

**ISOLATION, CHARAKTERISIERUNG UND EINSATZMÖGLICHKEITEN
VON HITZEDADAPIERTEN PROTOZOEN IN DER THERMALEN
ABWASSERAUFBEREITUNG VON PROZESSWASSER-
KREISLAUFSYSTEMEN.**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

Grischa Peter Feuersänger

aus Neunkirchen

2008

Berichterstatter: Prof. Dr. Hartmut Arndt

Prof. Dr. Michael Bonkowski

Tag der mündlichen Prüfung:

04.02.2009

DANKSAGUNG

- Mein Dank gilt meinem Betreuer Prof. Dr. Hartmut Arndt für die Möglichkeit der Dissertation, für die Betreuung meiner Arbeit, die konstruktiven Diskussionen, sowie für die zahlreichen Anregungen.
- Dr. Frank Nitsche danke ich für die freundliche Hilfestellung in molekularbiologischen und taxonomischen Fragen.
- Dr. Anja Scherwaß und Helge Norf standen mir bei der morphologischen Bestimmung mit Rat und Tat zur Seite.
- Ebenso gilt mein Dank Herrn Dr. Philipp Althöfer, der die notwendige Kooperation mit zahlreichen Unternehmen der Papierindustrie ermöglichte und ein Pilotprojekt zu den nachfolgenden Studien ins Leben gerufen hat.
- Der "Deutschen Bundesstiftung Umwelt" (DBU) möchte ich mich für die im Rahmen dieser Arbeit benötigte Finanzierung und für die freundliche Unterstützung durch meinen Stiftungsbetreuers Herrn Dr. M. Hempel bedanken. Mein Dank gilt ebenso für die darin enthaltene ideelle Förderung, sowie die Weiterbildung in interdisziplinären Fragestellungen zum Umweltschutz, die mir in zahlreichen Seminaren ermöglicht wurde.
- Mein herzlicher Dank geht ebenfalls an die zahlreichen Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen der Arbeitsgruppe AG Arndt, die sich stets bereit erklärt haben, mich bei technischen Fragen und spontanen Schwierigkeiten zu unterstützen. Sowohl die technischen Assistenten, die Mitarbeiter der Elektronik/Feinmechanik, sowie die Diplomanden hatten stets ein offenes Ohr und gewährten jederzeit freundlich Hilfestellung.
- Mein ganz besonderer Dank gilt meiner Familie, allem voran meinen Eltern Antoinette und Gert-Peter Feuersänger für den fortwährenden guten Zuspruch, sowie jeder nur erdenklichen Unterstützung in privater Hinsicht. Ebenso danke ich meinem Bruder Dr. Alexander Feuersänger, dessen Unterstützung ich mir selbst über große Entfernungen hinweg immer sicher sein konnte.
- Zum Abschluss danke ich in Gedenken meiner im letzten Jahr verstorbenen Großmutter Eva Preud'homme-Krab und ihre aufopferungsvolle Hilfe und möchte ihr gleichzeitig diese Arbeit widmen.

INHALTSVERZEICHNIS

Vorwort	7
Einleitung	9
<u>Abschnitt I: Thermotolerant protists in wastewater</u>	
I. High thermal tolerance of protists appearing in heated wastewater	18
II. Autecological comparison of jakobid morphospecies (heterotrophic flagellates) - isolates from natural and thermal wastewater habitats and their phylogenetic relationship	43
<u>Abschnitt II: Nutzungsmöglichkeiten für thermotolerante Protozoen in der Papierindustrie</u>	
Erläuterungen zu Verfahrenskomponenten und Routineanalytik in der Abwasseraufbereitung	69
III. Wasserkreislauf in der Papierindustrie - Thermophile anaerobe Prozesswasserreinigung	79
IV. Wiederverwendung von „Biowasser“ – Polyacrylamide unterstützen die Aerobe Zyklische Enthärtung (AZE)	87
V. Wiederverwendung von „Biowasser“ – In wie weit unterstützen thermophile Protozoen die chemikalienarme Prozesswasserreinigung	93
VI. Reinigungsleistungen und Einsatzmöglichkeiten thermophiler Protozoenarten in der thermalen biologischen Wasseraufbereitung	100
Kurzzusammenfassung	111
Abstract	115
Erklärung	
Lebenslauf	

VORWORT

Die vorliegende Arbeit „Einsatzmöglichkeiten von thermophilen Protozoen für umweltschonende Abwasseraufbereitung in Prozesswasser-Kreislaufsystemen“ gliedert sich in einen grundlagentechnischen und einen anwendungsbezogenen Abschnitt. Die Zweisprachigkeit der Abschnitte ergibt sich aus den englischsprachigen Manuskripten für internationale Journale und den deutschsprachigen Manuskripten für Fachjournale aus dem nationalen Raum. Die molekularbiologischen Untersuchungen zur phylogenetischen Bestimmung und Einordnung spezifischer Flagellaten- und Ciliatenarten basieren auf den Ergebnissen der von Herrn Dr. Frank Nitsche durchgeführten Einzelzell-PCR und dienen als Ergänzung zu den autökologischen Untersuchungen.

EINLEITUNG

Aktuell führen Untersuchungen zu mikrobiellen Lebensgemeinschaften in aquatischen Ökosystemen immer wieder zu neuen Erkenntnissen über spezifische Interaktionen und Änderungen in der Biodiversität (Morin et al. 2004). Eine Hypothese von Fenchel und Finlay (2004) besagt, dass Organismen, die in die Größenklasse von unter einem Millimeter fallen, einen Trend zur ubiquitären Verbreitung zeigen. Im Verlauf einer intensiven Diskussion wurde diese Hypothese umformuliert, dass das Vorhandensein ähnlicher ökologischer Bedingungen die Wahrscheinlichkeit des Auftretens gleicher Arten in diesen Habitaten erhöhen sollte. Die Abundanz ist dabei so hoch, dass die Verbreitung nur geringfügig durch geographische Hindernisse gestört wird (Finlay 2002). Wichtige Charakteristika für eine ubiquitäre Verbreitung sind neben der geringen Körpergröße eine hohe genetische Variabilität, sowie kurze Generationszeiten (Finlay 2002). Vergleichende Untersuchungen von klonalen Kulturen des oligotrichen Ciliaten *Meseres corlissi* aus geographisch weit entfernten und unterschiedlich temperierten Habitaten zeigten signifikant unterschiedliche, lokale Adaptationen an die jeweiligen Umweltbedingungen (Weisse et al. 2007). Das führte zu der Schlussfolgerung, dass es genetische und phänotypische Ökotypen kosmopolitischer Ciliatenarten gibt. Durch sogenannte „Extremhabitate“, wie zum Beispiel saure, hydrothermale Quellen vulkanischen Ursprungs mit einem Temperaturspektrum von 15 bis 85°C, steigt die genetische Divergenz und der damit verbundene Artenreichtum von Protisten signifikant an (Brown & Wolfe 2006).

Bisher wurde davon ausgegangen, dass Protisten jenseits einer Temperaturschwelle von ca. 30°C aufgrund der Denaturierung von Proteinen nicht mehr lebensfähig seien. Eine Anpassung an Temperaturen jenseits der 30°C war bisher nur unter den pathogenen Organismen bekannt. Darunter befanden sich zum Beispiel pathogene Amöben, die aus dem Warmwasser von Spas (Penas-Ares et al. 1993) oder aus Sanitäreinrichtungen von Krankenhäusern (Rohr et al. 1998) bei Temperaturen von bis zu 53°C isoliert wurden. Eine

der spektakulärsten Entdeckungen lieferte 1970 eine Studie von hydrothermalen Quellen in den Gewässern um die Galapagos Inseln, die auch als „Schwarze Raucher (Black Smokers)“ bekannt sind. Vorgefundene thermophile und hyperthermophile Archae- und Eubakterien boten sich in der aufgrund ihrer hydrolytischen, thermostabilen Enzyme für eine biotechnologische Anwendung in verschiedensten Warmwasser-Bereichen, wie zum Beispiel in der Papierindustrie, an (Canganella 2001). Die Synthese von sogenannten „Extremozymen“, ermöglichten eine Resistenz gegenüber verschiedensten extremen Umweltbedingungen, wie sehr hohen oder niedrigen Temperaturen, extremen pH-Werten, hohem Druck oder hohem Salzgehalt zu widerstehen. Eine neue Entdeckung war auch die Isolation und Beschreibung von thermophilen Protozoen (Genus: *Thermoascus*, *Cyclidium*, *Trimyema*), die in der Lage sind, bei 50-60°C zu wachsen (Baumgartner et al. 2000). Neben den natürlichen hydrothermalen Habitaten existieren auch künstliche hydrothermale Habitate, wie z.B. Belebtschlammbecken. Unsere eigenen Voruntersuchungen zeigten, dass eine Reihe von Protistentaxa in der Lage sind, trotz hohen Temperaturen von bis zu mehr als 40°C in beheizten Belebtschlammbecken zu existieren. Dies legte die Frage nahe, ob die Vielfalt der adaptierten Arten nicht sehr viel größer ist als ursprünglich angenommen wurde. Ebenfalls zeigte sich, dass vereinzelt identische Morphospecies sowohl im thermalen Belebtschlamm als auch im Rhein auftreten. Dies warf wiederum die Frage auf, ob es intraspezifische Unterschiede in der thermalen Toleranz innerhalb gibt, oder ob es sich vielleicht um morphologisch identische, aber verschiedene Arten handelt und wie sich diese Hitzetoleranz ausbildet.

Mikrobielle Lebensgemeinschaften sind essentiell für den Stofffluss in aquatischen Ökosystemen (Azam et al. 1983). Dabei spielen heterotrophe Nanoflagellaten als Bakterienkonsumenten eine entscheidende Rolle im mikrobiellen Nahrungsgewebe, da durch sie der organisch gelöste Kohlenstoff den höheren Trophiestufen zugänglich gemacht wird (Fenchel 1987, Finlay & Esteban 1998). In der herkömmlichen biologischen Abwasseraufbereitung werden seit langem gezielt Protisten eingesetzt und damit die

beschrieben Effekte nutzbar gemacht (Arregui et al. 2007). Ebenfalls verwendet man sie in Belebungsanlagen als Indikatororganismen für verschiedene Grade der Belastung. Untersuchungen zu den Reaktionen von Bakteriengemeinschaften und Mikrofauna auf toxische Substanzen (z. B. Schwermetalle, Cycloheximide) ergaben eine spezifische Artzusammensetzung. Diese führte zu der Erstellung des so genannten „Sludge Biotic Index“ (Nicolau et al. 2007). Die Frage die sich hieraus ergibt ist, ob sich ausgewählte thermotolerante Protisten in gleicher Weise auch in beheizten Reinigungsanlagen einsetzen lassen.

Grazing (Fraßdruck) der Protozoen, z. B. durch heterotrophe Flagellaten hervorgerufen, beeinflusst die Zusammensetzung von Bakteriengemeinschaften (Boenigk et al 2002). Der Wegfraß und die Ausscheidung von chemischen Botenstoffen führen zur Ausbildung und Förderung von großen Wachstumsformen (Kolonien) der Bakterien (Filamente und Flocken) und halten die metabolische Aktivität der Bakteriengemeinschaften auf einem Maximum (Jürgens & Matz 2002, Jiang & Krumins 2006). Die Induzierung von bakterieller Aggregation wurde bereits am Modellorganismus *Tetrahymena thermophila* hinsichtlich verschiedener Reizgeber untersucht, wobei festgestellt wurde, dass anstelle des bisher vermuteten intrazellulär produzierten Poly- β -hydroxybutylsäure, die Synthese von EPS (Extrazelluläre Polysaccharide), das von Belebtschlammorganismen produziert wird, primär für die bakterielle Flockenbildung verantwortlich ist (Arregui et al. 2007). Die spezifischen Reaktionen der Bakteriengemeinschaften auf die Anwesenheit von Protozoen soll in der thermalen Wasseraufbereitung nutzbar gemacht werden.

Der hohe Bedarf an Grundwasser für die Papierindustrie und die Einleitung des Produktionsabwassers direkt in die Gewässer, oder indirekt in die Klärbetriebe, stellen eine vielfache Umweltbelastung dar. Es wird Energie in Form von Wärme aus der Papierfabrik ausgetragen und dabei das angeschlossene Klärwerk durch das zugeführte Abwasser chemisch und organisch belastet. Die Belastung entsteht durch Ablagerungen, Schwebstoffe, Temperaturerhöhungen und Geruch. Bisher wurden Inhaltsstoffe in der Regel auf

chemischem Weg zur Sedimentation und der damit verbundenen Abtrennung gebracht. In der deutschen Papierindustrie wird bereits heute ein sehr hoher Prozentsatz (bis zu 100%) an Altpapier als Rohstoff für die Papierneuerstellung verwendet (Bischoff & Hamm 1999). Nach EU-Richtlinien (IVU-Komm.) muss das Abwasser (der Hauptemissionspfad in der Papierindustrie) in Zukunft unter Einsatz der verfügbaren Technik in vollständig geschlossenen Wasserkreisläufen aufbereitet werden. Das Ziel ist hierbei eine starke Verminderung der direkten und indirekten Einleitung. Nach dem heutigen Stand der Technik sind bei der Abwasserbehandlung eine anaerobe und eine aerobe Stufe in Reihe geschaltet. In Pilotstudien des letzten Jahres zeigte sich, dass mit einer Temperaturerhöhung von bisher 40°C auf $\geq 50^\circ\text{C}$ der Reinigungsprozess aufgrund der erhöhten metabolischen Aktivität einiger Bakterienstämme in der anaeroben Stufe (*Methanosarcina* und Sulfurierende Bakterien SFBs; (Althoefer, 2000) beschleunigt werden kann. Das als Nebenprodukt anfallende Methan wird dabei als alternative Energiequelle nutzbar. Die Temperaturerhöhung bewirkte jedoch auch eine zusätzliche Erwärmung des Prozesswassers ($\leq 40^\circ\text{C}$) die an nachfolgende Reinigungsstufen wie das Belebtschlammverfahren weitergegeben wurde. Eine potentielle Anwendungsmöglichkeit von Protozoen als alternatives Flockungsmittel setzt also eine Anpassung an bis zu 40°C voraus.

Um eventuelle Kandidaten für die erweiterte biologische Reinigung zu bestimmen, mussten die in der thermalen Behandlung vorgefundenen Arten taxonomisch erfasst und autökologisch hinsichtlich ihrer Temperaturtoleranz untersucht werden. Um Protozoen aus natürlichen ($\leq 30^\circ\text{C}$) und künstlichen hydrothermalen Habitaten ($\geq 40^\circ\text{C}$) vergleichen zu können, wurden Isolate aus dem Schöhsee (Plön), aus dem Grundwasser (Tokai/Südafrika) und aus einem städtischen Klärwerk (Köln-Stammheim, Belebung Haushaltsabwässer) für die Untersuchungen verwendet. Das Isolat aus dem städtischen Klärwerk diente als Kontrolle und Vergleichsmöglichkeit gegenüber den Isolaten aus den Belebtschlammanlagen der Papierfabriken, die bei ca. 40°C betrieben wurden. Arten, die aus dem Freiland bereits bekannt waren (Foissner et al. 1994), wurden auch im Belebtschlamm als identische

Morphospezies identifiziert. Mittels in Kooperation etablierter Sonden wurde am Beispiel einer Morhospezies der Jakobiden der Vergleich der 18s rDNA vorgenommen und 2 neue Arten beschrieben (*Pseudohistiona africanensis*, *Histiona aroides thermophilus*). Um die praktische Anwendbarkeit zu demonstrieren, wurde die Reaktion der Bakteriengemeinschaften am Beispiel von *Histiona aroides thermophilus* bei Temperaturen von bis zu 40°C im Hinblick auf die Aggregatbildung untersucht. Kulturen der Arten *Oxytricha longa* und *Cydlidium glaucoma* wurden in eine Versuchsanlage überführt und der messbare Einfluss auf die Entwicklung des CSB (Chemischer Sauerstoffbedarf)-Wertes gemessen. Die Entwicklung des CSBs stellte dabei den Wirkungsgrad auf das bis dahin nur anaerob vorbehandelte Prozesswasser dar und spiegelt somit die Effektivität von Protozoen als Organikfilter und nicht-chemisches alternatives Flockungsmittel wider. Die hierbei beschriebene Anwendung von ausgewählten Protozoenarten zur Aufbereitung von Prozesswässern bei hohen Temperaturen stellt ein weltweit neues Konzept dar.

Die Arbeit gliedert sich in einen grundlagentechnischen (Abschnitt I) und einen angewandten Abschnitt (Abschnitt II):

Abschnitt I: Thermotolerant protists in wastewater

- Kapitel 1 gibt einen Überblick über die Biodiversität der Ciliaten, die in Belebtschlammbecken unterschiedlicher Papierfabriken vorgefunden wurden. Dabei wurden identische Morphospecies aus natürlichen und künstlichen Habitaten hinsichtlich ihrer Molekularbiologie und Autökologie verglichen.
- Kapitel 2 umfasst die autökologischen und molekularbiologischen Untersuchungen von verschiedenen heterotrophen Flagellaten (*Histiona aroides*, *Pseudohistiona africanensis* und *Histiona aroides ?thermophilus*). Dabei handelte es sich bei den Vertretern von *Histiona* um identische Morphospecies. Die Arten wurden aus natürlichen und künstlich beheizten Belebtschlammmanlagen isoliert.

Abschnitt II: Nutzungsmöglichkeiten für thermotolerante Protozoen in der Papierindustrie

- Kapitel 3 analysiert die ökologischen Charakteristika sowie die Einsatzbedingungen von Protozoen, die im Wasserkreislauf im Anschluss an die vorgeschaltete Anaerobie (MTS) und die thermale „Aerobe Zyklische Enthärtung“ vorgefunden werden.
- Kapitel 4 beschreibt die Wiederverwendungsmöglichkeiten des biologisch gereinigten Prozesswassers und diskutiert einen möglichen Einsatz von Protozoen in der chemikalienarmen Prozesswasserreinigung.
- Kapitel 5 diskutiert den Einsatz von Polyacrylamiden zur Unterstützung der Entkarbonisierung
- Kapitel 6 gibt Aufschluss über die Reinigungsleistung und Einsatzmöglichkeiten ausgewählter thermophiler Protozoenarten. Dabei wurden die Effekte von *Histiona aroides ?thermophilus* auf die Bakterienaggregation sowie der Einfluss von *Oxytricha longa* & *Cyclidium glaucoma* auf die Entwicklung des chemischen Sauerstoffbedarfs untersucht.

Referenzen

Althoefer, P. (2000): Biotechnical treatment systems for industrial water recycling and reuse -combined anaerobic an aerobic treatment of effluent from the paper industry. In: International Conference on Ecosystem Service and Sustainable Watershed Management towards Flood Prevention, Pollution Control and Socio-Economic Development in North China, Peking.

Arregui L., Serrano S, Linares M., Perez-Uz B., Guinea A. (2007): Ciliate contribution to bioaggregation: laboratory assays with axenic cultures of *Tetrahymena thermophila*. *International Microbiology* 10: 91-96

Azam F., Fenchel T., Field J.G., Gray J.S., Meyer-Reil L.A. (1983): The ecological role of water-column microbes in the sea. *Marine Ecology - Progress Series* 10: 257-263

Bischoff C., Hamm U. (1999): Wasser sparen - Abwasser und Emissionen reduzieren. Verfahrenstechnische Maßnahmen zur Lösung der Calcium-Problematik in eng geschlossenen Wasserkreisläufen bei der Herstellung von Wellpappenpapier aus Altpapier. *Studie im Auftrag der RESY Organisation für Wertstoff-Entsorgung*, Darmstadt

Boenigk J., Matz C., Jürgens K., Arndt H. (2002): Food concentration-dependent regulation of food selectivity of interception-feeding bacterivorous nanoflagellates. *Aquatic Microbial Ecology* 27: 195-202

Brown P.B., Wolfe G.V. (2006): Protist genetic diversity in the acidic hydrothermal environments of Lassen Volcanic National Park, USA. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 53: 420-431

Canganella F. (2001): Hydrothermal vent ecosystems and representative hyperthermophilic microorganisms. *Annals of Microbiology* 51: 11-27

Fenchel T., Finlay B.J. (2004): The ubiquity of small species: patterns of local and global diversity. *Bioscience* 54: 777-784

Finlay B.J. (2002): Global dispersal of free-living microbial eukaryote species. *Science* 296: 1061-1063

Finlay B.J., Esteban, G.F (1998): Freshwater protozoa: biodiversity and ecological function. *Biodiversity and Conservation* 7: 1163-1186

Foissner W., Berger H., Kohmann F. (1994): Taxonomische und ökologische Revision der Ciliaten des Saprobiersystems. *Informationsheft des Bayerischen Landesamtes für Wasserwirtschaft* 1-5/91

Jiang L., Krumins J. (2006): Consumer vs environmental productivity of bacterial diversity and bacterial-mediated organic matter decomposition. *Oikos* 114: 441-450

Jürgens K., Matz C. (2002): Predation as shaping force for phenotypic and genotypic composition of planktonic bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 31: 413-434

Morin P.J., McGrady-Steed J. (2004): Biodiversity and ecosystem functioning in aquatic microbial systems: a new analysis of temporal variation and species richness – predictability relations. *Oikos* 104: 458-466

Nicolau A., Mota M., Lima N. (2007): Microfauna as indicator of copper, zinc and cycloheximide in activated sludge processes. *Environmental Engineering Science*, 24: 434-445

Penas-Ares M., Paniagua-Crespo E., Madrinan-Choren R., Marti-Mallen M., Arias-Fernandez M.C. (1994): Isolation of free-living pathogenic amoebae from thermal spas in N.W. Spain. *Water Air and Soil Pollution* 78: 83-90

Rohr U., Weber S., Michel R., Selenka F., Wilhelm M. (1998): Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance. *Applied and Environmental Microbiology* 64: 1822-1824

Weisse T., Scheffel U., Stadler P., Foissner W. (2007): Local adaptation of among geographically distant clones of the cosmopolitan freshwater ciliate *Meseres corlissi* II, Response to pH. *Aquatic Microbial Ecology* 47: 280-297