

P XXII/3/1 Anaerobe Ammoniumoxidation

Unter oxischen Bedingungen wird Ammonium durch aerobe Nitrifikanten – das sind Mikroorganismen, zu denen die "Nitrosobakterien" und die "Nitrobakterien" gehören - oxidiert. In anoxischen, denitrifizierenden Bio-Reaktoren kann aber auch anaerobe Umwandlung von Ammonium beobachtet werden. Quantitative Studien ergaben, dass für die Oxidation von 5 Mol Ammonium (NH_4^+) 3 Mol Nitrat (NO_3^-) als Elektronenakzeptor verbraucht wurden und dabei 4 Mol N_2 entstanden. Die Beweisführung für die Hypothese, dass es sich bei der anaeroben Ammoniumoxidation um einen mikrobiologischen Prozess handelt, geschah mittels der im folgenden dargestellten Experimente. Diese wurden mit Schlamm aus den Bioreaktoren (= bakterielle Mischkulturen, die in Aggregaten zusammengeklumpt vorkommen) durchgeführt. Reinkulturen von nitrifizierenden Anaerobiern existierten damals noch nicht. Seither konnten anaerob NH_4^+ oxidierende *Planktomyces*-ähnliche Bakterien isoliert werden. Sie besitzen grosse interne Membranoberflächen und vermehren sich durch Knospung vegetativ. Es wird vermutet, dass ihre autotrophe Lebensweise mit CO_2 auf dem Ribulosebiphosphatzyklus (Calvin-Zyklus) beruht.

Das Verfahren zur anaeroben Nitrifikation wurde als Anammox-Prozess patentiert (Anammox = **A**naerobic **a**mmonium **o**xidation).

(Die Angaben stammen aus van de Graaf, A.A. et al. AEM, 61/4 (1995) 1246-1251, wo weitere interessante Details zur Mikrobiologie des Anammox-Prozesses nachgelesen werden können)

Erklärungen

Oxidationszustände

N-Verbindung	Oxidationszustand des N
Ammonium (NH_4^+)	III-
Nitrat (NO_3^-)	V+
Nitrit (NO_2^-)	III+
Lachgas (N_2O)	I+
Distickstoffgas (N_2)	0

Isotope

Die Atommasse des häufigsten N-Isotops ist 14 D (Dalton); es existieren aber auch N-Isotope mit der Masse 15 D. Diese werden experimentell zur Markierung des N eingesetzt. Aus Experimenten, bei denen N_2 entsteht, können Distickstoffgasmoleküle mit Molekülmassen 28, 29 und 30 hervorgehen, je nach Gehalt an N-Atomen mit verschiedenen Massen im Edukt.

Die Atommasse des häufigsten Sauerstoffisotops ist 16D.

Hemmstoffe

Penicillin, Chloramphenicol und Ampicillin sind Antibiotika, die das Wachstum von Prokaryoten hemmen. 2,4-Dinitrophenol (2,4-DNP) und CCCP (Carbonyl cyanid m-chlorophenylhydrazon) wirken entkoppelnd bei der Umwandlung der elektrochemischen Energie in ATP. Quecksilber(II)chlorid (HgCl_2) hemmt Enzyme, indem es Disulfidbrücken in Proteinen spaltet und blockiert.

Biomasse

"Volatile solids" wird hier als Mass für die Menge Biomasse gebraucht. Die biologische Aktivität wird in natürlichen Proben gemessen, die direkt aus dem anaeroben Bioreaktor stammen. Diese enthalten neben aktiver Biomasse noch zahlreiche andere, auch anorganische Stoffe. Als Bezugsgrösse für die Aktivität wird die organische Masse definiert. Zur Bestimmung wird die Probe aus dem Bioreaktor getrocknet und dann bei 650°C verbrannt. Die Gewichts Differenz zwischen dem eingewogenen Trockengewicht und dem Ascherückstand entspricht den verbrennbaren Feststoffen (volatile solids), die bei den Experimenten der Menge Biomasse gleichgesetzt wurden.

Aufgaben

Überlegen Sie sich Lösungen zu den folgenden Fragen:

1a Stöchiometrie

Formulieren Sie die stöchiometrische Gleichung für die denitrifizierende Oxidation von Ammonium.

1b Batch-Kultur Experiment

Figur 1 zeigt ein typisches Batch-Experiment unter anoxischen Bedingungen. Biomasse wird als VS (= volatile solids) angegeben.

- Inwiefern unterstützt das Experiment die Hypothese über die denitrifizierende Ammoniumoxidation ?
- Was kann man aus dem Verlauf der Nitrit-Konzentration schliessen ?
- Wie lässt sich der Verlauf der Sulfat-Konzentration interpretieren ?
- Warum ist es wichtig, den pH während des Experiments zu verfolgen ?

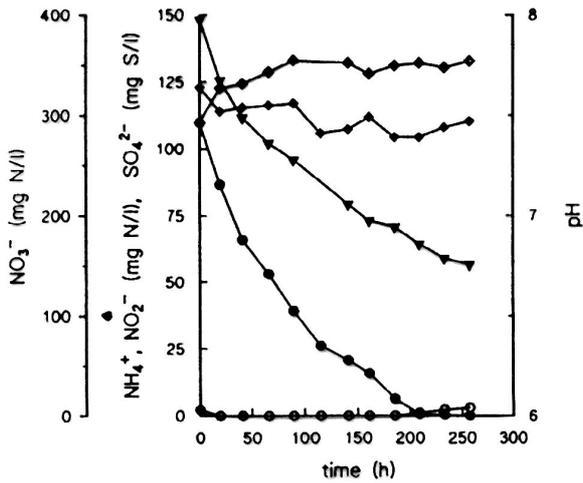


FIG. 1. Concentration curves and pH course of a typical anaerobic ammonium oxidation batch culture experiment using 500-ml serum bottles at 37°C with nitrate as the electron acceptor and a 30-ml inoculum. The specific anaerobic ammonium oxidation activity of the biomass used was 66 ng of NH₄⁺-N · h⁻¹ · mg of VS⁻¹. Symbols: ●, NH₄⁺; ▽, NO₃⁻; ○, NO₂⁻; ◇, SO₄²⁻; ◆, pH.

1c Biologische Aktivität

In Tabelle 1 ist die Hemmwirkung verschiedener Antibiotika und anderer Inhibitoren sowie die Aktivität nach Sterilisierung des Schlammes zusammengefasst.

TABLE 1. Rate of ammonium removal by oxidation with nitrate at 37°C in the presence of antibiotics or inhibitors and during inactivation experiments^a

Sample incubated	Inhibitor concn (mg/liter)	Ammonium removal (% of control)
Inoculated control	NA ^b	100
Noninoculated control	NA	0
Noninoculated sterile effluent	NA	0
Wastewater inoculated with sterilized sludge in sterile effluent	NA	0
Wastewater inoculated with gamma-irradiated sludge	NA	0
Culture inoculated with:		
Penicillin	0	100 ± 13
	1	83 ± 13
	100	64 ± 10
Chloramphenicol	0	100 ± 5
	20	64 ± 5
	200	2 ^c ± 2
Ampicillin	0	100 ± 3
	400	29 ± 3
	800	6 ± 4
Hg ^{II} Cl ₂	0	100 ± 4
	271	0
2,4-Dinitrophenol	0	100 ± 5
	37	47 ± 7
	368	1 ± 2
CCCP	0	100 ± 3
	41	0

^a The specific anaerobic ammonium oxidation activity of the sludge used was 104 ng of NH₄⁺-N · h⁻¹ · mg of VS⁻¹ (100%). Data are the means (± standard deviations) for duplicate experiments.

^b NA, not applicable.

^c For the first 3 days of incubation. After this period the ammonium removal was 32 ± 10% of the control level.

- Welche Aspekte der Hypothese werden damit bestätigt ?
- Warum wurden die ersten vier Experimente ausgeführt ?
- Wie erklärt man die in der Fussnote c erwähnte Beobachtung, dass die Ammonium-Oxidation nach 3 Tagen wieder angestiegen sei ?

1d Mikrobenaggregate

Unabhängig davon, wieviel Schlamm verwendet wurde und ob die Kultur dauernd geschüttelt wurde (= "shaken incubation") oder nicht (= "static incubation"), die spezifische Aktivität war immer etwa gleich. Was kann aus den Daten abgeleitet werden, die in Figur 2 dargestellt sind ?

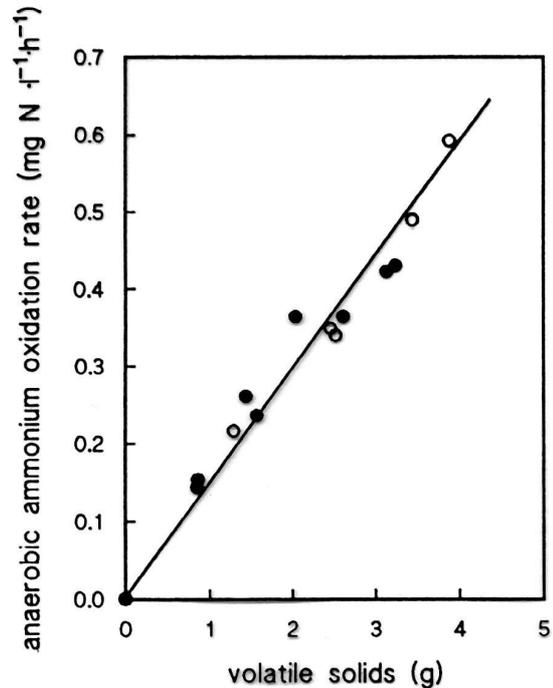


FIG. 2. Correlation between anaerobic ammonium oxidation rate and amount of biomass used in batch cultures. The specific anaerobic ammonium oxidation activity of the biomass used was 67 ng of NH₄⁺-N · h⁻¹ · mg of VS⁻¹. ●, static incubation; ○, shaken incubation.

1e Isotopenfraktionierung

Wenn unmarkiertes (enthält ¹⁴N) und ¹⁵N-markiertes Ammonium gefüttert wurden (0.75 Stunden nach Beginn des Experimentes, das in Figur 3 dargestellt ist), so konnten 3 Typen von N₂-Molekülen mit den Massen 28, 29 (am häufigsten) und 30 festgestellt werden. Welcher Aspekt der Hypothese über die denitrifizierende Ammoniumoxidation kann damit bestätigt werden ?

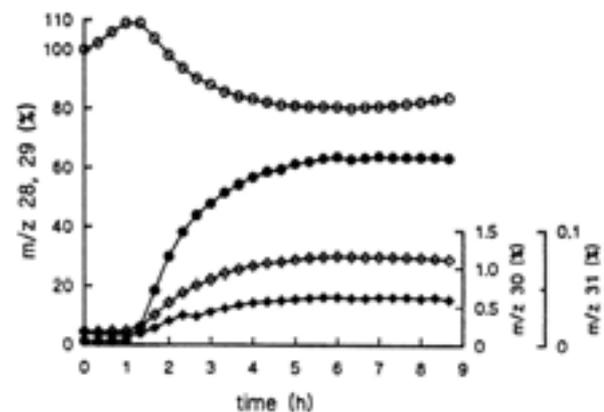


FIG. 3. Changes in m/z 28, 29, 30, and 31 as a percentage of the initial partial pressure of m/z 28 and as a function of time during a batch experiment with the denitrifying fluidized bed reactor after the addition of labelled NH₄⁺ and during control experiments. The ¹⁵NH₄⁺ pulse was supplied after the start of the experiment at 0.75 h. Symbols: ●, m/z 29; ○, m/z 28; □, m/z 30; ◆, m/z 31.

1f Lachgasbildung

Mittels Isotopenfraktionierung sollte ebenfalls überprüft werden, ob Lachgas (N_2O) bzw. Monostickstoffoxid (NO) als Zwischenprodukte auftreten. Was sagen die Daten dazu aus, die in der Figur 3 dargestellt sind ?

1g Denitrifizierende Nitrifikation

Schlagen Sie ein Experiment vor, aus welchem abgeleitet werden kann, dass Ammoniumoxidation und Denitrifikation stöchiometrisch im Verhältnis 5 Mol NH_4^+ : 3 Mol NO_3^- : 4 Mol N_2 gekoppelt sind !

1h Alternative Nitrifikationswege

Alternative Elektronenakzeptoren wären Nitrit (NO_2^-) bzw. Lachgas (N_2O). Stellen Sie die stöchiometrischen Gleichungen für die anaerobe Ammoniumoxidation mit diesen beiden Oxidationsmitteln dar.

1i Energetik

Untersuchen Sie die thermodynamische Energetik der anaeroben Ammoniumoxidation mit NO_3^- , NO_2^- und N_2O als Oxidationsmittel. Welches wäre der für eine spezifische Anreicherung erfolgreichste Elektronenakzeptor ? (Verwenden Sie Thermodyn[®] für die Berechnungen.)

1j Anammox-Patent

Worin liegt die Bedeutung der anaeroben Nitrifikation, die eine Patentierung des Verfahrens rechtfertigt ?