeutig zu erkennen, dass die Folie DBU 3 nach drei Wochen jeweils die höchste Besiedlung zeigte. Bei den Anheftungsversuchen mit *Nitrospira* Stamm Ecomares 2.1 zeigte die Folie DBU 3 nicht die höchste Anheftung (Abb. 5). Aber durch die Überschneidungen der Standardabweichungen kann der Unterschied als nicht signifikant angesehen werden. Das heißt, die weiteren Optimierungen haben keine weitere signifikante Verbesserung gegenüber der DBU 3 Variante ergeben.

Zusammenfassend zeigte sich, dass die Reinkulturen am besten auf den Oberflächen der Folie DBU 3 siedelten. Insgesamt hefteten sich weniger Zellen von *Nitrospira marina* 295 und *Nitrospira* Stamm Ecomares 2.1 auf den Oberflächen an als von *Nitrosomonas marina* 22. Das Ergebnis kann als Grundlage für die Entwicklung neuer Füllkörper dienen, die die Anheftungsfähigkeit der marinen Nitrifikanten steigert und damit auch die Effektivität der Biofilter-Abbauleistung.

Oberflächenanalysen

Die sieben Kunststofffolien aus der Versuchsreihe 1 wurden mittels Oberflächenanalysen auf ihre polaren und neutralen Adhäsionskräfte untersucht. Hierfür wurde ein Rasterkraftmikroskop mit modifizierten Cantilevern (chemische Kraftmikroskopie, CFM, Abb. 6) eingesetzt. Mit Kontaktwinkelmessungen wurden die Oberflächenspannungen der Folien ermittelt. Das erfolgte mit der dynamischen Wilhelmy-Plattenmethode (Tab. 1).

Ergebnisse der Oberflächenanalyse

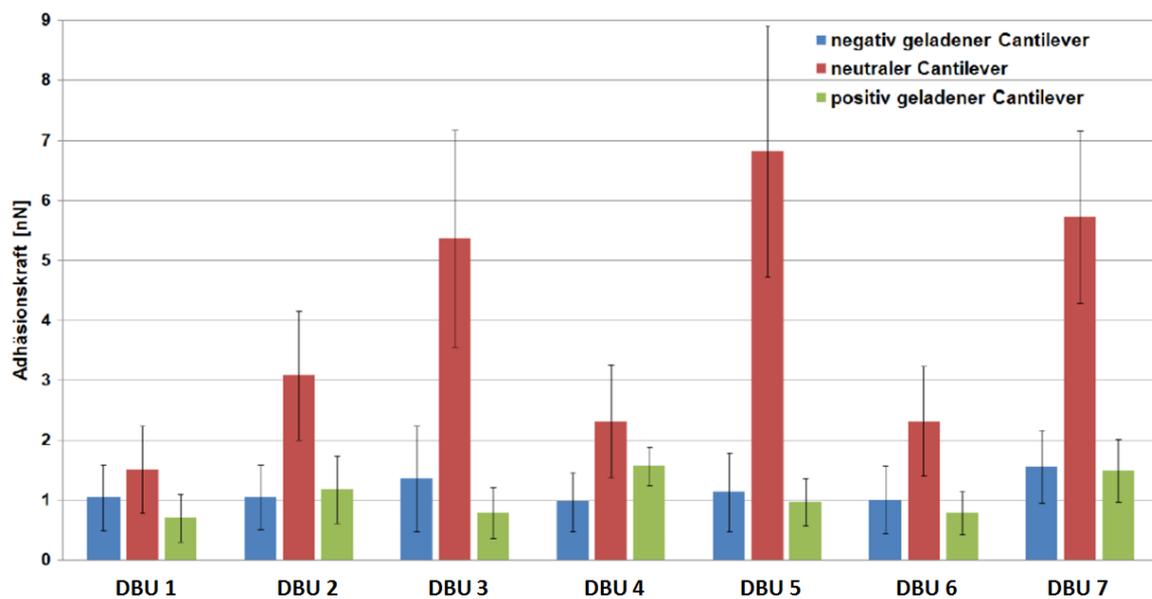


Abb. 6: Interaktionen zwischen negativ (blau), neutral (rot) und positiv (grün) geladenen Cantilevern und den jeweiligen Oberflächen der PP-Folien. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung, n=3, Mittelwerte errechnet aus je 3750 Einzelmessungen

Tab. 1: Kontaktwinkel und Oberflächenspannungen der Folien DBU 1 bis 7 (Nima DST9005 Dynamic Surface Tensiometer, Messtemperatur 21°C).

DBU Folien	Milli-Q®-Wasser Kontaktwinkel [°]	Ethylenglykol Kontaktwinkel [°]	Oberflächen- spannung [mN/m]
DBU 1	106 ± 0,6	78 ± 0,5	26,1 ± 0,4
DBU 2	109 ± 0,4	85 ± 0,7	21,2 ± 0,5
DBU 3	110 ± 0,4	83 ± 0,5	22,5 ± 0,4
DBU 4	107 ± 0,5	84 ± 0,8	22,2 ± 0,5
DBU 5	104 ± 0,6	80 ± 0,7	25,2 ± 0,6
DBU 6	106 ± 0,4	80 ± 0,6	24,7 ± 0,4
DBU 7	106 ± 0,4	85 ± 0,5	21,7 ± 0,4

Durch die Werte der chemischen Kraftmikroskopie konnten qualitative Aussagen getroffen werden. Die Hydrophobizität der Cantilevermodifikationen folgt einer aufsteigenden Reihe mit: negativ geladener Cantilever < positiv geladener Cantilever < neutraler Cantilever (Venzenov et al., 1997, Gourianova et al. 2005).

Die Berechnungen der Oberflächenspannungen zeigen nur geringfügige Unterschiede auf. Mit einem Kontaktwinkel von 104° bis 110° in Wasser sind alle Folien sehr hydrophob. Ähnliche Kontaktwinkel für PP sind in der Literatur zu finden, z.B. 108° (Schonhorn, 1966) und 104° (Strobel, 1987). Diese Werte bestätigen die Ergebnisse.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Folien durch beide Methoden als stark hydrophob charakterisiert wurden.

Durch die Oberflächenanalysen wurde gezeigt, dass alle PP-Folien hydrophob sind. Die Ladung der Oberflächen kann als neutral angesehen werden. Die Folie DBU 3 hatte den größten Kontaktwinkel und somit die größte Hydrophobizität, wobei die Unterschiede zwischen den einzelnen Folientypen nicht signifikant sind.

Vergleich der Ergebnisse der Anheftungsversuche mit denen der Kontaktwinkelmessungen

Es zeigte sich bei den Veröffentlichungen von Fletcher (1979 und 1980), Bright und Fletcher (1983) und Mazumdera et al. (2010), dass die initiale Anheftung von Mikroorganismen stärker an hydrophoben Oberflächen stattfindet als an hydrophilen. Im Gegensatz dazu zeigte Kim et al. (1997), dass Polyacrylpolyamid-Epichlorhydrin mit Cellulose vernetzt und mit einem Kontaktwinkel von 0° in Wasser die stärkste initiale Anheftung von Nitrifikanten auf einer stark hydrophilen Oberfläche aufwies. Es kann aus den Ergebnissen dieser Arbeit keine Schlussfolgerung gezogen werden, ob die initiale Anheftung an hydrophoben Oberflächen besser abläuft oder nicht, da alle untersuchten Folien stark hydrophob waren. Dazu wären noch weitere Versuche mit hydrophilen und hydrophoben Oberflächen notwendig.

EPS-Analyse mit Lektinen

Aufgrund der vorangegangenen Untersuchungen wurde mit der Folie DBU 3 die EPS-Matrix (extrazelluläre polymere Substanzen Matrix) von angehefteten Zellen von *Nitrosomonas marina* 22, *Nitrospira marin* 295 visualisiert und analysiert. Dies geschah mit fluoreszenzmarkierten Lektinen und dem EFM. Lektine reagieren mit ihren jeweiligen

spezifischen Zielstrukturen (Kohlenhydrat-Oligomere) über Wasserstoffbrückenbindungen, van der Waals Kräfte, hydrophobe Interaktionen und Metall-Koordinationskomplexe (Liener et al., 1986; Weiss und Drickamer, 1996; Elgavish und Shaanan, 1997). In Tabelle 2 werden Affinitäten und Spezifität der Lektine aufgelistet.

Tab. 2: Ausgewählte Lektine und ihre Ziel-Affinitäten/Spezifitäten

Lektinname	Quelle	Affinität/Spezifität	Literaturangaben
Concanavalin A Con A	<i>Canavalia ensiformis</i>	nichtreduzierende α -D-Glukose und α -D-Mannose, α -mannosidische Strukturen; α -Mannose Arten, hybride Arten von N-Glykanen	Goldstein et al., 1965; Smith & Goldstein, 1967; Doyle, (1994)
Erdnuss-Agglutinin (Peanut agglutinin) PNA	<i>Arachis hypogaea</i>	Galaktosyl (β -1,3) N-Acetylgalaktosamin (α -1) Ser/Thr (T-Antigen)	Lotan et al., 1975; Banerjee et al., 1996; Doyle, (1994)
Weizenkeim-Agglutinin (Wheat Germ agglutinin) WGA	<i>Triticum vulgare</i>	N-Acetylglukosamin und N-Acetylneuraminsäure (Sialsäure) Oligomere von N-Acetyl Glukosaminen (GlcNAc) Aktivitäten sind beschrieben: GlcNAc < (GlcNAc) ₂ < (GlcNAc) ₃ = (GlcNAc) ₄ < (GlcNAc) ₅	Allen et al., 1973; Doyle, (1994)

Ergebnisse der EPS-Analyse mit Lektinen

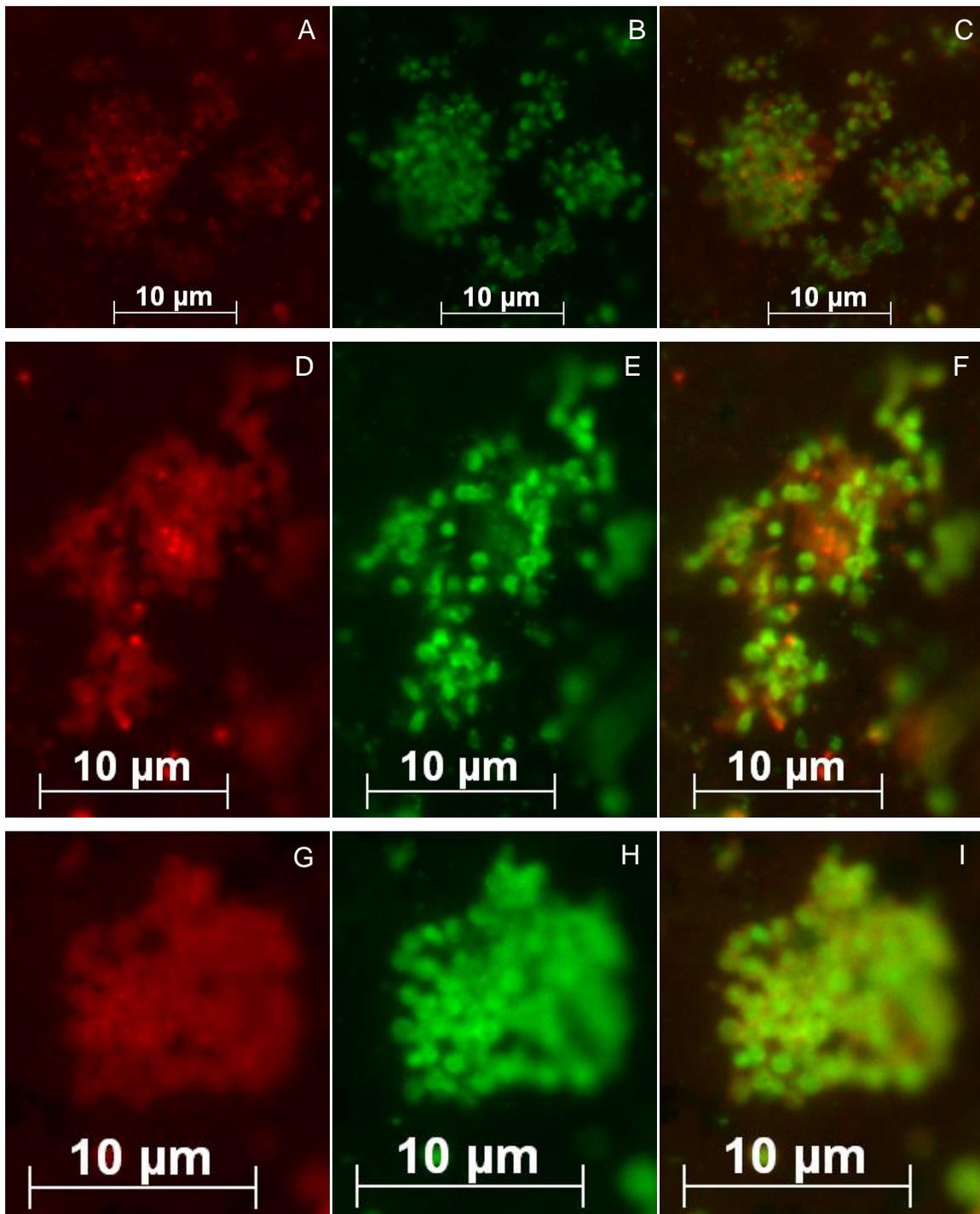


Abb. 7: Mikrokolonien von *Nitrosomonas marina* 22 auf Folie DBU 3 nach drei Wochen Inkubation und Visualisierung der EPS durch Lektinfärbung. Bilder zeigen mit verschiedenen Lektinen gefärbte EPS-Bestandteile (rot, A, D, G), mit Syto® 9 gefärbte Zellen (grün, B, E, H) sowie ein kombiniertes Bild der beiden Färbungen (C, F, I, rechte Spalte). (A) Färbung mit Con A, (D) Färbung mit PNA, (G) Färbung mit WGA. Bedingungen: AOB-Medium, 300 U/min, 26-28 °C im Dunklen, aktive Belüftung mit steriler Druckluft. Belichtungszeit 200ms.

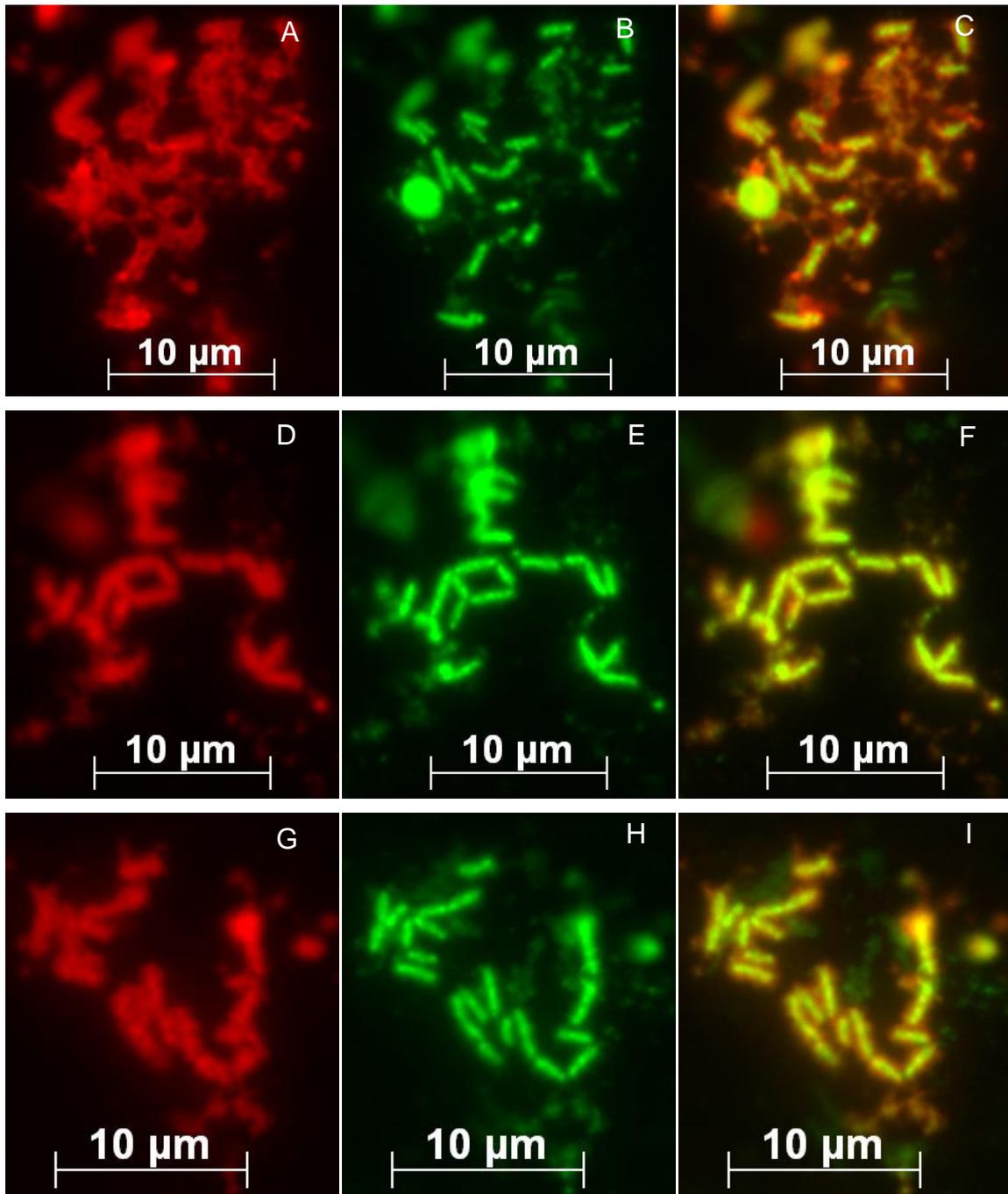


Abb. 8: Zellen von *Nitrospira marina* 295 auf Folie DBU 3 nach drei Wochen Inkubation und anschließender Fluoreszenzfärbung. Bilder zeigen mit verschiedenen Lektinen gefärbte EPS-Bestandteile (rot, A, D, G), mit Syto® 9 gefärbte Zellen (grün, B, E, H) sowie ein kombiniertes Bild der beiden Färbungen (C, F, I, rechte Spalte). (A) Färbung mit Con A, (D) Färbung mit PNA, (G) Färbung mit WGA. Bedingungen: NOB-Medium, 300 U/min, 26-28 °C im Dunklen, aktive Belüftung mit steriler Druckluft. Belichtungszeit 200ms.

Im Gegensatz zu *Nitrosomonas marina* 22 waren im Falle von *Nitrospira marina* 295 keine Mikrokolonien auf den Oberflächen zu erkennen. Lediglich einzelne Zellen und kleine Zellaggregate waren sichtbar (Abb. 7 B, E, H und 8 B, E, H). Alle drei Signale der fluoreszenzmarkierten Lektine Con A, WGA und PNA waren detektierbar (Abb. 7 A, D, G und 8 A, D, G). Das Lektinsignal war in unmittelbarer Umgebung der Zellen, zum Teil aber auch in weiterer Entfernung zu erkennen.

Aus den Befunden folgt, dass bei beiden Bakterien viele verschiedene Saccharidkomponenten in den EPS vorkommen. Außerdem traten Zellen von *Nitrosomonas marina* 22 vorwiegend als Mikrokolonien auf, während *Nitrospira marina* 295 meist in Form einzelner Zellen und kleiner Zellaggregate sichtbar war. Aussagen, in wie weit diese Polysaccharidkomponenten die Anheftung der beiden Reinkulturen an die Folie DBU 3 mit gefördert haben, können nicht abgeleitet werden. Dazu reichen die vorliegenden Daten nicht aus. Es gibt bisher auch keine Erkenntnisse über das Anheftungsverhalten von marinen Nitrifikanten gegenüber dem Zusatzstoff in der Folie DBU 3. Detailliertere Ergebnisse können der Masterarbeit von Jürgen Schrötz (Universität Duisburg-Essen) entnommen werden. Die quantitative Analyse der EPS konnte nicht durchgeführt werden. Durch die geringen Wachstumsraten der Nitrifikanten konnte nicht genügend EPS extrahiert werden. Die Mengen lagen unter den analytischen Nachweisgrenzen.

Hemmtests und Aktivitätstest

In der zweiten Phase des Projektes wurde ausführlich die Wirkung von migrierenden Stoffen aus Granulaten von verschiedenen Kunststofftypen (vor Extrusion) untersucht. Dabei stellte sich heraus, dass die Nitrifikation gehemmt wurde, wenn diese Granulate dem Testmedium beigelegt worden waren. Die Testmedien enthielten definierte Mengen an Substrat (Ammoniumchlorid oder Natriumnitrit) und entweder von Füllkörpern aus den Anlagen abgeschüttelte Bakterien oder Bakterien aus Kulturen. Die NOB wurden stärker gehemmt als die AOB, und unterschiedliche Kunststofftypen wirkten unterschiedlich stark auf die Nitrifikation (siehe Zwischenbericht). Eine weitere Methode zur Untersuchung der Anheftung von nitrifizierenden Bakterien auf Kunststoffen war neben der visuellen Quantifizierung die Messung der Nitrifikationspotentiale (Aktivitätstests) der angehefteten Bakterien nach der Inkubation der Kunststoffe in Testmedium mit Zellen im Labor oder direkt in Biofiltern. Des Weiteren wurden Beimischungen von Talkum, Montmorillonit und Calciumcarbonat Medien zugegeben und die Aktivität von Nitrifizierern auf Füllkörpern aus den Biofiltern der Anlagen bestimmt.

Hemmtest DBU Folien 1-7

Die Folien DBU 1-7 wurden in Hemmtests eingesetzt (6 Tests mit AOB und 8 mit NOB), wobei jeweils 3-7 Folien im selben Versuch verglichen wurden. Jede Folie wurde 3 bis 4-mal getestet, wofür jeweils 21 g in kleine Stücke geschnitten wurden (entspricht ca. 300 cm²) und in die Testmedien gegeben. Die Folien waren zuvor in aqua dest. gelagert worden. Alle

Folien bewirkten eine starke Hemmung der Nitrifikanten im Vergleich zur Kontrolle ohne Folien, allerdings war im Vergleich der Folien untereinander kein Unterschied erkennbar.

Hemmtest mit Plasma-beschichteten Folien

Wie oben erwähnt stellte das IFAM in Bremen zwei Varianten von Plasma-beschichteten PP-Folien her, von denen eine unter Stickstoffatmosphäre beschichtet wurde. Diese Folien (DBU 14 und 15) und eine PP-Kontrollfolie wurden in einem Hemmtest mit anschließendem Aktivitätstest eingesetzt um zu ermitteln, ob die Plasmabeschichtung die Anheftung von Nitrifikanten fördert.

Für jeweils 3 Parallelen wurden 21 g der Folien in 100 ml NOB- Medium (5 mM Nitrit) gegeben, welche dann mit abgeschüttelten Zellen von FK aus einem Biofilter der GMA inokuliert (5 ml) wurde. Die PP-Folien, die mit Plasma beschichtet worden waren, hatten in diesem Test einen weniger hemmenden Einfluss als die Kontrollfolie aus PP. Dieses stammt aber möglicherweise aus einer anderen Kunststoff-Charge als die beschichteten PP-Folien. Wie erwartet war das Nitrit in dem Medium ohne Zugabe von Plastik (Kontrolle) am schnellsten oxidiert worden (Abb. 9).

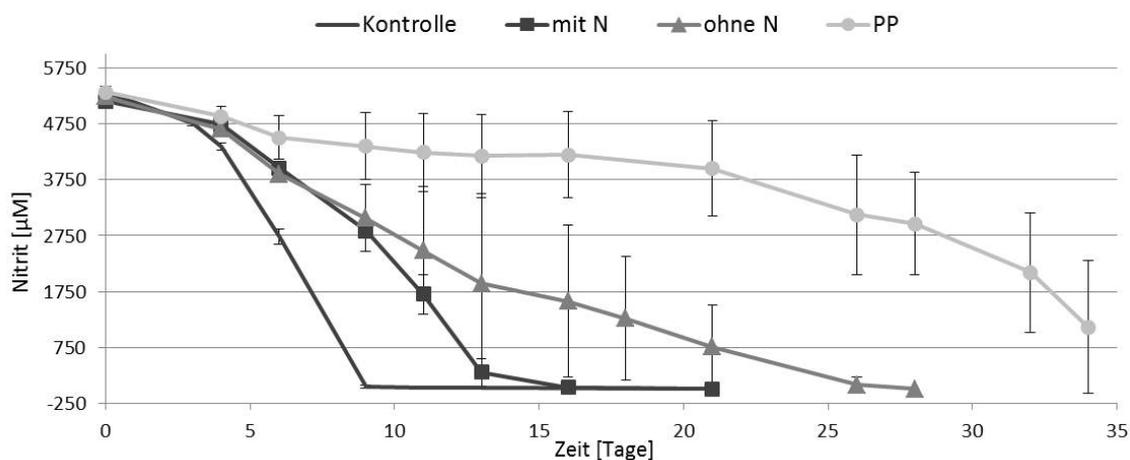


Abb.9: Oxidation von Nitrit in Medien mit PP- Folien und im Kontrollmedium ohne Kunststofffolien. „mit N“ = unter Stickstoffatmosphäre beschichtet, PP = Kontrollfolie ohne Beschichtung.

Direkt im Anschluss an den Hemmtest wurden die Folienstücke aus den jeweiligen Parallelen zusammengegeben und kurz mit sterilem Meerwasser gespült. In 25 ml NOB-Medium (1 mM; 3 Parallelen) wurden 5 g der Folien eingewogen. Es wird angenommen, dass das Nitrit umso schneller umgesetzt wird, je mehr NOB sich während des Hemmtests an die Folien angeheftet hatten. Dem Ergebnis zufolge haben sich demnach an der Kontrollfolie ohne Beschichtung am meisten Nitritoxidanten angeheftet (Abb. 10).

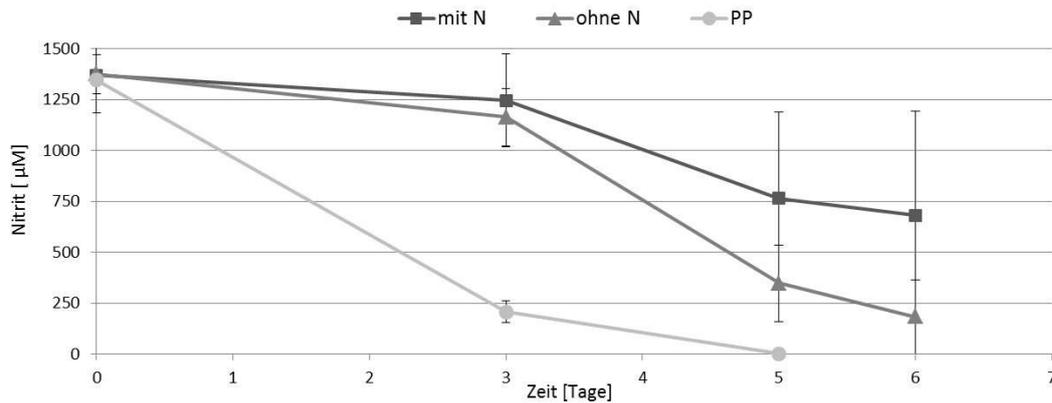


Abb. 10: Nitritoxidation durch angeheftete Zellen an Kunststofffolien aus vorhergegangenem Hemmtest (Abb. 9). „mit N“ = unter Stickstoffatmosphäre beschichtet, PP = Kontrollfolie ohne Beschichtung.

Die Ergebnisse scheinen widersprüchlich, da das PP ohne Beschichtung den stärksten hemmenden Effekt auf die NOB in dem ersten Versuch ausübte. Es ist jedoch möglich, dass sich die Nitrifikanten – wie auch andere Bakterien- bedingt durch ungünstige Bedingungen verstärkt an die Oberflächen angeheftet haben. Möglich ist auch, dass beide Effekte, also Hemmung der Nitritoxidation durch migrierende Substanzen und begünstigte Anheftung, gänzlich unabhängig voneinander verlaufen.

Hydrophilisierte PP/PE-Platten von BYK-Chemie GmbH

Die Firma BYK bietet mehrere Additive an, welche in der Lage sein sollen, die Oberfläche von Polymeren hydrophiler zu machen. Verschiedene Mischungen von PP wurden von BYK freundlicherweise mit BYK-P 4101, Disperplast-1018 und weiteren Additiven versetzt. Eine anschließende Messung der Oberflächenenergie ergab, dass kaum eine Erhöhung der Werte in Richtung einer Hydrophilie feststellbar war. Nur mit einer Formulierung (BYK = DBU 12), bei der die Hydrophilie etwas höher war, und einer Kontrolle (nur PP, DBU 13) wurden daraufhin Versuche zur Aktivität unternommen. Im März 2011 wurden von beiden Kunststoffen jeweils 6 Platten (ca. 5x10 cm) in Biofilter M3 der GMA Büsum an zwei Schnüren gehängt, jeweils BYK 6 und die Kontrolle BYK 0 abwechselnd.

Nach 3 Wochen wurden die Platten wieder entnommen, in Systemwasser nach Hamburg transportiert und in Bechergläser (200 ml Medium) gestellt. Die Bestimmung der Substratumsetzung von AOB als auch NOB zeigte keine Unterschiede zwischen den Platten bei sehr hohen Standardabweichungen. Die AOB hatten 1 mM Substrat nach ca. 2 Wochen umgesetzt, die NOB 0,5 mM Substrat nach 3-4 Wochen. Dieses Ergebnis entspricht dem aus den Versuchen mit der visuellen Quantifizierung der angehefteten Zellen auf den Kunststoffen mit den Zusätzen von BYK.

Versuche mit behandelten Füllkörpern

Neue HX12KLL Füllkörper wurden verschiedenen Behandlungen unterzogen, um herauszufinden, ob dadurch der Bewuchs von Nitrifikanten auf relativ einfache Weise zu fördern sei. Sie wurden dann zusammen mit unbehandelten FK als Kontrollen in Biofilter der GMA gehängt und nach 1-5 Wochen entnommen zur Bestimmung von nitrifizierenden Potentialen im Labor. Die Behandlungen bestanden aus Rühren von 150 neuen FK in 500ml Wasser und verschiedenen Substanzen (s. Tab. 3) oder UV Bestrahlung mit 254nm und 6W bei ca. 7 cm Abstand und für verschieden lange Zeiträume.

Für den ersten Versuchsdurchlauf wurden die neuen und behandelten Füllkörper in Beuteln in die Biofilter gehängt, später wurden sie an Angelschnüren aufgereiht. Je nach Belastung der Biofilter wurden die Beutel bzw. Schnüre nach einem Zeitraum von 8 Tagen bis 4 Wochen aus den Filtern genommen und die potentiellen nitrifizierenden Aktivitäten von AOB und NOB auf den FK im Labor bestimmt (5 FK in 25 ml Medium (1 mM Substrat), bei 22°C geschüttelt; 3 Parallelen). Da jeweils redundante FK in die Biofilter gehängt wurden, wurde zum Teil ein weiterer Aktivitätstest durchgeführt.

Tab. 3: Versuchsvarianten und Ergebnisse der Aktivitätstests mit behandelten Füllkörpern. + /- = im Vergleich zu anderen Behandlungen bzw. den Kontrollen schnellere/verzögerte Substratoxidation.

Versuch und Inkubationszeit:	Behandlung	Ergebnis
Versuch 1 (Beutel): M3 für 2 Wochen	10%ige Essigsäure und 50 g Sand 0,8 g Tannin und 0,15 g Harnstoff Biofilm vom Biofilterrand	+ Tannin und Harnstoff
Versuch 2 (Beutel): M1 für 4 und 5 Wochen	weiße FK HDPE TWZ 1 g Tannin, 0,15 g Harnstoff 1 g Tannin und 0,15 g Harnstoff	- - TWZ in beiden Tests
Versuch 3 (Schnur): M5 für 3 Wochen	0,15 g Harnstoff 0,45 g Harnstoff benutzte und getrocknete inaktive FK	+ + gebrauchte FK (besonders NOB)
Versuch 4 (Schnur): M5 für 8 Tage	UV (2x1 Stunde) UV (2x2 h) 0,30 g Harnstoff	alle gleich
Versuch 5 (Schnur): M5 für 2 und 3 Wochen	50 gNaHCO3 1 g Harnstoff und 0,15 g Tannin UV (2x 5 h)	+ Kontrolle (1.Test) - Kontrolle (AOB, 2.Test)

Die einzelnen Plus- und Minuszeichen in der Ergebnisspalte geben nur eine geringe Erhöhung der jeweiligen Aktivitäten im Vergleich zu den anderen Behandlungen an, nur bei den doppelten Zeichen war diese Erhöhung beachtenswert. Die gebrauchten FK zeigten keine nitrifizierenden Aktivitäten mehr, bevor sie in die Biofilter gehängt wurden. Die FK mit Trinkwasserzulassung waren ebenfalls vom Typ HX12KLL.

Zuerst sah es so aus, als würde die Behandlung mit Harnstoff, als Substrat für AOB gedacht, und Tannin, zur Aufräuhung der Oberfläche eingesetzt, höhere Bewuchsraten und daraus resultierende höhere Aktivitäten bewirken, diese Annahme bestätigte sich jedoch nicht in weiteren Tests. Lediglich die FK aus dem Kunststoff mit Trinkwasserzulassung und die bereits gebrauchten FK zeigten große Unterschiede im Vergleich zu den behandelten FK. HDPE mit Trinkwasserzulassung (TWZ) zeigte schon in den Hemmversuchen mit Kunststoffgranulaten stets die stärkste Hemmwirkung. Auch ein früherer Versuch mit Anheftungsversuchen im Labor mit Medium und Zellen von bewachsenen FK zeigte, dass sich auf FK aus HDPE mit TWZ weniger Nitrifikanten im gegebenen Zeitraum anhefteten als auf FK aus HDPE ohne TWZ vom gleichen Typ.

Ein ähnlicher Versuch mit schwarzen und weißen FK vom Typ BX09 zeigte, wie auch Versuch 3, dass die Aktivitäten der Nitrifikanten auf gebrauchten und mit NaOH gereinigten und getrockneten FK nach einer „Anheftungszeit“ von 3 Wochen höher sind.

Beimischung von Mineralen in das Medium

In der Literatur wird beschrieben, dass Montmorillonit und Talkum die Nitrifikation in Böden verbessern (Kunc und Stotzki, 1980; Macura und Stotzki, 1980). Diab und Shilo (1988) berichten von einer schnellen Anheftung von *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* an Calciumkarbonat- oder Bentonitpartikeln und einer daraufhin höheren Aktivität angehefteter Bakterien im Vergleich zu suspendierten Zellen. Daher wurden AOB und NOB Medien 0,5 bis 1 % w/v Talkum, Montmorillonit oder Calciumcarbonat beigemischt und die Nitrifikationsleistung von abgeschüttelten Zellen von FK aus einem Biofilter der GMA (2 ml Zellsuspension auf 25 ml Medium) gemessen. Die Ergebnisse zeigten nur sehr leichte Unterschiede in den Nitrifikationsraten, wobei diese in den Kontrollen nur leicht geringer war als in den Ansätzen mit den Mineralen. Die Autoren der o.g. Studien verweisen bei der Wirkung von Montmorillonit auf dessen pH-neutralisierende Wirkung, Carbonat dagegen könnte den autotrophen Bakterien auch als Kohlendioxid-Quelle dienen. Es ist möglich, dass die Wahl der Methode hier nicht ausreicht, um einen statistisch belegbaren Unterschied in den Nitrifikationsleistungen zu produzieren. Des Weiteren waren die pH Werte im Versuch im

neutralen Bereich und auch die Kohlenstoffquelle CO_2 wird nicht ein limitierender Faktor gewesen sein. Auch befinden sich die abgeschüttelten Zellen immer noch in Biofilmmaggregationen und liegen nicht suspendiert als Einzelzellen vor. Ebenso könnte der Effekt der Minerale auf die nitrifizierenden Bakterien anders sein, wenn die Minerale in die Kunststoffe eingearbeitet würden. Dies war allerdings technisch nicht möglich, da Montmorillonit z.B. Extrudern zusetzt.

Freisetzung endokrin wirksamer Substanzen aus ausgesuchten Füllkörpern

Bei Fischen ist Geschlechtsdetermination und -differenzierung vergleichsweise plastisch. So ist die Festlegung des Geschlechts aufgrund eines einfachen Aufbaus der Gonade reversibel und unterliegt in besonderem Maße dem Einfluss endogener und exogener Hormone sowie endokrin wirksamer Chemikalien. Seit Jahren werden bei nahezu allen gezüchteten Fischarten Dysfunktionen der Gonadenreife beobachtet. Diese umfassen verzögerte Geschlechtsreife bis hin zur Stagnation der Reife, abnormale Gonadendifferenzierung wie Intersex-Stadien und andere Fehlentwicklungen, die den Produktionsablauf empfindlich beeinträchtigen können. Neben den Haltungsbedingungen (Temperatur, Photoperiode) werden Nahrungsbestandteile (Phytoestrogene aus pflanzlichen Futterzusätzen), Hormone und Hormonmetabolite der Fische (insbesondere Steroide) sowie hormonell wirksame Chemikalien aus für den Bau verwendeten Materialien (endokrine Disruptoren) als potentielle Ursache betrachtet. In der kreislaufbasierten Aquakultur ist mit der Akkumulation dieser Substanzen zu rechnen, wobei insbesondere endokrine Disruptoren aufgrund der Persistenz (reduzierte biologische Abbaubarkeit) und der ausgeprägten Akkumulationstendenzen im Prozesswasser ein großes Störungspotential aufweisen. Die Verwendung von Kunststoffen für Becken, Rohrleitungen und Filtereinheiten stellt somit eine vorrangige Eintragquelle für potentielle endokrine Disruptoren dar, wobei die mit dem Haltungswasser in Kontakt stehende Oberfläche als entscheidende Stellgröße für die Abgabe anzusehen ist. Aufgrund der beim Füllmaterial eines Biofilters angestrebten Oberflächenvergrößerung ist diesbezüglich eine Erfassung endokriner Effekte erforderlich. Die Identifizierung einzelner Chemikalien und der sich ableitenden Wirkungen in komplexen Gemischen ist technisch nicht durchführbar, so dass biologische (Expositionsversuche *in vivo*, *in vitro* Bioassays) sowie biotechnologische Verfahren verwendet werden.

Die Gefahr einer Auswaschung chemischer Substanzen aus den Füllkörpern wurden mittels Gen-Reporter Assays (Yeast Estrogen Screen (YES), Yeast Androgen Screen (YAS)) quantifiziert, wobei endokrine Effekte im Vergleich zu einer Referenzsubstanz quantifiziert wurden (Abb. 11). Dazu wurden Füllkörper in Reinstwasser auf einem Horizontalschüttler bei Raumtemperatur in drei Replikaten inkubiert (Tab. 4), so dass eine regelmäßige Durchmischung erfolgte. Alle Füllkörper außer H2-BCN030 wurden mit einer Oberfläche von 4000 cm² in 800 ml Wasser inkubiert, um normierte Bedingungen (bei gleicher Oberfläche) zu gewährleisten. Aufgrund des großen Volumens wurde H2-BCN030 mit einer Oberfläche von 1600 cm² in 800 ml Wasser verwendet, die Aktivität wurde entsprechend normiert (2,5-fache). Nach jeweils 7 Tagen wurde alles Wasser abgenommen, extrahiert und mittels Gen-

Reporter Assay analysiert. Östrogene Aktivität wurde im Vergleich zu 17 α -Ethinylestradiol (EE2) in einem Endkonzentrationsbereich von 3,3 $\cdot 10^{-8}$ M bis 2,61 $\cdot 10^{-10}$ M erfasst. Die antiöstrogene Aktivität wurde Tamoxifen (TAM) in einem Endkonzentrationsbereich von 2,2E $^{-5}$ M bis 1,7E $^{-7}$ M bei gleichzeitiger Zugabe von 6,7E $^{-9}$ M ermittelt.

Die androgene Aktivität wurde auf 17 α -Methylandrostan-17 β -ol-3-one (MDHT) in einem Endkonzentrationsbereich von 6,7E $^{-8}$ M bis 5,2E $^{-10}$ M eingesetzt. Als antiandrogen aktive Vergleichsubstanz wurde Flutamide (FLU) in einem Endkonzentrationsbereich von 6,7E $^{-5}$ M bis 5,2E $^{-7}$ M bei Zugabe von MDHT mit einer Endkonzentration von 6,7E $^{-9}$ M eingesetzt.

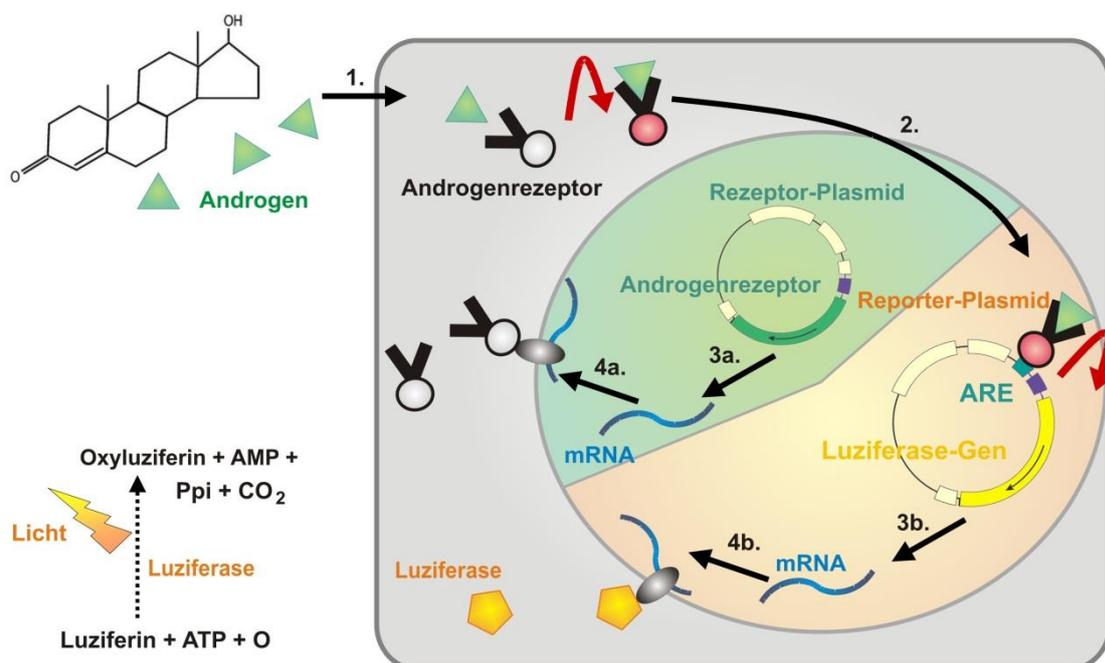


Abbildung 11: Funktionsprinzip eines Gen-Reporter Assays am Beispiel des Yeast Androgen Screen (YAS). (1) Nach Aufnahme einer androgen wirksamen Substanz und Bindung an den Rezeptor im Cytoplasma (roter Pfeil) gelangt (2) der aktivierte Androgen-Rezeptor Komplex in den Zellkern, was (3b) nach Bindung an ein Androgen bindendes Element (ARE) zur Transkription des Luciferase-Gens auf dem Reporter-Plasmid und (4b) der Translation der Luciferase führt, welche Luziferin in Oxyluziferin überführt, was photospektrometrisch erfasst wird. Die Synthese des Androgenrezeptors (3a, 4a) wird kontinuierlich durch das Rezeptorplasmid gewährleistet.

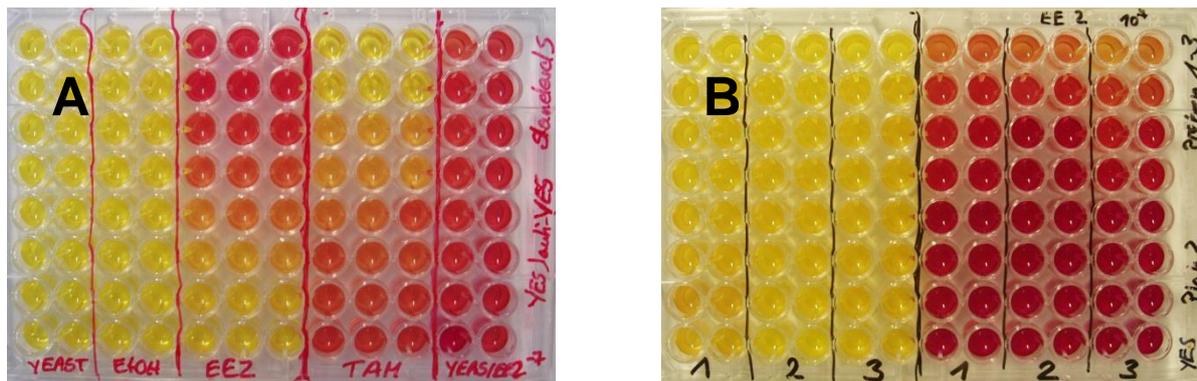


Abbildung 12: YES/antiYES Assay a) mit Hefe- (Yeast) und Lösungsmittelkontrolle sowie der Östradiol-Eichreihe (EE2) und der Tamoxifen-Eichreihe (TAM) im Vergleich zu b) drei Proben (1-3).

In keiner der Proben wurde eine östrogene Aktivität bestimmt. Im 66-fach konzentrierten Eluat wurde eine leichte antiöstrogene Aktivität ermittelt. Ferner wurde eine erhöhte androgene Aktivität in allen Behandlungsgruppen im 66- und 33-fachen Eluat erfasst.

Alle ermittelten Aktivitäten (YAS, antiYES) lagen am Rand der Detektionsgrenze und deutlich unterhalb der Aktivitäten, die im Wasser von Kreislaufanlagen am IGB bisher gemessen wurden. Daraus ist zu schließen, dass endokrin wirksame Substanzen primär biogenen Ursprungs (Exkretion, Futter etc.) sind.

Die Aktivitäten nahmen über den Versuchszeitraum nicht ab. Die Abgabe aus den Füllkörpern erfolgte kontinuierlich.

Tabelle 4: Verwendete Füllkörper, Oberfläche und Dichte sowie eingewogene Füllkörpermenge

Füllkörper	Oberfläche [cm ² /l]	Dichte [kg/m ³]	[g/cm ³]	g/l	Füllkörpervgewicht /800 ml
H2-BCN030	3200	120	0,12	120	60
H2-BCC011	11800	142	0,142	142	48
H2-BCC012	7500	106	0,106	106	57
H2-BCN012KK	8590	150	0,15	150	70

Einfluss der Ozonisierung auf die Nitrifikationsleistung eines Bewegtbett - Filters

Ozon wird in Aquakultur-Kreislaufsystemen häufig zur prophylaktischen Keimreduktion sowie zur Verbesserung der Wasserqualität eingesetzt. Neben seiner desinfizierenden Wirkung oxidiert Ozon eine Reihe anorganischer und organischer Substanzen und trägt somit zur Säuberung des Kreislaufwassers bei. Mit besonderer Vorsicht muss allerdings die Ozon-Dosierung in marinen Systemen erfolgen. Ozon reagiert mit den Salzen des Meerwassers, insbesondere den Bromid-Ionen, zu sekundären Oxidantien, die als Total Residual Oxidants (TRO) zusammengefasst werden. Da diese sekundären Oxidantien stabiler sind als das schnell zerfallende Ozon selbst, können Restoxidantien bis in die Biofilter gelangen und stellen somit prinzipiell aufgrund ihrer keimtötenden Wirkung ebenfalls ein hohes Risiko für die Nitrifizierer im Biofilter dar. Bislang ist nur wenig über den Einfluss dieser TRO auf die Biofiltration bekannt.

Um die Auswirkung der TRO auf die entscheidenden nitrifizierenden Bakterien im Biofilter charakterisieren zu können, wurden in einem ersten Schritt in mehreren Kurzzeit-Laborversuchen Reinkulturen von Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) der Art *Nitrosomonas marina*, sowie Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) eines marinen *Nitrospira*-Stamms, sowohl in Flüssigkultur, als auch auf Füllkörpern siedelnd (nur NOB), unterschiedlichen TRO-Konzentrationen (0; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3 und 0,6 mg/l Cl₂) für jeweils 1 h ausgesetzt und anschließend die Nitrifikationsleistung in Labor-Aktivitätstests anhand der Abbauraten von zugesetztem Ammoniak/Ammonium und Nitrit bestimmt.

Während die Aktivität sowohl der AOB als auch der NOB in Flüssigkultur mit zunehmender TRO-Konzentration erwartungsgemäß deutlich abnahm (Abb. 13), zeigten die auf Füllkörpern siedelnden Nitrifizierer (NOB) keine Beeinträchtigung ihrer Aktivität mit zunehmender TRO-Konzentration (Abb. 14).

Ein weiterer Laborversuch mit heterogen bewachsenen Füllkörpern aus einer mit Steinbutt besetzten Kreislaufanlage bestätigte die hohe Toleranz von auf Füllkörpern im Biofilm siedelnden AOB und NOB gegenüber Restoxidantien (Abb. 15). Selbst bei einer TRO-Konzentration von 0,6 mg/l, dem 10fachen des Sicherheits-Grenzwertes für den Steinbutt, konnte keine Abnahme der Aktivität im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden. Der Biofilm siedelnder Bakterien scheint durch seine extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) einen effektiven Schutz gegenüber oxidierenden Substanzen zu bieten.

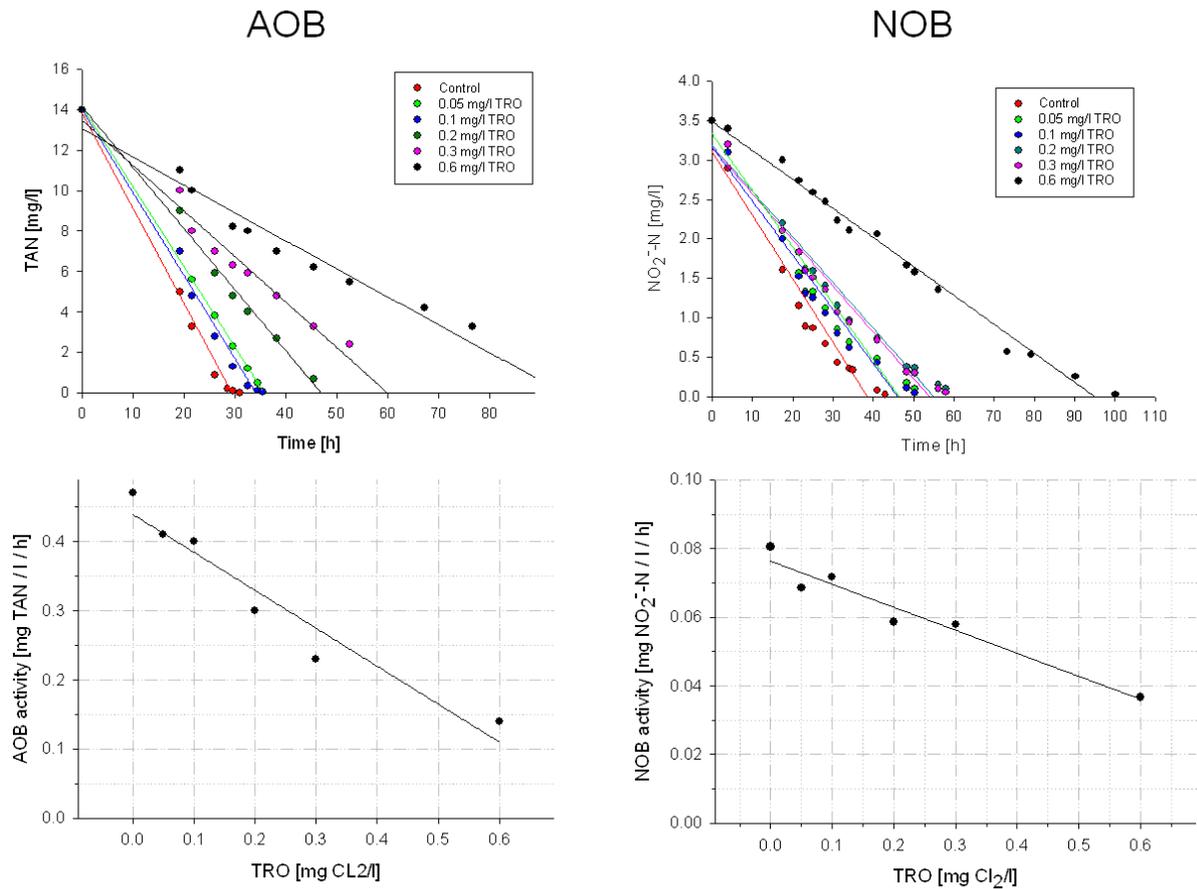


Abb. 13: Aktivität von Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) der Art *Nitrosomonas marina* sowie von Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) eines marinen *Nitrospira*-Stamms in Flüssigkultur in Abhängigkeit von der Restoxidantien-Konzentration (TRO) nach 1 h Exposition (untere Graphiken). Die oberen Graphiken zeigen die zur Bestimmung der Aktivitäten ermittelten Abbauraten von Ammoniak/Ammonium (Total ammonia nitrogen – TAN) und Nitrit (NO₂-N).

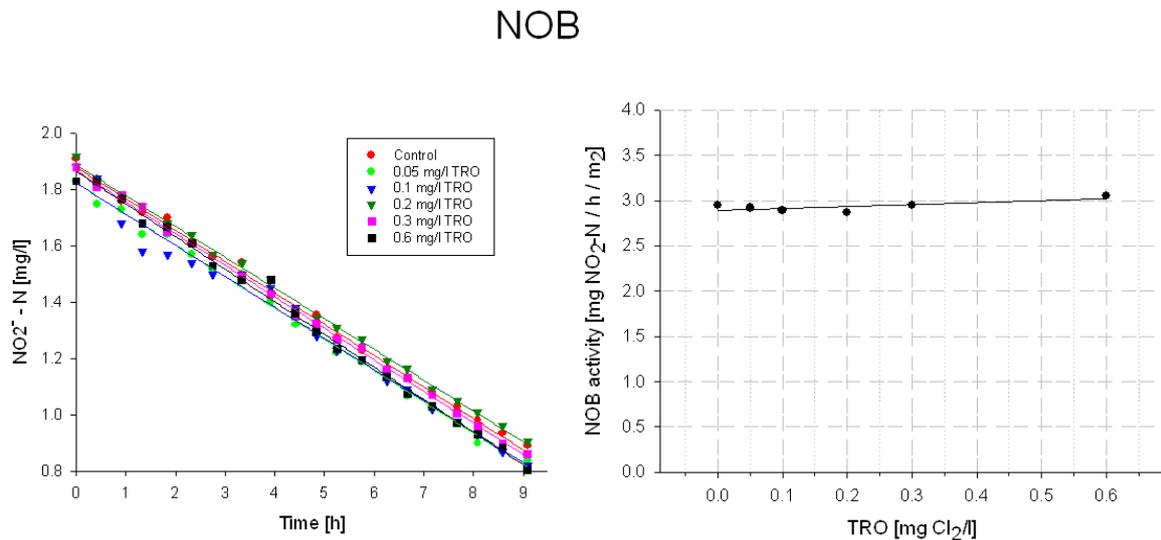


Abb. 14: Nitrit-Abbauraten (links) und die daraus ermittelten Aktivitäten von auf Füllkörpern siedelnden Bakterien eines marinen *Nitrospira*-Stamms (Biofilm aus NOB-Reinkultur) in Abhängigkeit von der Restoxidantien-Konzentration (TRO) nach 1 h Exposition.

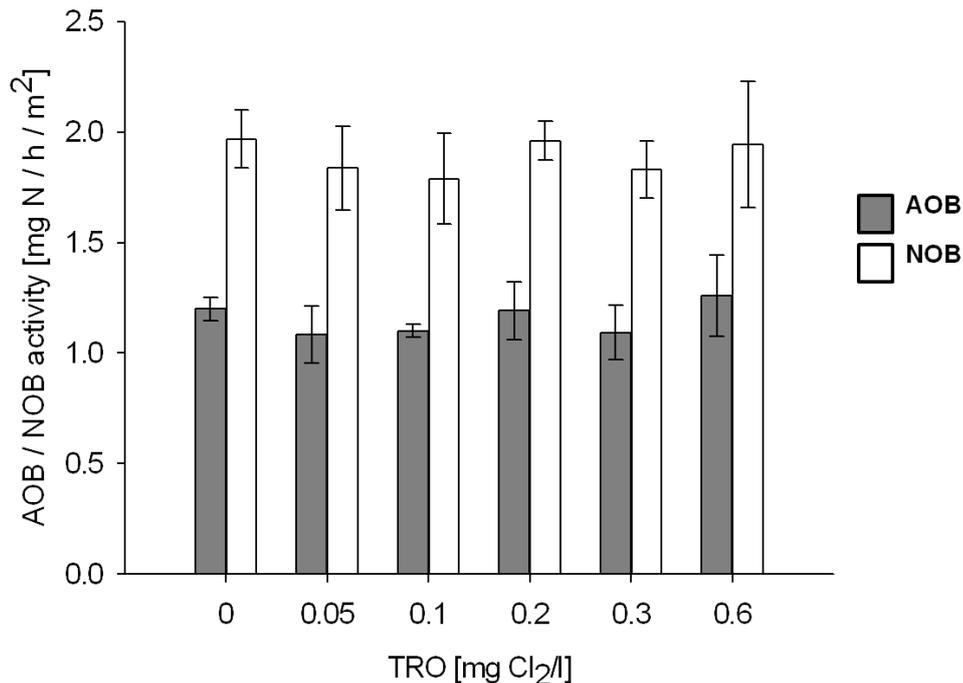


Abb. 15: Aktivität von Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) und Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) in Mischkultur (siedelnd auf heterogen bewachsenen Füllkörpern aus einer mit Wolfsbarsch besetzten Kreislaufanlage) in Abhängigkeit von der Restoxidantien-Konzentration (TRO) nach 1 h Exposition.

Um auch den chronischen Einfluss realistischer TRO-Konzentrationen auf die Nitrifikationsleistung eines Bewegungsbett-Filters beurteilen zu können, wurde in 12 separaten, mit Tilapia besetzten Versuchs-Kreislaufanlagen eine dreiwöchige Exposition mit vier unterschiedlichen TRO-Konzentrationen (0; 0,05; 0,10; 0,15 mg/l Cl₂), wie sie im Routinebetrieb einer Aquakultur-Kreislaufanlage auftreten können, durchgeführt. Zur Beurteilung der Nitrifikationsleistung wurden nach 14- bzw. 21-tägiger Exposition pro Biofilter 100 Füllkörper entnommen und die jeweiligen Aktivitäten der Nitrifizierer (AOB und NOB) in Labor-Aktivitätstests bestimmt.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen statt einer Abnahme eine deutliche Zunahme der Aktivität beider Nitrifizierer-Gruppen (AOB und NOB) bei allen getesteten TRO-Konzentrationen (0,05; 0,10; 0,15 mg/l) im Vergleich zur Kontrolle ohne Ozonisierung (Abb. 16). Während der Biofilm die Nitrifizierer vor der schädlichen Wirkung der TRO zu schützen scheint, wirkt sich die Ozonisierung selber positiv auf die Nitrifizierung aus. Möglicherweise gewährt Ozon durch Oxidation organischer Substanzen den autotrophen Nitrifizierern einen Wettbewerbsvorteil gegenüber den auf Organik angewiesenen heterotrophen Bakterien im Biofilter.

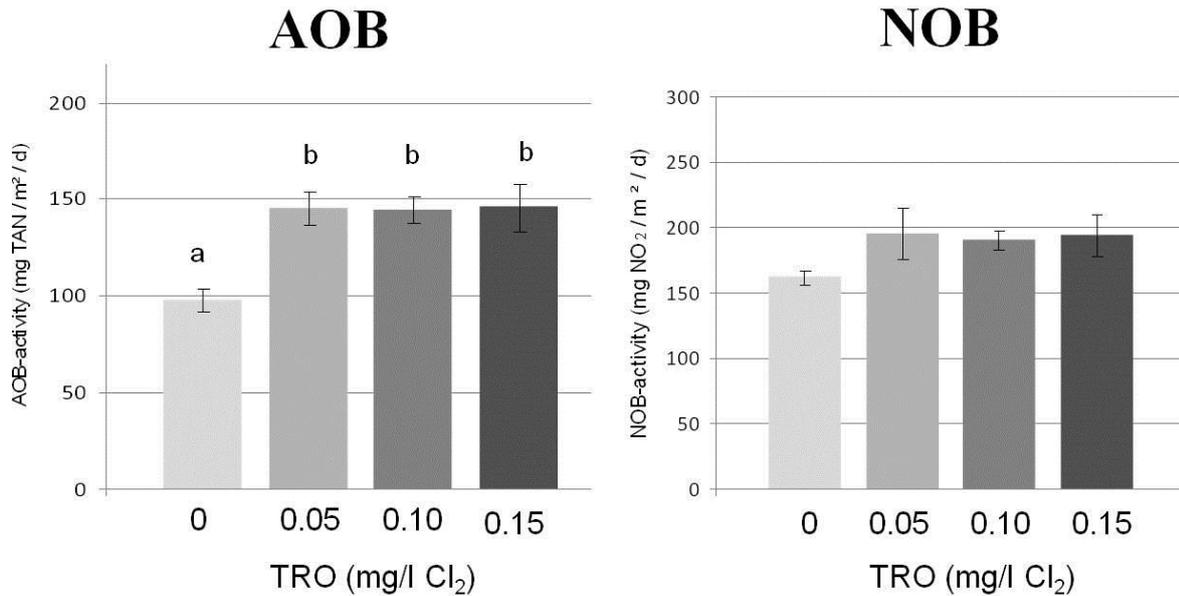


Abb. 16: Aktivität von Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) und Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) in Abhängigkeit von der Restoxidantien-Konzentration (TRO) nach 21-tägiger Exposition. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Während bereits relativ geringe TRO-Konzentrationen eine Beeinträchtigung der Gesundheit, des Wohlbefindens und der Leistungsparameter vieler Fische und Krebstiere bewirken, sind die im Biofilter siedelnden Nitrifizierer durch Ausbildung eines Biofilms effektiv gegenüber Restoxidantien geschützt und werden durch moderate Ozonisierung in ihrer Leistung sogar gefördert. Eine sinnvolle Ozon-Dosierung wird hier also durch die Fischgesundheit limitiert und sollte sich entsprechend an den jeweiligen Sicherheitsgrenzwerten für die zu kultivierten Arten orientieren. Detailliertere Ergebnisse können der Masterarbeit von Simon Klatt (CAU Kiel) entnommen werden.

Einfluss der Nitrat-Konzentration auf die Nitrifikationsleistung eines Bewegtbett - Filters

Ein bislang in seinem Einfluss stark unterschätzter Umweltparameter ist der Nitrat-Gehalt im Kreislaufwasser rezirkulierender Aquakultursysteme. Als Endprodukt der aeroben Nitrifikation im Biofilter akkumuliert Nitrat in vielen geschlossenen Kreislaufsystemen zu relativ hohen Konzentrationen.

Bislang existieren jedoch nur wenige Studien, die die Nitrat-Verträglichkeit mariner Aquakultur-Spezies untersucht haben. Der Einfluss des Nitrat-Gehalts auf die Nitrifikationsleistung des Biofilters ist sogar noch nahezu unerforscht. Daher wurde im Rahmen des Projektes eine chronische Nitrat-Exposition in 12 separaten, mit juvenilen Steinbutt besetzten Versuchs-Kreislaufanlagen bei 4 unterschiedlichen Konzentrationen (0, 125, 250 und 500 mg/l $\text{NO}_3\text{-N}$) durchgeführt und die jeweiligen Auswirkungen auf Fisch und Biofilter analysiert. Um den Einfluss des Nitrat-Gehaltes auf die Nitrifikationsleistung des Biofilter beurteilen zu können, wurden während und nach dem Expositionsversuch Füllkörper aus den jeweiligen Biofiltern entnommen und die Aktivität sowohl der Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB), als auch der Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) in Labor-Aktivitätstests anhand der Abbauraten von Ammonium/Ammoniak und Nitrit bestimmt.

Während beim Steinbutt schon bei einer Konzentration von nur 125 mg/l $\text{NO}_3\text{-N}$ eine signifikante Beeinträchtigung der Wachstumsleistung, bei einer Konzentration von 250 mg/l $\text{NO}_3\text{-N}$ sogar bereits adverse Effekte auf die Fischgesundheit zu verzeichnen waren, zeigte sich bei beiden Nitrifizierer-Gruppen (AOB und NOB) eine signifikante Beeinträchtigung der Aktivität erst bei einer Nitrat-Konzentration von 500 mg/l $\text{NO}_3\text{-N}$ (Abb. 17). Die Ergebnisse zeigen somit eine deutlich höhere Empfindlichkeit des Steinbutts gegenüber Nitrat im Vergleich zur Biofiltration. Der Nitrat-Gehalt in der kreislaufgeführten Steinbutt-Produktion scheint demzufolge durch die Fischgesundheit und -performance limitiert zu sein.

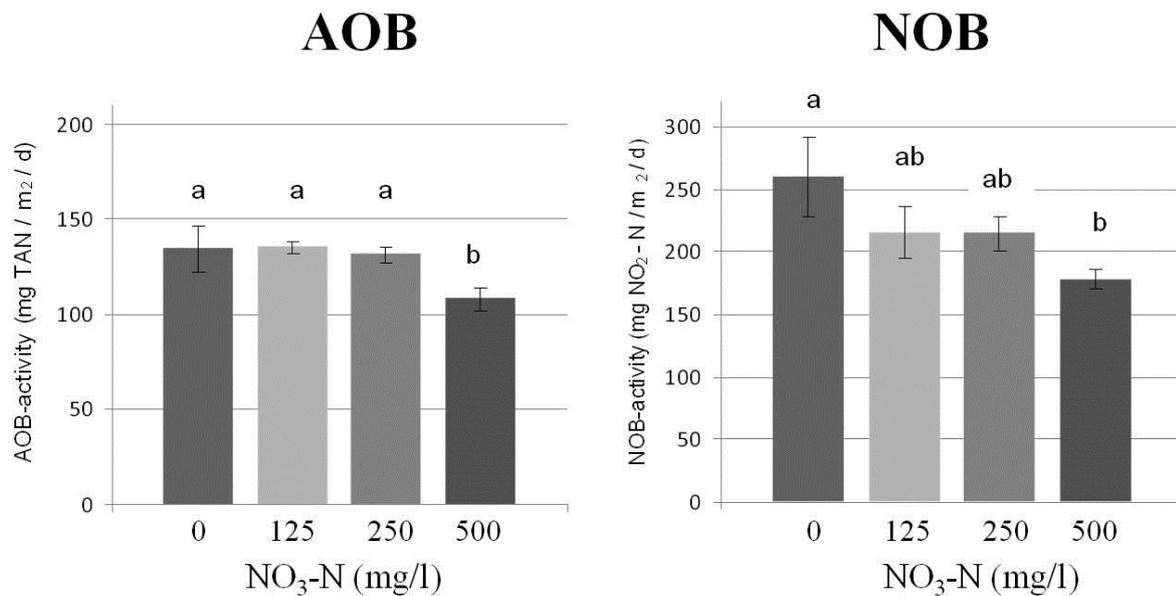


Abb. 17: Aktivität von Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) und Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) in Abhängigkeit von der Nitrat-N Konzentration (mg/l) nach 31-tägiger Exposition. Unterschiedliche Buchstaben kennzeichnen signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen.

Die Ergebnisse zeigen zudem eine stärkere Beeinträchtigung der Nitrit oxidierenden Bakterien im Vergleich zu Ammoniak oxidierenden Bakterien, was auf eine höhere Empfindlichkeit der NOB gegenüber erhöhten Nitrat-Konzentrationen schließen lässt.

Aufgrund dieses Ungleichgewichts in der Nitrat-Toleranz besteht grundsätzlich das Risiko einer Nitrit-Akkumulation im Kreislauf bedingt durch eine verstärkte Hemmung der zweiten Nitrifikations-Stufe. Detailliertere Ergebnisse können der Masterarbeit von Simon Klatt (CAU Kiel) entnommen werden.

Einfluss der Belüftungsintensität auf die Nitrifikationsleistung eines Bewegtbett - Filters

In getauchten Bewegtbett-Filtern wird der Sauerstoffbedarf der Nitrifizierer durch Einspeisung von Druckluft gedeckt. Es gibt jedoch Hinweise, die auf eine Hemmung der Abbauleistung eines nitrifizierenden Biofilters bei sehr hoher Luftzufuhr schließen lassen. Der feinblasige Eintrag von Druckluft bewirkt nicht nur eine Anreicherung des Wassers mit Sauerstoff, sondern induziert Strömungen und Verwirbelungen, die das besiedelte Filtermaterial ständig in Bewegung halten. Trotz diverser Vorteile eines bewegten Filtermediums kann ein zu starker Lufteintrag, einhergehend mit starken Turbulenzen, die Filterleistung reduzieren. Zudem ist ein starker Lufteintrag mit hohen Betriebskosten verbunden. Eine Reduktion der Belüftungsintensität ist daher aus ökonomischen Gründen anzustreben.

Ziel der Untersuchungen war daher eine verfahrenstechnische Optimierung des Bewegtbett-Reaktors im Hinblick auf eine Reduktion der Belüftungsintensität bei gleichzeitiger Gewährleistung idealer Sauerstoff- und Strömungsbedingungen für eine bestmögliche Anheftung und Aktivität der Nitrifizierer.

Mittels einer speziellen Versuchsanordnung, bestehend aus vier unabhängigen, von der Firma Spranger Kunststoffe konzipierten und bereitgestellten Bewegtbett-Reaktoren, die jeweils über ein alternatives Belüftungsverfahren verfügen, wurden unterschiedliche Belüftungsintensitäten simuliert und die jeweiligen Auswirkungen auf die Besiedelung und Aktivität der Nitrifizierer untersucht. Da insbesondere das Einfahren von Biofiltern häufig mit Komplikationen und immensen Zeitverzögerungen einhergeht, wurde der Fokus dieser Untersuchung auf die Start-Phase von Biofiltern gelegt, in der die Anheftung der Nitrifizierer auf den Füllkörpern eine zentrale Rolle spielt.

Alle Bioreaktoren wurden mit neuen, gewässerten aber unbesiedelten Füllkörpern in gleicher Menge befüllt und mit Prozesswasser einer mit Wolfsbarsch besetzten Kreislaufanlage im Technikums-Maßstab beschickt. Die vier nahezu baugleichen Reaktoren unterschieden sich nur in ihren Belüftungseinheiten (Abb. 18).

Folgende Belüftungsverfahren und Einstellungen wurden gewählt:

1. *Reaktor*: Kontroll-Reaktor mit konventionellem Belüftungsverfahren.
2. *Reaktor*: Reduzierte Einblastiefe. Die Tiefe des Lufteintrags wurde halbiert im Vergleich zur konventionellen Einblastiefe.
3. *Reaktor*: Intervall-Belüftung. 1 Min konv. Belüftung – 10 Min ohne Belüftung.

4. *Reaktor*: Mechanische Durchmischung mittels Rührer. Nur geringer Lufteintrag. Bewegung der Füllkörper wird mechanisch mittels Rührer realisiert. Nur geringe Kreisbewegung der FK.

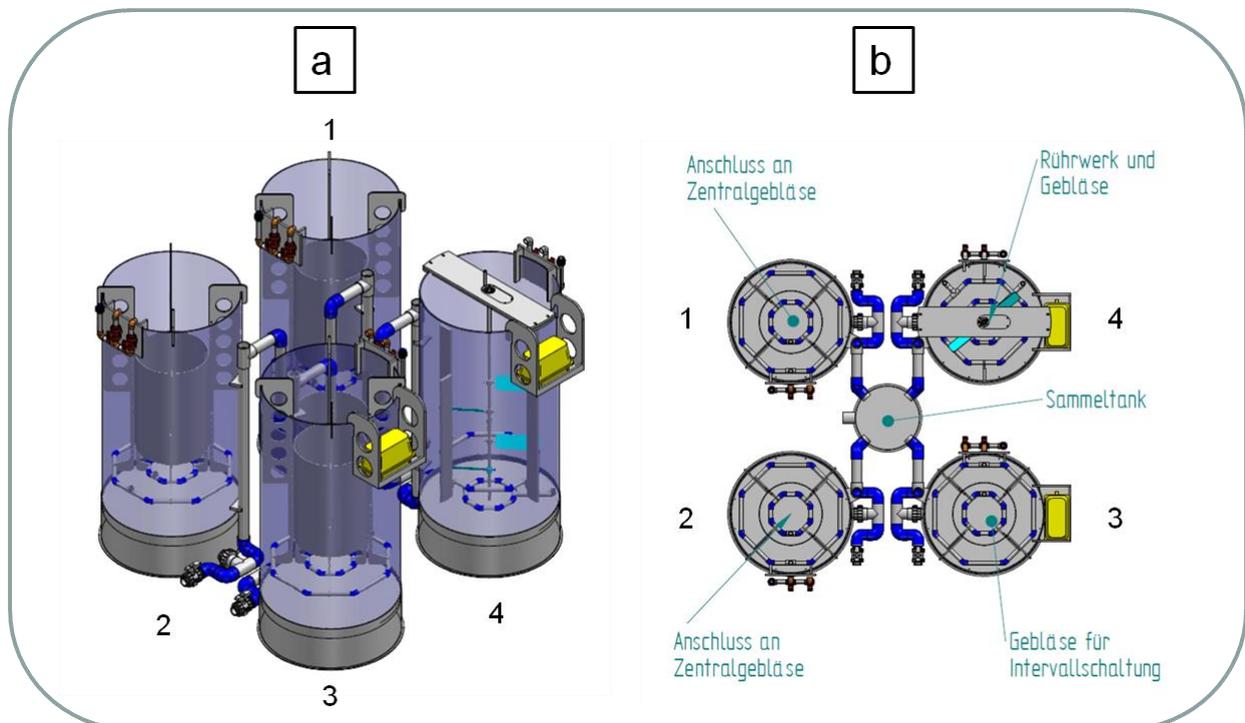


Abb. 18: Schematische Darstellung (© Spranger Kunststoffe) der vier Versuchsbiofilterreaktoren mit unterschiedlichen Belüftungsverfahren. a: Seitenansicht; b: Aufsicht. 1: Konventionelle Belüftung (Kontrolle); 2: Reduzierte Einblastiefe; 3: Intervall-Belüftung; 4: Mechanische Durchmischung (Rührer).

Um den Effekt der Belüftungsintensität auf die Anwuchs-Phase beider Nitrifizierer-Gruppen beurteilen zu können, wurden nach 14 und 21 Tagen Einlaufphase Füllkörper aus den jeweiligen Reaktoren entnommen und die Besiedelung der Füllkörper indirekt über Labor-Aktivitätstests anhand der Abbauraten von Ammoniak/Ammonium und Nitrit analysiert.

Die im Vergleich zur Kontrolle (konventionelle Belüftung) gleiche (AOB) oder sogar erhöhte (NOB) Aktivität bei den aus dem Reaktor mit reduzierter Einblastiefe stammenden Füllkörpern schließt eine Beeinträchtigung der Füllkörper-Besiedelung durch reduzierte Einblastiefe für beide Nitrifizierer-Gruppen aus (Abb. 19). Eine im Vergleich zum konventionellen Verfahren um die Hälfte reduzierte Einblastiefe scheint die Anheftung der Nitrifizierer nicht zu beeinträchtigen und stellt somit eine geeignete Methode zur Energieeinsparung und folglich zu einer Effizienzsteigerung belüfteter Bewegtbett-Filter dar.

Eine deutlich reduzierte Belüftung sowohl durch zeitliche Unterbrechung (Intervall-Belüftung), als auch durch reduzierte Intensität (mechanische Durchmischung), scheint einen sehr unterschiedlichen Effekt auf Ammoniak-Oxidierer und Nitrit-Oxidierer zu haben. Während bei den AOB eine im Vergleich zur Kontrolle reduzierte Aktivität sowohl bei der mechanischen

Durchmischung (Rührer), als auch in verstärktem Maße bei der Intervall-Belüftung auf eine Beeinträchtigung der Füllkörper-Besiedelung schließen lässt, ist bei den NOB eine im Vergleich zur Kontrolle gleiche (Intervall) oder erhöhte (Rührer) Aktivität zu verzeichnen, was einen positiven Effekt der reduzierten Belüftung in Bezug auf die Anheftung der NOB an die Füllkörper vermuten lässt (Abb. 19). Da die in allen Versuchsreaktoren erhobenen Sauerstoff-Profile eine Sauerstoff-Limitation für alle Belüftungsverfahren auszuschließen vermögen, scheint die Stärke der Füllkörper-Verwirbelung (Turbulenz) der verantwortliche Faktor für die unterschiedliche Füllkörper-Besiedelung zu sein.

Die durch reduzierte Belüftung bedingte verringerte Turbulenz im Reaktor scheint in der Anwuchsphase für AOB von Nachteil, für NOB dagegen eher von Vorteil zu sein. Da sich in der Start-Phase getauchter Bewegtbett-Filter die Nitrit-Oxidierer stets langsamer entwickeln als die Ammoniak-Oxidierer und somit häufig Nitrit als Produkt einer unvollständigen Nitrifikation im System akkumuliert, wäre eine im Vergleich zu konventionellen Verfahren reduzierte Belüftungsintensität in der Anwuchs-Phase nicht nur aus ökonomischen Gesichtspunkten, sondern auch zur Vermeidung toxischer Nitrit-Peaks beim Einfahren von Bewegtbett-Biofiltern denkbar.

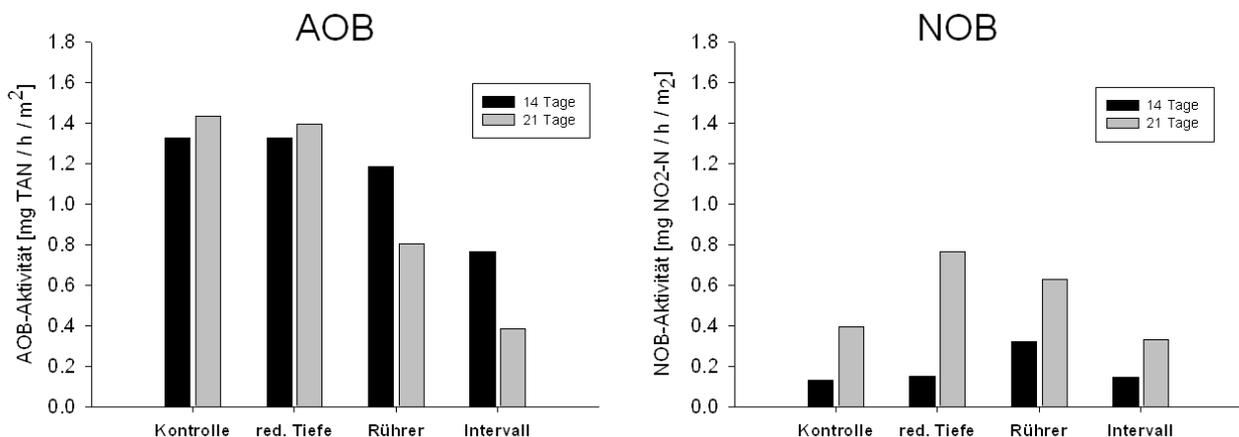


Abb. 19: Aktivität von Ammoniak oxidierenden Bakterien (AOB) und Nitrit oxidierenden Bakterien (NOB) nach 14 und 21 Tagen Einlauf-Phase bei unterschiedlichen Belüftungs-Verfahren. Kontrolle: Konventioneller Aufbau; Reduzierte Einblastiefe: halbiert; Rührer: mechanische Kreisbewegung mittels Rührstab / geringer Lufteintrag; Intervallbelüftung: 1 Min an – 10 Min aus.

Da im Dauerbetrieb bei bereits etabliertem Biofilm der durch Scherkräfte bewirkte Abrieb äußerer Schichten des Biofilms von großer Bedeutung für die Nitrifikationsleistung sein kann, sollen in naher Zukunft unter Verwendung der vier Versuchs-Biofilter weitere Langzeit-Untersuchungen zur optimalen Belüftungsintensität im Dauerbetrieb an der GMA durchgeführt werden.

Untersuchung der Startphasen von drei Bewegtbett-Filtern

Einleitung und Methodik

In Büsum wurden im Sommer 2009 drei Kreislauf-Module von je 35 m³ in Betrieb genommen. Dadurch ergab sich die Möglichkeit, das Anfahren der Biofilter zu variieren und die Entwicklung der Nitrifikationsleistung und der Mikrobiologie zu dokumentieren. Zwei der Module (1 und 3) sollten mit Steinbutt bei 17°C laufen, in Modul 5 sollten Wolfsbarsche bei 22 °C aufgezogen werden. Die Biofilter haben ein Volumen von je 5,65 m³ und waren mit 1 m³ HDPE (high density polyethylene) Füllkörpern des Typs 2H-BCN 012 KLL (GEA 2H Water Technologies) mit einer Oberfläche von 859 m²/ m³ und einer geschützten Oberfläche von 704 m²/ m³ befüllt worden, welche zuvor für eine Woche in einer Chlorlösung lagen und anschließend mit Süßwasser gespült worden waren. Die FK werden durch eine kreisförmig arrangierte Belüftung am Boden der Filter in Bewegung gehalten.

In den Pumpensumpf von Modul 1 wurde zum Start (Juli 2009) Ammoniumchlorid und Natriumnitrit gegeben, insgesamt 12g Stickstoff. Sobald in den Modulen kein Ammonium mehr gemessen wurde, wurden Mineralsalze nachgegeben. Die Fische wurden am Tag 88 eingesetzt. Modul 5 wurde als nächstes gestartet (September 2009), und zwar mit 2,6 kg Fischfutter (45% Protein), was einer Stickstoffmenge von 101 g entspricht. Die Wolfsbarsche wurden hier erst nach 126 Tagen eingesetzt. Modul 3 wurde im Oktober mit Ammoniumchlorid (15,8 g N) und 50 Litern FK aus Modul 1 angeimpft (100 Tage nach Start von M1) und nach 60 Tagen mit Steinbutt besetzt.

In Modul 1 sollte den autotrophen Nitrifikanten aus dem Nordseewasser, das zwar ozonisiert wird, jedoch nicht steril ist, durch die alleinige Gabe von Mineralsalzen ein Wachstumsvorteil/-vorsprung gegenüber heterotrophen Organismen geboten werden. Modul 3 wurde mit schon leicht bewachsenen FK aus Modul 1 beimpft, dadurch soll die Startphase verkürzt und dabei der Eintrag von pathogenen Mikroorganismen aus betriebsfremden Bereichen verhindert werden soll. Die Idee hinter der Beimpfung in Modul 5 war, dass das Fischfutter zunächst Wachstum von heterotrophen Bakterien fördert, die das Futter letztendlich mineralisieren. Die Vorteile durch die heterotrophen Mikroorganismen wäre eine Konditionierung der Kunststoffoberflächen durch anfängliche Bildung eines Biofilms, auf den sich dann die Nitrifikanten anheften können (Kreft und Wimpenny, 2001; Tsuneda et al., 2001). Des Weiteren würden mit dem Futter bereits annähernd Bedingungen geschaffen werden, die sich in Modul 1 und 3 erst nach dem Einsetzen der Fische und deren Fütterung einstellen. Es kommt häufig vor, dass die Nitrifikation nach Einsetzen der Fische zusammenbricht, die Veränderung durch die zunehmende Organik kann hier ein möglicher

Grund sein. Die mögliche Konkurrenz zwischen den Heterotrophen und den viel langsamer wachsenden Nitrifikanten um das später zugegebene Ammonium wurde bei dieser Version in Kauf genommen, eine Konkurrenz um Sauerstoff oder räumliche Verdrängung ist beim Start noch nicht anzunehmen.

Die Aktivitätstests wurden nach AOB und NOB getrennt im Labor der Mikrobiologie in Hamburg durchgeführt. Im ersten halben Jahr geschah dies fast 14-tägig, später alle 4-8 Wochen bis Oktober 2010. Die Entwicklungen der potentiellen Nitrifikationsleistungen wurden mit den Ammonium-, Nitrit- und Nitratkonzentrationen, dem Eintrag an Stickstoff und anderen Betriebsparametern verglichen. Zusätzlich wurden die nitrifizierenden Organismen in den Biofilmen auf den FK durch molekularbiologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen identifiziert. Diese Ergebnisse sind im Detail dem nächsten Kapitel zu entnehmen.

Ergebnisse

Die ansteigenden Mengen an Stickstoff in den Modulen und die im Labor gemessenen potentiellen Nitrifikationsraten der Füllkörper aus den jeweiligen Filtern korrelierten gut miteinander mit Koeffizienten zwischen 0,92 und 0,99 bei den AOB und zwischen 0,89 und 0,99 bei den NOB (0 bis 230 Tage). Die Werte waren bei M3 jeweils am höchsten. Auch konnten im Verlauf fallende Aktivitätsraten mit Ereignissen wie z.B. dem Aussetzen der Fütterung für die Sortierung der Fische in Verbindung gebracht werden. In M1 und M3 wechselte parallel mit einem solchen kurzzeitigen Abfall der Ammoniak-Oxidationsrate (nach einer einwöchigen Fütterungspause) die dominierende AOB Population (Abb. 20). In beiden Biofiltern waren vorher und nachher jeweils die gleichen *Nitrosomonas marina*-ähnliche Stämme dominierend, wie durch DGGE Analysen ermittelt. Auch in M5 wechselte die dominierende AOB Population, und zwar kam eine weitere direkt mit dem Einsetzen der Fische dazu. Es koexistierten beide Stämme über einen Zeitraum von 4 Monaten, danach war nur noch der „neue“ zu detektieren. Die Zusammensetzung der NOB, die im Biofilm der FK aller drei Filter gefunden wurden, war über den gesamten Probenzeitraum von bis zu 477 Tagen (M1) nahezu gleich. *Nitrospira* wurde über den gesamten Probenzeitraum detektiert, während *Nitrobacter* und *Nitrotoga* z.B. während der Sommermonate 2010 nicht per PCR nachgewiesen werden konnten.

Wie man aus Tabelle 5 ersehen kann, waren auch die durchschnittlichen Werte der Parameter pH, Sauerstoff, Salinität, Temperatur und Redox Potential in allen 3 Biofiltern vor dem Einsetzen der Fische sehr ähnlich. Dennoch entwickelten sich die Aktivitäten von Nitrifikanten jeweils sehr unterschiedlich (Abb. 20 und 21).

Nitrifizierende Aktivitäten konnten im Gegensatz zu den beiden anderen Modulen in M1 erst relativ spät im Labor gemessen werden (Abb. 20 und 21). So wurde am Tag 40 nur eine AOB Aktivität von 1,14 mg pro m² pro Tag gemessen, die dann auf 32 mg TAN pro m² pro Tag am Tag 112 anstieg, was auch genug für die anfänglichen Futterrationen war. Die langsamer wachsenden NOB schafften das jedoch nicht: Nitrit-oxidierende Aktivitäten konnten mit der verwendeten Methode erst ab Tag 132 mit 0,88 mg TNN pro m² pro Tag verzeichnet werden (TNN = total nitrite nitrogen).

Tab. 5: Durchschnittliche Werte mit Standardabweichung in den Systemen vor und nach dem Einsetzen der Fische (bis Tag 473 (M1), 364 (M3) und 385 (M5)). Sauerstoff und Temperatur wurden direkt im Biofilter gemessen.

	Sauerstoff [mg/l]				Temperatur [°C]				pH			
	vorher	+/-	nachher	+/-	vorher	+/-	nachher	+/-	vorher	+/-	nachher	+/-
M1	7.54	0.43	8.33	0.66	22.30	2.63	17.21	1.10	8.23	0.10	7.57	0.32
M3	7.44	0.62	8.29	0.57	21.53	2.97	17.28	1.45	7.74	0.65	7.48	0.21
M5	7.54	0.39	7.57	0.74	22.68	2.49	22.26	2.86	8.31	0.18	7.53	0.33
	Salinität [ppt]				Redox [mV]							
	vorher	+/-	nachher	+/-	vorher	+/-	nachher	+/-				
M1	29.23	1.39	28.77	1.92	163.79	44.14	141.45	44.04				
M3	32.50	2.22	27.85	2.02	170.77	34.57	122.15	31.46				
M5	33.86	2.17	29.25	2.00	189.45	42.12	145.22	29.54				

Der Biofilter von Modul M3 wurde mit 50 Litern FK aus dem Biofilter von Modul 1, der zu dem Zeitpunkt schon 100 Tage lief, und mit Ammoniumchlorid als Substrat gestartet. 23 mg TAN pro m² und Tag konnten die AOB auf diesen FK schon oxidieren, während die NOB, wie oben erwähnt, noch keine Aktivitäten im Labor zeigten, es aber wahrscheinlich schon zu geringem Wachstum auf den Füllkörper gekommen war. Auf jeden Fall, und wie erwartet, stiegen die Nitrifikationsraten in Biofilter M3 schneller an als in M1 (Abb. 20 und 21). Allerdings wurden hier sehr früh (nach 60 Tagen) die Steinbutte eingesetzt, so dass auch hier die Nitrifikationsleistung der NOB nicht für die anfängliche tägliche Menge Futter ausreichte (ca. 20 mg TAN pro m² pro Tag).

Besonders im Gegensatz zu M1 konnten mit den FK aus Biofilter M5 mittels Aktivitätstests schon nach 23 bzw. 58 Tagen Werte von 7 bzw. 4,4 mg TAN bzw. TNN pro m² pro Tag ermittelt werden. Es ist möglich, dass die um das zwanzigfache höhere initiale N Ladung in Form von Futter zum schnelleren, weil kontinuierlicherem Wachstum beigetragen hat. Allerdings musste das Futter jedoch erst von heterotrophen Mikroorganismen mineralisiert werden, und diese werden auch einen Teil des Stickstoffes aufgenommen haben.

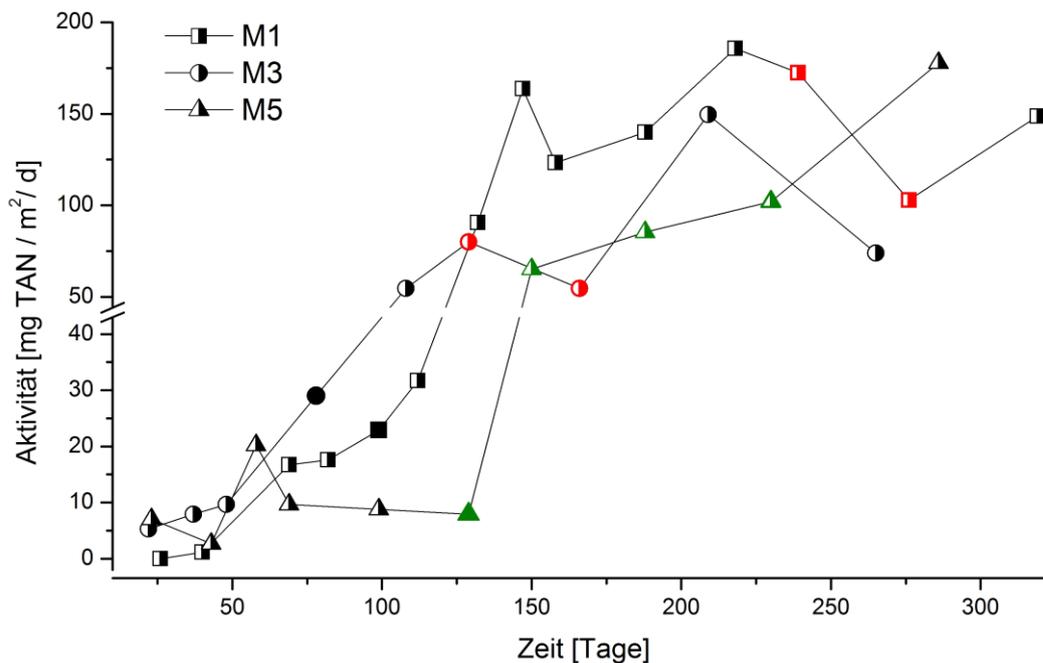


Abb. 20: Entwicklung der potentiellen nitrifizierenden Aktivitäten der AOB auf den FK in mg/TAN pro Quadratmeter pro Tag. Die gefüllten Symbole bezeichnen die erste Probenahme nach Einsetzen der Fische. In M1 und M3 wechselte die dominierende AOB Population im selben Zeitraum (unterschiedliche Zeitspanne seit jeweiligem Start; rote Symbole), in Modul 5 dominieren ab Einsetzen der Fische zwei AOB Populationen für einen längeren Zeitraum (grüne Symbole).

Ein weiterer Hinweis deutet auf einen Vorteil durch die Beimpfung mit Fischfutter: in beiden BF M1 und M5 persistierte für eine Dauer von 49 bzw. 38 Tagen eine Nitrit-Konzentration von über 0,5 mg/l, genug Substrat also für das Wachstum von NOB. In M5 wurde dieses Nitrit ab ca. Tag 58 von NOB zu Nitrat oxidiert, die, wie oben erwähnt, schon eine Aktivität zu diesem Zeitpunkt aufwiesen (Abb. 21) Es ist also möglich, dass die Gabe von Fischfutter besonders für die NOB ein Vorteil ist. Außer den oben erwähnten Möglichkeiten kann es auch sein, dass kleine organische (C oder N) Substanzen von den heterotrophen Bakterien aus dem Futter produziert wurden. Der *Nitrospira* Ecomares Stamm 2.1, der in allen drei GMA Biofiltern vorkommt und mit großer Wahrscheinlichkeit die Nitritoxidation dominiert, wächst nachweislich besser, wenn Pyruvat und Pepton zusätzlich zum Nitrit vorhanden sind (Keuter et al., 2011).

Nach 49 Tagen ging auch der Nitritpeak in M1 zurück und Nitrat wurde gebildet, allerdings ist diese Oxidation mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Ozon zurückzuführen, dass ab dieser Zeit mit dem Abschäumer zugeführt wurde. Es dauerte tatsächlich noch ca. 40 Tage, bis im Labor NOB Aktivitäten von über 20 mg TNN pro m² pro Tag mit den FK aus M1 gemessen werden konnten.

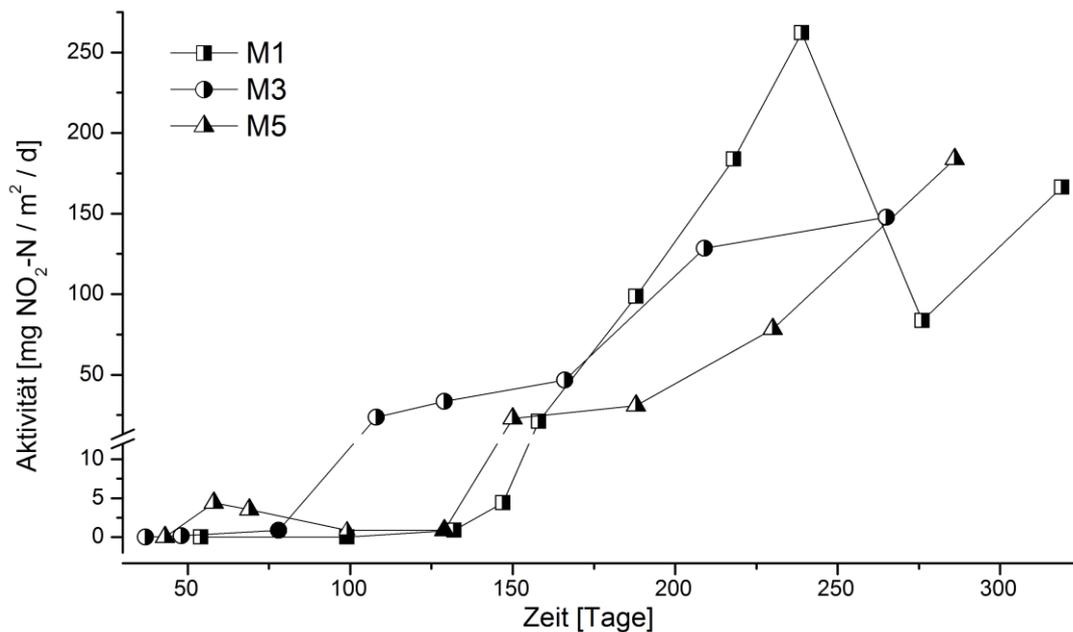


Abb. 21: Entwicklung der potentiellen nitrifizierenden Aktivitäten der NOB auf den FK in mg Nitrit-N pro Quadratmeter pro Tag. Die gefüllten Symbole bezeichnen die erste Probenahme nach Einsetzen der Fische.

Die anfänglich recht schnell gestiegenen Aktivitäten von AOB und NOB in M5 fielen nach dem Probenahmetag 58 wieder ab und blieben bis zum Tag 126, an dem die Wolfsbarsche eingesetzt wurden, auf niedrigem Niveau von 8 mg TAN bzw. 0,9 mg TNN pro m² pro Tag (Abb. 20 und 21). Es ist anzunehmen, dass für die AOB die durchschnittliche Ammoniumchlorid-Zufuhr von 4,17 mg TAN pro m² pro Tag (von Tag 59 bis 113) nicht ausreichend war, um die Aktivitäten der AOB aufrecht zu erhalten. Da in M5 schon ab Tag 105 (21 Tage vor Einsatz der Fische) der Abschäumer angestellt wurde, und somit die Ozon-Zufuhr, könnte ab diesem Zeitpunkt ebenfalls das Ozon hinderlich für die Ausbildung von NOB Aktivitäten gewesen sein.

Nach dem Einsetzen der Fische kam es in allen Biofiltern zu recht hohen Nitrit-Konzentrationen. Besonders im Biofilter von Modul 5 mussten diese durch den Austausch von Wasser gesenkt werden. Die unterschiedlichen bekannten und unbekannt Parameter zwischen den Modulen nach dem Einsetzen der Fische lassen wenig Raum für Spekulationen bezogen auf die Beimpfung. Es ist daher nicht zu klären, ob die hohen Nitritpeaks nach dem Einsetzen der Fische in M5 beispielsweise noch durch die Art der Beimpfung begründet sind oder durch andere Faktoren entstanden sind.

Folgende Schlussfolgerungen haben sich aus diesem Langzeituntersuchungen ergeben: Aktivitätstests im Labor sind ein geeignetes Werkzeug, um die Entwicklung von Nitrifikationspotentialen von Biofiltern in Einlaufphasen zu beobachten.

Gemäß ihrer unterschiedlichen Wachstumsraten entwickeln sich die Aktivitäten der AOB schneller als die der NOB, daher greift der Ansatz, gleichzeitig Ammonium und Nitrit zu geben, zu kurz; eine anfängliche Nitrit und spätere Ammonium-Gabe wäre zu versuchen, allerdings wird sich dadurch die Anlaufphase nicht wesentlich verkürzen.

Solange keine Fische eingesetzt werden, ist eine sehr hohe Gabe an Ammonium und Nitrit zu empfehlen, um anfängliches Wachstum zu unterstützen. Allerdings muss dabei darauf geachtet werden, dass die Nitrifikationspotentiale für die anfängliche Menge des Futters nicht viel zu hoch sind.

Die unterschiedlichen Methoden der Beimpfung hatten keinen Einfluss auf die Zusammensetzung der NOB; die dominierenden AOB Stämme in dem mit Futter beimpften M5 und den ohne Futter beimpften Modulen waren jedoch unterschiedlich.

Es ist scheint möglich, dass Futter oder andere organische Substanzen das Wachstum von NOB beschleunigen.

Ozon sollte nach Möglichkeit erst eingeleitet werden, wenn die Menge der Substanzen, die vom Ozon dem Nitrit gegenüber bevorzugt oxidiert werden (z.B. Gelbstoffe) ausreichend ist, um den NOB genug Substrat zum Wachstum zu lassen.

Nitrifizierende Mikroorganismen in marinen Aquakulturanlagen

Erst seit wenigen Jahren werden Populationsanalysen von nitrifizierenden Bakterien in Biofiltern von Aquakulturanlagen oder Aquarien durchgeführt, wobei es nur wenige Informationen über marine Anlagen gibt. Es existierten außerdem keine Laborkulturen von Ammoniak- oder Nitritoxidanten, die aus Aquakulturanlagen stammen. Die Analyse der Wachstumsparameter, welche nur mit hoch angereicherten oder isolierten Stämmen möglich ist, kann bei der Optimierung von Biofiltersystemen hilfreich sein.

Für die Charakterisierung der Mikroorganismen aus den Biofiltern wurden sowohl Naturproben (der Biofilm selbst) als auch Anreicherungskulturen verwendet. Bei letzteren werden je nach Medium und anderen Faktoren (Rühren, Temperatur, Salzgehalt etc.) bestimmte Bakterien aus den Naturproben bevorzugt und stark angereichert. Die Isolierung einzelner Stämme kann durch Percollzentrifugation, wiederholte Verdünnungsreihen und ggf. Vereinzelung von Kolonien bei Wachstum auf Agarose geschehen.

Zur Identifizierung der nitrifizierenden Bakterien und anderen Mikroorganismen in den Anlagen wurden verschiedene Methoden angewandt: Transmissions-Elektronenmikroskopie, Fluoreszenz *in-situ* Hybridisierung (FISH), Denaturierende Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE), Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Primern, Klonierungen mit anschließender RFLP-Analyse (Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus), chemotaxonomische Untersuchungen mittels Fettsäureanalytik. Genauere Angaben zu den Methoden können dem Zwischenbericht entnommen werden.

Ammoniak-oxidierende Bakterien in den untersuchten Anlagen

Ammoniak oxidierende Bakterien (AOB) sind in der Biofilterforschung bisher bevorzugt untersucht worden, da sie den ersten und damit geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Nitrifikation durchführen. Nitrit oxidierende Bakterien (NOB) oxidieren das Produkt der AOB weiter zu Nitrat, und können demnach nicht mehr Nitrit oxidieren, als die AOB produziert haben.

Die Diversität von untersuchten AOB Populationen in Kläranlagen variiert zwischen Einzelpopulationen bis zur Koexistenz von mehreren verschiedenen AOB (Wittebolle *et al.*, 2009). Verschiedene Faktoren wie z.B. die Ammoniumkonzentrationen oder der Salzgehalt im Wasser sind entscheidend für die Etablierung einzelner Arten von Ammoniakoxidanten (Burrell *et al.*, 2001; Grommen *et al.*, 2005). Als Schlüsselorganismus in Salzwasseraquarien und -aquakulturen wurde häufig *Nitrosomonas* identifiziert, zum Beispiel *Nm cryotolerans* ,

Nm strain 143, *Nm aestuarii*, *Nm europea*, *Nm marina* (Tal et al., 2003; Foesel et al., 2007; Itoi et al., 2006).

Nitrosospira-ähnliche Bakterien wurden ebenfalls als dominierende AOB in Biofiltern identifiziert (Sakano et al., 1998; Schramm et al., 1998; Terada et al., 2010), obwohl sie als typische dominierende AOB in Habitaten mit niedrigen Substratkonzentrationen (Prosser, 1989) oder anderen ungünstigen Bedingungen beschrieben wurden (Li et al., 2007). Auch Ammoniak oxidierende Archaeen wurden häufig in Süß- und Salzwasseraquarien gefunden (Könnecke et al., 2005; Sauder et al., 2011)

In den untersuchten Biofiltern von Ecomares und der GMA in Büsum und der Marifarm in Strande wurden durch molekularbiologische Methoden und Elektronenmikroskopie *Nitrosomonas*-ähnliche Bakterien als dominierende AOB determiniert. Die AOB Populationen in den drei marinen Kreislaufsystemen der GMA wurden während der Startphasen ab Sommer 2009 genauer untersucht. Dafür wurden über einen Zeitraum von 1,5 Jahren Biofilm-Proben genommen, die DNA isoliert und mittels DGGE die *Nitrosomonas*-spezifischen Sequenzen aufgetrennt und sequenziert.

Es zeigte sich, dass in Biofilter 1 und 3 jeweils die gleiche *Nitrosomonas*-Population vorherrschte, die sich im Laufe der Zeit veränderte. Hier war zunächst ein *Nitrosomonas* präsent, dessen Sequenz identisch mit der eines Klons aus einer marinen RAS in Israel (Foesel et al., 2007) war. Im März 2010 wurde in beiden Modulen die Fütterung der Fische ausgesetzt und neue Füllkörper in die Biofilter gegeben. In diesem Zeitraum wurde die AOB-Population in beiden Filtern von einer anderen abgelöst, deren 16S rRNA Gen-Sequenz der aus einer Garnelenfarm (Genebank Accession No. EU155069) am meisten ähnelte.

Dieser *Nitrosomonas* war zunächst der dominierende AOB im Biofilter 5 gewesen; nach 2 Monaten Laufzeit und mit Einsetzen der Fische kam ein zweiter AOB hinzu. Nach 3 Monaten dieser Koexistenz (Februar bis Mai 2010) konnte nur noch die zweite, neuere Sequenz detektiert werden, die fast identisch mit der Sequenz eines Klons aus einer Anreicherung mit Nordseewasser aus Büsum war (Sudarno et al., 2009). Es ist möglich, dass die beschriebenen Faktoren (Hungerphasen, neue Füllkörper, Einsetzen der Fische) die Wechsel der dominierenden AOB ausgelöst haben.

Es ist nicht auszuschließen, dass sich weitere AOB in den Filtern befinden, die durch die genannte Methode nicht detektiert werden konnten. Zum einem ist es immer möglich, dass bei der DNA-Isolation nicht alle Zellen geöffnet wurden, zum anderen könnten die Primer nicht richtig gebunden haben und somit Sequenzfragmente weiterer AOB nicht amplifiziert haben.

Tatsächlich konnten Sequenzen von *Nitrosospira* sp Nsp17 mittels *Nitrosospira*-spezifischer PCR mit der DNA aus den Biofiltern 1 und 3 amplifiziert werden. Diese AOB hätten auch mit den für die DGGE verwendeten Primern amplifiziert werden müssen. Wahrscheinlich war

hier die geringe Anzahl an *Nitrosopira* - DNA im Vergleich zur *Nitrosomonas* - DNA für die unausgeglichene PCR-Amplifikation ausschlaggebend. Auch bei der DGGE werden DNA-Mengen unter 1 % der Gesamt-DNA nicht detektiert (Muyzer et al., 1993).

Ebenfalls wurden per spezifischer PCR Nitrosospiren in den Biofiltern der beiden anderen Anlagen in Büsum und Strande gefunden. *Nitrosococcus*-spezifische Sequenzen dagegen konnten in keiner Probe aus den untersuchten Filtern amplifiziert werden, obwohl diese ausschließlich marinen AOB mit ihrer auffälligen Ultrastruktur mittels Elektronenmikroskopie gefunden wurden, und zwar in Proben aus der Ecomares als auch der Marifarm Anlage. Es handelt sich hierbei möglicherweise um eine unbekannte Art, die mit den bekannten Primern nicht amplifiziert werden kann.

Aufgrund dessen wurden eine Vielzahl von Anreicherungskulturen mit Proben aus den Biofiltern der Ecomares und der Marifarm Anlage über die letzten Jahre angesetzt, gefüttert und untersucht, jedoch gelang es nicht, einen *Nitrosococcus* oder *Nitrosopira* anzureichern. Es konnte aber ein *Nitrosomonas* sehr stark durch Ausplattierung nach mehreren Verdünnungsreihen angereichert werden, was durch FISH mit β -AOB-spezifischer Sonde überprüft wurde. Die fast kompletten 16S rRNA Gen-Sequenz dieser marinen *Nitrosomonas* Kultur ist am nächsten mit Nm strain 51 verwandt, der aus Pazifischem Wasser (Peru) isoliert wurde (96,9 % Sequenzähnlichkeit). Die ähnlichste Sequenz aus Umweltproben stammt aus einem Süßwasseraquarium (98 %). Die Sequenz einer amoA Genkopie dieses Bakteriums ist identisch mit Sequenzen aus dem Biofilter eines RAS in Israel.

Im Laufe der Anreicherungsversuche wurden die AOB-Kulturen aus der Ecomares Anlage bereits mit anderen Reinkulturen in Versuchen zur Hemmung durch Plastik und Nitrat eingesetzt. Es zeigte sich, dass auch AOB Kulturen von Substanzen, die aus Kunststoffen migrieren, gehemmt werden, aber erhöhte Nitratwerte (bis 100 mM zum Beispiel bei Kultur „Percoll U“) keinen Einfluss auf die Ammoniakoxidation haben.

Ammoniak-oxidierende Archaeen in den untersuchten Anlagen

Erst seit kurzem ist bekannt, dass es auch Ammoniak oxidierende Mikroorganismen in der Domäne der *Archaea* gibt. Könnecke und seine Kollegen haben 2005 das Archaeon *Nitrosopumilus maritimus* aus einem Aquarium isoliert und beschrieben. Archaeen konnten in den Modulen der GMA nicht nachgewiesen werden, jedoch fanden sich *N. maritimus*-ähnliche Sequenzen in den Biofiltern der Ecomares und der Shrimp-Anlage in Strande.

Nitrit-oxidierende Bakterien in den untersuchten Anlagen

Wie oben angedeutet gibt es nur eine sehr überschaubare Anzahl an Forschungsergebnissen zur Charakterisierung der Nitrit-oxidierende Bakterien in Biofiltern von (marinen) Aquakulturanlagen. Da NOB aber als sensibler als AOB angesehen werden (Graham und Knapp, 2007), ist eine Identifikation der dominierenden NOB und im besten Falle weitere physiologische Untersuchungen der identifizierten Arten von Bedeutung für eine Optimierung der Biofiltersysteme in marinen Anlagen.

Die Ergebnisse einer umfassenden Analyse der Abundanzen von NOB im Biofilm eines marinen RAS haben Fösel und Kollegen 2007 publiziert. Die dominierenden NOB waren hier *Nitrospira marina*-ähnliche Bakterien, deren Zellzahlen 4x so hoch waren wie die der AOB (*Nitrosomonas*). Weitere NOB wurden hier nicht gefunden.

Die NOB in den Biofiltern der Ecomares Anlage wurden mittels molekularbiologischen (Identifikation) und chemotaxonomischen (metabolische Aktivität durch Markierung von Spezies-spezifischen Fettsäuren) Methoden untersucht, die Ergebnisse wurden 2011 in *Environmental Microbiology* veröffentlicht (Keuter et al., 2011); hier sind ebenfalls *Nitrospira marina*-ähnliche Bakterien für die Nitrit-Oxidation verantwortlich. Außerdem gelang es, innerhalb von nur 4 Jahren, einen neuen *Nitrospira* aus diesen Biofiltern zu isolieren. Dieser ist zwar sehr nahe verwandt mit dem einzigen bisherig beschriebenen Vertreter der marinen Nitrospiren, *N. marina*, zeichnet sich jedoch im Gegensatz dazu durch schnelles Wachstum, Resistenz gegenüber hohen Konzentrationen an Nitrit und Nitrat, und durch eine starke Tendenz, Biofilm zu entwickeln, aus.

Die 16S rRNA dieses Stammes, der Ecomares 2.1 genannt wurde, weist hohe Ähnlichkeiten mit Sequenzen auf, die aus den Biofiltern der GMA (99,3 – 100 % Ähnlichkeit), der Marifarm in Strande (98,7 - 99,3 %) und dem von Fösel *et al.* untersuchten Tropfkörper-Biofilter in Rehovot, Israel (98,8 % Ähnlichkeit, Accession No. AM295541) stammen.

Ein weiterer *Nitrospira* konnte aus der Ecomares Anlage hoch angereichert werden („M1 marin“; Acc.No. HQ686083). Wieder fanden sich sehr ähnliche 16S rRNA Gensequenzen in anderen marinen RAS: 98,6 % Ähnlichkeit zu Sequenzen aus seiner Shrimp-Farm (Accession No. HM345625 und HM345623), identisch mit einer (kurzen) Sequenz aus dem Modul 5 der GMA, und 99,8 % Ähnlichkeit (1160 bp) mit Sequenzen aus den Biofiltern der Marifarm.

Die Biofilter der Shrimps- Anlage und der Barramundi-Anlage der Marifarm wurden ebenfalls mit der Methode der Fettsäuremarkierung untersucht. Auch hier zeigten die Ergebnisse klar, dass *Nitrospira* der relevante NOB in den Anlagen ist. Neben der Markierung der Fettsäuren wurden hier auch Klonierungen von *Nitrospira*-spezifischen Sequenzen durchgeführt, um herauszufinden, wie viele Stämme von *Nitrospira* in den Filtern koexistieren: vier

Untergruppen bildeten sich bei der phylogenetischen Einordnung der *Nitrospira*-Sequenzen innerhalb des *N. marina*-Clusters. Dabei bildeten sich 3 der 4 Cluster um bekannte Stämme, nämlich *N. marina*/ Ecomares 2.1, S11 aus der Laptev-See und M1 marin aus der Ecomares-Anlage. Die Veröffentlichung dieser Ergebnisse, die in Kooperation mit André Lisпки und Myriam Kruse der Universität Bonn erarbeitet wurden, ist in Bearbeitung (eingereicht).

Neben den dominierenden *Nitrospira*-Arten fanden sich weitere NOB in den untersuchten Anlagen nur über spezifische PCR und Sequenzierung der Amplifikate: die 16S rRNA Gen-Sequenz des marinen Stammes *Nitrobacter* 311 wurde in allen Anlagen (außer dem Barramundi-System in Strande) nachgewiesen und die von *Nitrotoga arctica* in den Modulen der GMA und in beiden Systemen in Strande, jedoch nicht in der Ecomares Anlage. Die Anreicherung von NOB aus Proben der Ecomares Biofilter in terrestrischem Medium führte zur Detektion von *Nitrobacter hamburgensis* und *Nitrospira moscoviensis* mittels PCR. Diese hohe Diversität an NOB auf Gattungsebene wurde bisher nur von wenigen Autoren beschrieben (Alawi et al., 2007; Xiao et al., 2009).

Die Fettsäuremarkierungen und elektronen- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zeigten, dass andere NOB als *Nitrospira* jedoch bei der Nitritoxidierung keine Rolle spielen und nur in geringen Zellzahlen vorkommen.

Lagerung von bewachsenen Füllkörpern

Einleitung und Methodik

Die Nutzung von bereits besiedelten Füllkörpern kann für die Reaktivierung von Biofiltern nach Ruhephasen oder für den Start neuer Biofilter von Vorteil sein. Nitrifikanten sind dafür bekannt, lange Hungerphasen überdauern zu können, ganz im Gegensatz zu den meisten heterotrophen Bakterien. Um geeignete Lagerzeiten und leicht zu realisierende Lagerungsbedingungen für Füllkörper zu untersuchen, wurden Restaktivitäten von AOB und NOB auf Füllkörpern nach 3, 6, 9 und 12 Monate gemessen, während derer die Füllkörper trocken oder in Wasser bei 4 und 17 °C gelagert wurden. Die FK waren dem Modul 1 der GMA im Oktober 2011 entnommen worden. Die FK, die für die trockene Lagerung bestimmt waren, wurden zuvor 6 Wochen bei 28 °C getrocknet, um dem Befall von Pilzen vorzubeugen.

Die Reaktivierungstests, alle 3 Monate durchgeführt, waren zum einen qualitativ, um festzustellen, ob es überhaupt noch nitrifizierende Aktivitäten gibt (Trockenlagerung), und quantitativ, wobei die Zunahme von Nitrit und Nitrat bzw. die Abnahme von Nitrit mittels HPLC gemessen und aufgetragen wurde und eine Aktivität pro Zeiteinheit berechnet wurde (Lagerung in Wasser). Nachdem das Substrat vollständig oxidiert worden war, wurden die FK in frisches Medium gegeben und die Aktivitäten erneut bestimmt (erster und zweiter Aktivitätstest).

Ergebnisse

Die trocken bei 17 °C gelagerten Füllkörper verloren ihre Nitrifikationspotentiale nach 3 Monaten Lagerung, während die bei 4° C gelagerten auch nach 12 Monaten innerhalb von 5 Wochen 1 mM Substrat umsetzten, ebenso weitere Substratgaben.

Die Füllkörper, die in Meer- und Leitungswasser bei 4° und 17 °C gelagert wurden, zeigten noch relativ hohe Restaktivitäten auch nach mehreren Monaten. In Abb. 22 sind diese potentiellen Aktivitäten der AOB und NOB dargestellt in Prozent der ursprünglichen Aktivitäten im Oktober 2011 (1465 (AOB) und 1325 (NOB) nmol pro FK pro Tag). Die ermittelten Rest-Aktivitäten sind die Durchschnittswerte von jeweils 3 Parallelen. Die Standardabweichungen variierten zwischen 10 und 40 % der jeweiligen Nitrit- bzw. Nitrit + Nitrat-Konzentrationen und waren damit akzeptabel. Wegen zu hoher Verdunstung bei einer Testtemperatur von 28 °C (3 Monate) wurden die weiteren Tests bei 22 °C durchgeführt.

Extensive lag-Phasen wurden nicht beobachtet, besonders die Nitrifikanten auf den FK, die bei 4 °C in Wasser gelagert worden waren, oxidierten das Substrat auch nach 9 Monaten sofort (AOB und NOB).

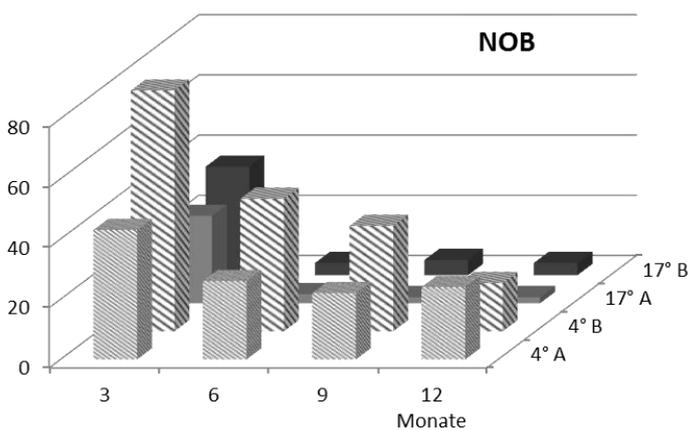
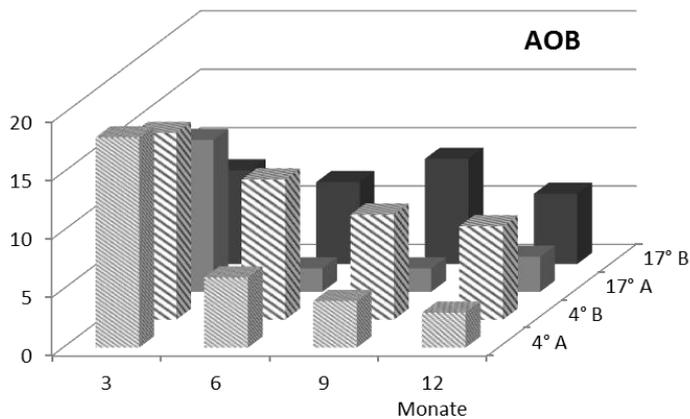


Abb. 22: Restaktivitäten in % von den ursprünglichen Aktivitäten der AOB (oben) und NOB (unten) nach Lagerung in Wasser bei 4 und 7°C im ersten (A) und zweiten (B) Test.

Generell nehmen die Aktivitäten mit der Zeit ab und sind, mit Ausnahmen, in den zweiten Tests höher als in dem ersten. Die höchsten Restaktivitäten wurden mit den FK gemessen, die bei 4 °C gelagert wurden, und NOB Aktivitäten waren fast immer höher, obwohl die Ausgangsaktivitäten im Oktober 2011 ungefähr gleich waren. Die stärkste Abnahme der Nitrifikationspotentiale wurde für die Zeit zwischen 3 und 6 Monaten beobachtet, was besonders für die bei 17 °C gelagerten FK gilt (AOB und NOB).

Eine mögliche Stimulierung von AOB nach Hungerphasen durch Nitrit (Laanbroek et al., 2002) wurde mit FK nach 6-monatiger Lagerung bei 4 °C überprüft, wofür dem Testmedium 0,7 mM NaNO₂ zugegeben wurde. Es konnte keine Erhöhung der Ammoniak oxidierenden Aktivitäten oder Verkürzung der Reaktivierung festgestellt werden; innerhalb von 23 Stunden wurden 273 µM (mit Nitrit) und 372 µM (Kontrolle) Substrat pro 25 ml Testmedium oxidiert.

Diskussion

In den natürlichen Habitaten der Nitrifikanten fluktuieren deren Substratkonzentrationen zum Teil extrem, daher müssen die Bakterien imstande sein, lange Hungerphasen zu überleben. Die Ergebnisse der Aktivitätstest zeigen dementsprechend, dass die nitrifizierenden Bakterien aus dem marinen RAS noch nach einem Jahr ohne Substrat sofort Ammoniak bzw. Nitrit oxidieren können.

Durch die Trennung der beiden Nitrifikationsstufen konnte dabei beobachtet werden, dass nach Lagerung der FK in Wasser die Restaktivitäten der NOB fast immer höher waren als die der AOB, obschon die Ausgangsaktivitäten ungefähr gleich waren. Diese Beobachtung ist bisher nicht in der Literatur dokumentiert worden, eher findet sich in den Publikationen, dass die NOB sensibler auf Hungerphasen reagieren und länger für eine Reaktivierung brauchen (Tappe et al., 1999; Morgenroth et al., 2000). Es gibt allerdings bisher nur eine Studie, die das Hungerverhalten von Bakterien aus marinen Biofiltern untersucht hat, und hier konnte jedoch lediglich ausgesagt werden, dass die Abnahme der NOB Aktivitäten nach 16 Wochen nicht höher war als die der AOB (Bower und Turner, 1983), da nur mit Ammonium als Substrat gearbeitet wurde.

Die besten Resultate in Bezug auf Restaktivitäten erzielten die FK, die in Wasser bei 4°C gelagert wurden. Die niedrige Temperatur verlangsamt die Zerfallsrate der Zellen, zudem verhindert sie die Produktion von toxischen Stoffen wie z.B. Schwefelwasserstoff, zumal das Lagerungswasser nicht belüftet wurde. Zum selben Ergebnis, was die Temperatur betrifft, kamen auch Vlaeminck et al. (2007), die Anammox-Biomasse nach 5 Monaten Lagerung bei -20, 4 und 20 °C reaktivierten. Die Ergebnisse der Versuche zeigen, dass besiedelte Füllkörper aus marinen Rezirkulationsanlagen lange und auf einfache Weise gelagert werden und zumindest im Labor ohne weiteres reaktiviert werden können. Wie immer sollten auch hier Praxistests im großen Maßstab die Anwendbarkeit bestätigen.

Konstruktion eines Versuchsbioreaktors mit online-Messung

Für Vergleichsstudien von bereits auf dem Markt vorhandenen Füllkörpern mit während des Projektes neu entwickelten Füllkörpern wurde ein Bioreaktor im halb-technischen 200-L-Maßstab mit Online-Überwachung entwickelt und aufgebaut. Dieser besteht aus dem Kunststoffmaterial Polyethylen und besitzt ein Gesamtvolumen von 200 L.

Für die Online-Überwachung wurden folgende Parameter gewählt:

- gelöster Sauerstoff und Temperatur
- Ammonium und Nitrat
- Leitfähigkeit und Redox-Potential
- Raumtemperatur
- Die Echtzeit-Datenaufnahme erfolgt über einen Mehrkanal-Datenlogger der Firma Consort n.v.

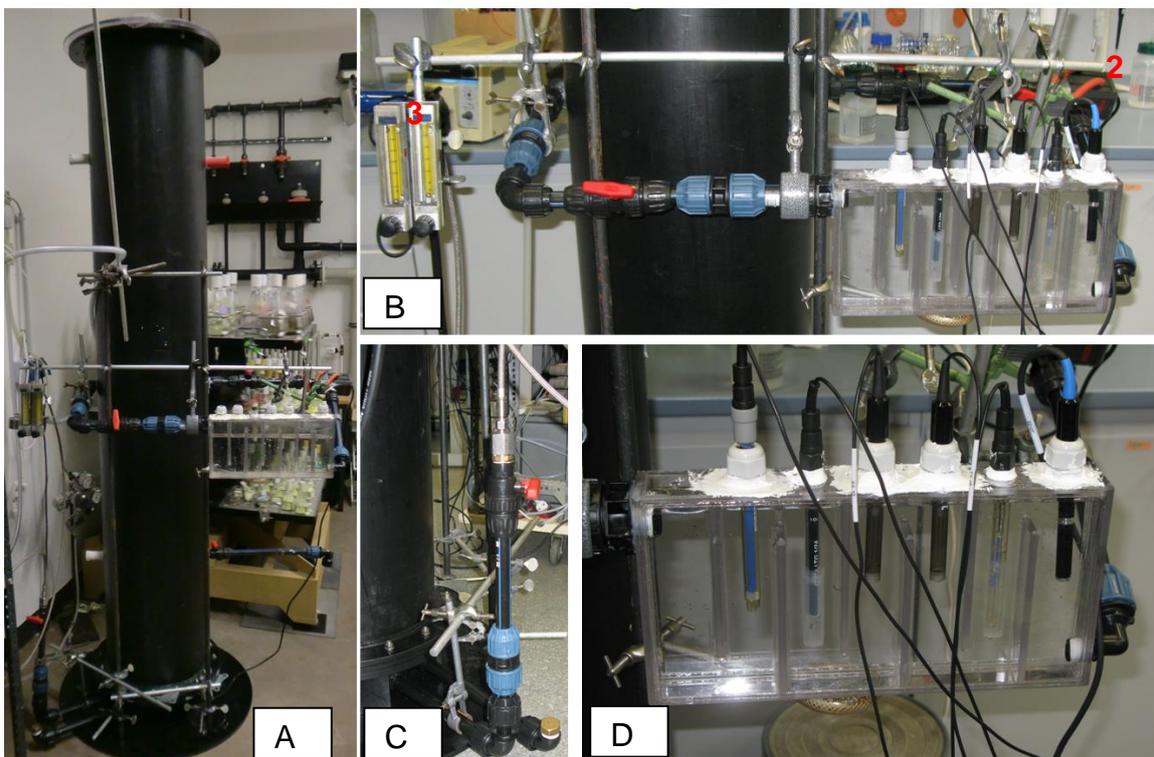


Abb. 23: Darstellung des Bioreaktors mit Online-Monitoring. (A) gesamter Bioreaktor, (B) links Durchflussregler der Druckluft und rechts Bypass mit Durchflusskammer und Elektroden für die Online-Überwachung, (C) Druckluftanschluß und (D) Detailaufnahme der Durchflusskammer mit Elektroden

Erster Start des Bioreaktors

Der Bioreaktor wurde so ausgelegt, dass der Anteil der FK 60 % des Gesamtvolumens des Bioreaktors ausmacht (persönliche Kommunikation mit J. Schröder). Zur Inokulation des Bioreaktors wurde ein Volumen von 19 Litern besiedelter Füllkörper (aus Modul 1, GMA) und 87 Liter neue gewässerte Füllkörper zugegeben.

Inokulum

Füllkörper aus der Kreislaufversuchsanlage Modul 1 der GMA, Büsum, wurden im Labor auf Lebendzellzahlen nachstehend aufgeführter Mikroorganismengruppen mit der MPN-Methode getestet. Der pH Wert war 7,8. Das Trockengewicht der abgelösten Zellen für die Verdünnungsreihen betrug 2,9 mg/g Füllkörper. Die Resultate der mikrobiologischen Untersuchungen sind nachstehend in der Tab. 6 zusammengefasst.

Auf den Füllkörpern waren Bakterien des Schwefel-, des Stickstoff-, des Eisen- und des Mangankreislaufes sowie heterotrophe Pilze und Bakterien mit wenigen Ausnahmen regelhaft und in z.T. sehr hohen Zellzahlen nachweisbar. Auffällig an diesen Ergebnissen ist, dass die höchsten Zellzahlen mit Medien für Nitrat-reduzierende und Manganionen-oxidierende Bakterien gefunden wurden.

Tab. 6: Lebendzellzahlen (N) des Inokulums für den Bioreaktor: chemoorganotrophe Bakterien (COT) und Pilze, organotrophe Bakterien (OT), neutrophile Schwefelverbindungen-oxidierende Bakterien (SOB), Sulfat-reduzierende Bakterien (SRB), Ammoniak-oxidierende Bakterien (AOB), Nitrit-oxidierende Bakterien (NOB), Nitrat-reduzierende Bakterien (NiRed), Manganionen-oxidierende Bakterien (MnOx), Manganionen-reduzierende Bakterien (MnRed), acidophile Eisenionen-oxidierende Bakterien (FeOx) und Eisenionen-reduzierende Bakterien (FeRed).

	COT	OT	Pilze	SOB	SRB	AOB
Zellzahl pro mL Inokulum	4 x 10⁶	3 x 10⁷	5 x 10³	9 x 10²	9 x 10¹	3 x 10⁵
Zellzahl pro g Füllkörper	1 x 10⁷	1 x 10⁸	1 x 10⁴	4 x 10³	3 x 10²	1 x 10⁶
	NOB	NiRed	MnOx	MnRed	FeOx	FeRed
Zellzahl pro mL Inokulum	2 x 10⁵	2 x 10⁶	2 x 10⁶	9 x 10²	nn	6 x 10²
Zellzahl pro g Füllkörper	8 x 10⁵	8 x 10⁶	8 x 10⁶	4 x 10³	nn	2 x 10³

Ergebnisse der Online-Überwachung

Die Messergebnisse zeigen, dass eine dauerhafte Online-Überwachung mittels potentiometrischer Messung (bedingt) möglich ist. Die Nitrat- und Ammoniummessungen mit ionenselektiven Elektroden und die des gelösten Sauerstoffes können nicht quantitativ verwertet werden. Es zeigte sich während des Versuches, dass diese Elektroden sehr stark mit der hohen Ionenstärke des Meerwassers reagierten. Die verwendete Elektroden für pH,

Redox-Potential und Leitfähigkeit waren während des ganzen Versuchszeitraums störungsfrei.

Fazit

Obwohl das Interesse an Aquakulturanlagen weltweit wächst und Kreislaufanlagen, im Gegensatz zu Netzkäfigen, ressourcen- und umweltschonend arbeiten, gibt es bislang nur wenige mikrobiologische Untersuchungen zur Biofiltration in marinen Aquakulturanlagen. Die vielseitigen Untersuchungen zur Nitrifikation im Rahmen des DBU Projektes haben zu Erkenntnissen geführt, die zur Optimierung solcher Anlagen beitragen und dadurch die Anwendung der Kreislauftechnik in der Aquakultur attraktiver macht (siehe Anhang: Zusammenfassung der Projektergebnisse).

Dabei sind Erkenntnisse aus den ersten beiden Phasen in die Überlegungen eingegangen, Versuche wurden vertieft, optimiert, und Laborexperimente auf Versuchsreaktoren übertragen. Durch die Anreicherung und Isolierung von Nitrifikanten aus den Anlagen konnten diese als Referenzorganismen in verschiedenen Versuchen verwendet und die Ergebnisse mit *in situ* bewachsenen Füllkörpern verglichen werden.

Die Ergebnisse z.B. der Langzeit-Untersuchung der Einlaufphasen und der Belüftungsversuche zeigen Möglichkeiten auf, wie Startphasen optimiert werden können, zeigen aber auch, dass viele Faktoren noch nicht bekannt oder zu wenig erforscht sind. Weitere Belüftungsversuche sind auch über das Projektende hinaus geplant, da genauere Kennzahlen hier von besonderer Bedeutung für Energieeinsparungen sind. Ergebnisse aus den Versuchen mit hohen Nitrat- und Ozonkonzentrationen können direkt von Betreibern von marinen Kreislaufanlagen verwendet werden.

Die Daten aus den Anheftungsversuchen mit den von der GEA produzierten Folien und die Diskussion zwischen den Projektpartnern geben Aufschlüsse über mögliche neue Formulierungen für die Herstellung von Füllkörpern für marine Aquakulturanlagen. Solch neu produzierten FK müssten dann noch in Praxistests überprüft werden.

Mikrobiologisch als auch verfahrenstechnisch sind die Projektpartner zu wissenschaftlichen Ergebnissen gekommen, die u.a. in internationalen Zeitschriften publiziert worden sind (siehe Anhang: Veröffentlichungen). Die meisten Aspekte und Parameter wurden am Untersuchungsobjekt „mariner Bewegtbett-Filter“ erstmals bearbeitet. Daher wurden natürlich auch neue Fragen aufgeworfen, aber insgesamt kann auf eine Vielzahl neuartiger Ergebnisse zu weiteren Forschungszwecken zurückgegriffen werden.

Literaturverzeichnis

- Alawi, M. (2007) *Diversität Nitrit oxidierender Bakterien in Böden des nordsibirischen Permafrostes und Sedimenten der Laptev-See*. Dissertation, Universität Hamburg.
- Allen, A.K., Neuberger, A., Sharon, N. (1973). *The purification, composition and specificity of wheat-germ agglutinin*. *Biochem J* 131:155-62.
- Ballinger S.J., Head I.M., Curtis T.P., Godley A.R. (2002). *The effect of C/N ratio on ammonia oxidising bacteria community structure in a laboratory nitrification-denitrification reactor*. *Water Sci Technol* 46: 543-550
- Banerjee, R., Das, K., Ravishankar, R., Suguna, K., Surolia, A., Vijayan, M. (1996). *Conformation, protein-carbohydrate interactions and a novel subunit association in the refined structure of peanut lectin-lactose complex*. *J Mol Biol* 259: 281–96.
- Bower, C.E., Turner, D.T. (1983) *Nitrification in closed seawater culture systems: Effects of nutrient deprivation*. *Aquaculture* 34: 85-92.
- Burrell, P.C., Phalen, C.M, Hovanec, T.A. (2001). *Identification of bacteria responsible for ammonia oxidation in freshwater aquaria*. *Appl Environ Microbiol* 67: 5791-5800.
- Burrell, P.C., Keller, J., Blackall, L.L. (1998) *Microbiology of a nitrite-oxidizing bioreactor*. *Appl Environ Microbiol* 64: 1878-1883.
- Diab S, Shilo M. (1988). *Effect of adhesion to particles on the survival and activity of Nitrosomonas sp and Nitrobacter sp*. *Arch Microbiol* 150: 387-393.
- Keuter, S. (2011) *Characterization of nitrifying bacteria in marine recirculation aquaculture systems with regard to process optimization*. Dissertation, Universität Hamburg
- Doyle, R.J. (1994). *Introduction to Lectins and Their Interactions with Microorganisms*. In: *Lectin- Microorganism Interactions*. Doyle, R.J., Slifkin, M. (Hrsg.): CRC Press, Boca Raton, FL. S.1-65.
- Elgavish, S., Shaanan, B. (1997). *Lectin-carbohydrate interactions: different folds, common recognition principles*. *Trends Biochem Sci* 22: 462-67.
- FAO. 2007. *The State of World Fisheries and Aquaculture (2006)*. Rome, Food and Agriculture Organisation of the United Nations.
- Fdz-Polanco, F., Méndez, E., Urueña, M.A., Villaverde, S., Garcia, P.A. (2000). *Spatial distribution of heterotrophs and nitrifiers in a submerged biofilter for nitrification*. *Wat Res* 34: 4081-4089.

- Fletcher, M. (1980). *The question of passive versus active attachment mechanisms in non-specific bacterial adhesion*. In: Microbial adhesion to surfaces. Hrsg.: R. C.W. Berkeley, J. M. Lynch, J. Melling, P. R. Rutter, B. Vincent. Chichester, UK, Society of Chemical Industry, Ellis Horwood Limited. S.197-210.
- Fletcher, M. (1979). *A microautoradiographic study of the activity of attached and free-living bacteria*. Arch Microbiol 122: 271-274.
- Foesel, B.U., Gieseke, A., Schwermer, C., Stief, P., Koch, L., Cytryn, E. et al. (2007) *Nitrosomonas Nm143-like ammonia oxidizers and Nitrospira marina-like nitrite oxidizers dominate the nitrifier community in a marine aquaculture biofilm*. FEMS Microbiol Ecol 63: 192-204.
- Furumai, H., Rittmann, B.E. (1992). *Advanced modelling of mixed populations of heterotrophs and nitrifiers considering the formation and exchange of soluble microbial products*. Water Sci Technol 26: 493-502.
- Goldstein, I., Hollerman, C., Smith, E. (1965). *Protein-carbohydrate interaction. II. Inhibition Studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides*. Biochemistry 4: 876.
- Gourianova, S., Willenbacher, N., Kutschera, M. (2005). *Chemical force microscopy study of adhesive properties of polypropylene films: influence of surface polarity and medium*. Langmuir 21:5429–5438.
- Graham, D.W., Knapp, C.W., Van Vleck, E.S., Bloor, K., Lane, T.B., Graham, C.E. (2007) *Experimental demonstration of chaotic instability in biological nitrification*. Isme J 1: 385-393.
- Grommen, R., Van Hauteghem, I., Van Wambeke, M., Verstraete, W. (2001) *Use of a nitrifying culture to shorten the activation time of biofilters for the removal of ammonium and nitrite in freshwater aquaria*. Meded Rijksuniv Gent Fak Landbouwkd Toegep Biol Wet 66: 79-86.
- Itoi, S., Niki, A., Sugita, H. (2006) *Changes in microbial communities associated with the conditioning of filter material in recirculating aquaculture systems of the pufferfish Takifugu rubripes*. Aquaculture 256: 287-295.
- Keuter, S., Kruse, M., Lispi, A., and Spieck, E. (2011) *Relevance of Nitrospira for nitrite oxidation in a marine recirculation aquaculture system and physiological features of a Nitrospira marina-like isolate*. Environ Microbiol 13: 2536–2547.
- Kim, Y.H., Cho, J.H., Lee, Y.W., Lee, W.K. (1997). *Development of a carrier for adhesion of nitrifying bacteria using a thermodynamic approach*. Biotechnol Technol:773–776.

- Kindaichi, T., Ito, T., Okabe, S. (2004) *Ecophysiological interaction between nitrifying bacteria and heterotrophic bacteria in autotrophic nitrifying biofilms as determined by microautoradiography-fluorescence in situ hybridization*. *Appl Environ Microbiol* 70: 1641-1650.
- Könneke, M., Bernhard, A.E., de la Torre, J.R., Walker, C.B., Waterbury, J.B., Stahl, D.A. (2005) *Isolation of an autotrophic ammonia-oxidizing marine archaeon*. *Nature* 437: 543-546.
- Kreft, J.U., Wimpenny, J.W.T. (2001). *Effect of EPS on biofilm structure and function as revealed by an individual-based model of biofilm growth*. *Wat Sci Technol* 43: 135-141.
- Kunc, F., Stotzky, G. (1980). *Acceleration by montmorillonite of nitrification in soil*. *Folia Microbiol* 25: 106-125.
- Laanbroek, H.J., Bar-Gilissen, M.-J., Hoogveld, H.L. (2002) *Nitrite as a stimulus for ammonia-starved Nitrosomonas europaea*. *Appl Environ Microbiol* 68: 1454-1457.
- Li, B., Irvin, S., Baker, K. (2007) *The variation of nitrifying bacterial population sizes in a sequencing batch reactor (SBR) treating low, mid, high concentrated synthetic wastewater*. *J Environ Eng Sci* 6: 651-663.
- Liener, I. E., Sharon, N., Goldstein, I. J. (Hrsg.) (1986). *The lectins: properties, functions and applications in biology and medicine*. Orlando, FL: Academic Press.
- Ling, J., Chen, S. (2005). *Impact of organic carbon on nitrification performance of different biofilters*. *Aquacult Eng* 33: 150-162.
- Lydmark, P., Almstrand, R., Samuelsson, K., Mattsson, A., Sörensson, F., Lindgren, P.-E., Hermansson, M. (2007) *Effects of environmental conditions on the nitrifying population dynamics in a pilot wastewater treatment plant*. *Environ Microbiol* 9: 2220-2233.
- Macura, J.J., Stotzky, G. (1980) *Effect of montmorillonite and kaolinite on nitrification in soil*. *Folia Microbiol* 25: 90-105.
- Mazumdera, S., Falkinham, J.O., Dietrich, A.M., Puria, I.K. (2010). *Role of hydrophobicity in bacterial adherence to carbon nanostructures and biofilm formation*. *Biofouling* 26: 333-339.
- Michaud, L., Blancheton, J.P., Bruni, V., Piedrahita, R. (2006) *Effect of particulate organic carbon on heterotrophic bacterial populations and nitrification efficiency in biological filters*. *Aquacult Engin* 34: 224-233.

- Morgenroth, E., Obermayer, A., Arnold, E., Brühl, A., Wagner, M., Wilderer, P.A. (2000) *Effect of long-term idle periods on the performance of sequencing batch reactors.* Water Sci Technol 41: 105-113.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G. (1993) *Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA.* Appl Environ Microbiol 59: 695-700
- Okabe S, Oozawa Y, Hirata K, Watanabe Y. (1996). *Relationship between population dynamics of nitrifiers in biofilms reactor performance at various C:N ratios.* Water Res 30: 1563-1572.
- Prosser, J.I. (1989) *Autotrophic nitrification in bacteria.* Adv Microb Physiol 30: 125-181.
- Sakano, Y., Kerkhof, L. (1998) *Assessment of changes in microbial community structure during operation of an ammonia biofilter with molecular tools.* Appl Environ Microbiol 64: 4877-4882.
- Sauder, L.A., Engel, K., Stearns, J.C., Masella, A.P., Pawliszyn, R., Neufeld, J.D. (2011). *Aquarium nitrification revisited: Thaumarchaeota are the dominant ammonia oxidizers in freshwater aquarium biofilters.* PLoS ONE 6: e23281.
- Schonhorn, H. (1966). *Dependence of contact angles on temperature: polar liquids on polypropylene.* J Phys Chem 70: 4086.
- Schramm, A., de Beer, D., van den Heuvel, J.C., Ottengraf, S., Amann, R. (1999). *Microscale distribution of populations and activities of Nitrosospira and Nitrospira spp. along a macroscale gradient in a nitrifying bioreactor: quantification by in situ hybridization and the use of microsensors.* Appl Environ Microbiol 65: 3690-3696.
- Schramm, A., De Beer, D., Wagner, M., Amann, R. (1998) *Identification and activities in situ of Nitrosospira and Nitrospira spp. as dominant populations in a nitrifying fluidized bed reactor.* Appl Environ Microbiol 64: 3480-3485.
- Schulz C, Herbst R, Langensiepen M, Ulrichs C. (2005). *Herausforderungen einer umweltgerechten Aquakultur.* Humboldt Spektrum 1-2005 : 42 - 48.
- Smith, E., Goldstein, I. (1967). *Protein-carbohydrate interactions. V. Further inhibition studies directed toward defining the stereochemical requirements of the reactive sites of concanavalin A.* Arch Biochem Biophys 121: 88-95.
- Sudarno, U., Bathe, S., Winter, J., Gallert, C. (2009) *Nitrification in fixed-bed reactors treating saline wastewater.* Appl Microbiol Biotechnol 85: 2301-2304.

- Tal, Y., Watts, J.E.M., Schreier, S.B., Sowers, K.R., Schreier, H.J. (2003) *Characterization of the microbial community and nitrogen transformation processes associated with moving bed bioreactors in a closed recirculated mariculture system*. *Aquaculture* 215: 187-202.
- Tappe, W., Laverman, A., Bohland, M., Braster, M., Rittershaus, S., Groeneweg, J., van Verseveld, H.W. (1999) *Maintenance energy demand and starvation recovery dynamics of Nitrosomonas europaea and Nitrobacter winogradskyi cultivated in a retentostat with complete biomass retention*. *Appl Environ Microbiol* 65: 2471-2477.
- Terada, A., Lackner, S., Kristensen, K., Smets, B.F. (2010) *Inoculum effects on community composition and nitrification performance of autotrophic nitrifying biofilm reactors with counter-diffusion geometry*. *Environ Microbiol* 12: 2858-2872.
- Tsuneda S., Park S., Hayashi H., Jung J., Hirata A. (2001) *Enhancement of nitrifying biofilm formation using selected EPS produced by heterotrophic bacteria*. *Water Sci Technol* 43: 197-204.
- Verhagen FJ, Laanbroek HJ. 1991. *Competition for ammonium between nitrifying and heterotrophic bacteria in dual energy-limited chemostats*. *Appl Environ Microbiol* 57: 3255-3263.
- Vezenov, D.V., Noy, A., Rozsnyai, L.F., Lieber, C.M.J. (1997). *Force titrations and ionization state sensitive imaging of functional groups in aqueous solutions by chemical force microscopy*. *J Am Chem Soc* 119: 2006-2015.
- Villaverde, S., Fdz-Polanco, F., and Garcia, P.A. (2000) *Nitrifying biofilm acclimation to free ammonia in submerged biofilters. Start-up influence*. *Water Res* 34: 602-610.
- Vlaeminck, S.E., Geets, J., Vervaeren, H., Boon, N., Verstraete, W. (2007) *Reactivation of aerobic and anaerobic ammonium oxidizers in OLAND biomass after long-term storage*. *Appl Microbiol Biotechnol* 74: 1376–1384.
- Wanner O, Gujer E. 1985. *Competition in biofilms*. *Water Sci Technol* 17: 27-44.
- Weiss, W.I., Drickamer, K. (1996). *Structural basis of lectin-carbohydrate recognition*. *Ann Rev Biochem* 65: 441-473.
- Wittebolle, L., Verstraete, W., Boon, N. (2009) *The inoculum effect on the ammonia-oxidizing bacterial communities in parallel sequential batch reactors*. *Wat Res* 43: 4149-4158.

Xiao, Y., Zeng, G.M., Yang, Z.H., Liu, Y.S., Ma, Y.H., Yang, L. *et al.*, 2009. *Coexistence of nitrifiers, denitrifiers and Anammox bacteria in a sequencing batch biofilm reactor as revealed by PCR-DGGE.* J Appl Microbiol 106: 496–505.