



(12) Wirtschaftspatent

Erteilt gemäß § 17 Absatz 1 Patentgesetz

(19) DD (11) 218 391 A1

4(51) C 12 Q 1/02

AMT FÜR ERFINDUNGS- UND PATENTWESEN

In der vom Anmelder eingereichten Fassung veröffentlicht

(21) WP C 12 Q / 252 249 3

(22) 23.06.83

(44) 06.02.85

(71) Akademie der Wissenschaften der DDR, 1199 Berlin, Rudower Chaussee 5, DD

(72) Huth, Joachim, Dipl.-Biol., DD

(54) Verfahren zur Bestimmung von NH_4^+ -Stickstoff mittels Mikroorganismen

(57) Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Bestimmung von NH_4^+ -Stickstoff mittels Mikroorganismen. Sie hat das Ziel, ein Verfahren zur Bestimmung von Proben, die mit störenden Faktoren behaftet sind, zu entwickeln. Erfindungsgemäß werden Mikroorganismen, die in der Lage sind, in einer wäßrigen Nährsalzlösung in Gegenwart aller für das Wachstum erforderlichen Nährsalze, einer stickstofffreien Kohlenstoffquelle und eines freien Sauerstoff enthaltenden Gases unter Verwendung von NH_4^+ -Stickstoff als einziger Stickstoffquelle zu wachsen, vorkultiviert. Die Mikroorganismenkultur wird stickstofflimitiert, der pH-Wert mittels Basenzudosierung statiert. Man gibt eine Ammoniumionen enthaltende Probe zu und der Ammoniumionenverbrauch wird direkt aus der Säureausscheidung der Kultur bestimmt. Anwendungsgebiet ist die mikrobiologisch-biotechnologische Industrie zur Untersuchung von Nähr- und Kulturlösungen, sowie die Untersuchung von Wasser-, Abwasser-, Boden- und anderen Umweltproben.

Huth, Joachim

Verfahren zur Bestimmung von NH_4^+ -Stickstoff mittels Mikroorganismen

Anwendungsgebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von NH_4^+ -Stickstoff mit Hilfe von Mikroorganismenkulturen. Die Erfindung findet Anwendung für die Untersuchung von Nähr- und Kulturlösungen in der mikrobiologisch-biotechnologischen Industrie und Forschung sowie bei der Untersuchung von Wasser-, Abwasser-, Boden- und anderen Umweltproben.

Charakteristik der bekannten technischen Lösungen

Die Bestimmung von Ammoniumkonzentrationen ist analytisch weit verbreitet. Sie dient u.a. als Charakteristikum für viele medizinisch-diagnostische Probleme, als Parameter zur Beurteilung von Boden-, Wasser-, Abwasser- oder anderen Umweltproben, oder zur Charakterisierung von Prozeßverläufen, z.B. in der mikrobiologisch-biotechnologischen Industrie.

Für die Ammoniumbestimmung ist bereits eine Vielzahl von analytischen Methoden beschrieben worden. Am gebräuchlichsten sind chemische Methoden, wie die NH_4^+ -Bestimmung durch Titration des mittels Wasserdampf ausgetriebenen Ammoniaks in basischem Milieu nach KJELDAHL oder die photometrische Bestimmung mit NESSLERS-Reagens oder nach Berthelot. Diese Methoden gestatten den Nachweis von 1-2 μg Stickstoff, bereiten jedoch insofern Probleme, daß viele andere stickstoffhaltige Verbindungen störend wirken können. Die KJELDAHL-Methode liefert schlechtere Ergebnisse, wenn der Ammoniumgehalt der Proben groß ist, ge-

gestattet aber die Verarbeitung von Feststoff-belasteten Proben, deren Bearbeitung bei Anwendung photometrischer Methoden erschwert ist.

Beim Einsatz von Ionenselektiven Elektroden für die Ammoniumbestimmung werden die Ergebnisse stark durch die Konzentration mehrerer kleinerer Kationen wie H^+ , K^+ und Na^+ beeinflusst.

Der Einsatz von Gasselektiven Elektroden gestattet eine schnelle und genaue Bestimmung von Ammoniumionen bei pH-Werten größer als 10, die Anschaffungskosten für das Meßsystem sind jedoch recht erheblich.

Ziel der Erfindung

Die Erfindung hat das Ziel, die Bestimmung von Ammoniumkonzentrationen und -gehalten von Proben, die mit störenden Faktoren wie Feststoff- oder Schmutzpartikeln oder Mikroorganismen behaftet sind und dadurch für die bekannten Bestimmungsverfahren schlecht zugänglich sind, zu ermöglichen.

Darlegung des Wesens der Erfindung

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Ammoniumionen von zu untersuchenden Proben mit Hilfe einer Mikroorganismenkultur zu entwickeln.

Zur Vorbereitung des erfindungsgemäßen Verfahrens wird ein Mikroorganismus, der in der Lage ist, auf NH_4^+ -Ionen als einziger Stickstoffquelle zu wachsen, in einer alle übrigen erforderlichen Nährsalze und eine stickstofffreie Kohlenstoffquelle (Kohlehydrate, Fette, Kohlenwasserstoffe) enthaltenden Nährlösung vorkultiviert. Erfindungsgemäß wird diese Vorkultur bis zum Stickstofflimit geführt bzw. die Biomasse von restlichem Ammonium durch Filtration oder Zentrifugation abgetrennt und sodann in frischer Nährlösung suspendiert, die keine Stickstoffquelle aber die anderen Nährstoffkomponenten im Überschuß enthält. Diese Kultur wird in einem Kleinfermenter als Meßzelle

überführt. Nach einer kurzen Adaptationszeit erfolgt die Bestimmung des Ammoniumgehaltes von Untersuchungsproben. Dazu wird der Kultur bei einem pH-Wert, der dem Schaltpunkt der scale-up-pH-Statierung mittels Basenzudosierung in der Meßzelle entspricht, eine NH_4^+ -Ionen enthaltende Probe zugegeben. Die stickstofflimitierten Mikroorganismen nehmen diese Ionen als Stickstoffquelle auf und bauen sie über die bekannten biochemischen Reaktionen der direkten Aminierung in Kohlenstoffgerüste ein, die dann zum Aufbau stickstoffhaltiger Zellbestandteile (z.B. Aminosäuren, Peptide, Proteine, Nukleotide, Nukleinsäuren, Aminosucker u.a.) verwendet werden. Diese Reaktionen verlaufen unter Freisetzung von Protonen, die von der Zelle zur Aufrechterhaltung eines physiologischen pH-Wertes im Zellinnern ausgeschieden werden müssen. Bei konstantem Membranpotential an der Zelloberfläche ist das nur im Austausch gegen andere Kationen möglich. Den Hauptteil der aufgenommenen Kationen stellen wiederum NH_4^+ -Ionen dar, die auf dem soeben geschilderten Wege für die Aufrechterhaltung dieses Kreislaufs sorgen. Bei Verbrauch der Ammoniumionen im Medium kommt die Säureausscheidung zum Erliegen. Zwischen Ammoniumaufnahme und Säureausscheidung der Kultur besteht bei diesem Prozeß eine lineare Beziehung. Die Bestimmung des NH_4^+ -Gehaltes der zugegebenen Probe erfolgt direkt aus dem Laugenverbrauch, der für die pH-Statierung der Kultur erforderlich ist, in dafür üblicher Art und Weise.

Die aus Laugeverbrauch und Normalität der verwendeten Lauge bestimmte Säureausscheidung der Kultur wird mit dem für den verwendeten Mikroorganismus bestimmten Proportionalitätsfaktor zwischen Ammoniumverbrauch und Säureausscheidung direkt in den Ammoniumgehalt der Probe umgerechnet.

Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet die Bestimmung von Ammoniumionen mittels einer üblichen Kopplung von pH-Elektrode-pH-Meter und Grenzkontaktregler für die scale-up-pH-Statierung anhand des Laugeverbrauchs. Der verwendete Mikroorganismus wird dabei unter Bedingungen gehalten, unter denen das gewählte Meßverfahren nur den Verbrauch von NH_4^+ -Ionen anzeigt. Im Falle des Abbaus von Aminostickstoff kommt es über die gegen-

läufigen biochemischen Reaktionen zu einem pH-Anstieg in der Meßzelle. Die Reaktion wird nicht durch N_2 oder NO_3 -Ionen beeinflusst. Das erfindungsgemäße Verfahren gestattet die Bestimmung von Ammoniumionen in mit Feststoff- oder Schmutzpartikeln bzw. Mikroorganismen belasteten Proben und ist daher vor allem für die Untersuchung von Nähr- und Kulturlösungen in der mikrobiologisch-biotechnologischen Industrie und Forschung sowie in der Untersuchung von Wasser-, Abwasser-, Boden- und anderen Umweltproben geeignet.

Bei der Kontrolle mikrobiologischer Verfahren bietet das erfindungsgemäße Verfahren den Vorteil, daß es den für den im Prozeß verwendeten Mikroorganismus als Stickstoffquelle verfügbaren NH_4^+ -Stickstoff anzeigt und somit eine Optimierung der Stickstoffdosierung während des Prozesses gestattet.

Die Erfindung soll nachstehend durch Beispiele erläutert werden.

Ausführungsbeispiele

Beispiel 1

Lodderomyces elongisporus EH 15 (D) wird in einem Mineralsalzmedium auf NH_4^+ -Ionen als Stickstoffquelle unter folgenden Bedingungen kultiviert:

10-l-Fermenter mit einem Arbeitsvolumen von 4 l

Rührung 1800 ± 100 rpm

Temperatur $32 \pm 0,5$ °C

Belüftung 0,75 VVm

pH-Statierung auf $4,6 \pm 0,3$ mit 2,5 n NaOH

als stickstofffreie Kohlenstoffquelle wird n-Hexadekan eingesetzt.

Während der Fermentation wird der Laugeverbrauch registriert und die NH_4^+ -Konzentration in entnommenen Proben mit der KJELDAHL-Methode bestimmt. Zwischen der Säureausscheidung und der Abnahme der Ammoniumkonzentration besteht eine lineare Beziehung. Die Erfassung der Säureausscheidung aus dem Laugeverbrauch ist erheblich genauer als die NH_4^+ -Bestimmung mit der KJELDAHL-Methode und weist im wesentlichen keine Streuungen auf. Die Korrelation zwischen beiden Größen ist in Abb. 1 dargestellt.

Beispiel 2

L. elongisporus EH 15 (D) wurde unter Bedingungen wie in Beispiel 1 kultiviert. Als stickstofffreie Kohlenstoffquelle wurde Parex II (ein Gemisch von n-Alkanen mit 10 bis 20 C-Atomen) eingesetzt. Die Kultur wurde bis zur Stickstofflimitation geführt, erkennbar am (fast) völligen Ausbleiben der Säureausscheidung der Kultur. Dann erfolgt bei einem pH-Wert von 4,6 die Zugabe definierter Portionen einer 1 M(NH₄)₂SO₄-Lösung. Sofort nach der Zugabe beginnt die Säureausscheidung, die erst nach Verbrauch des Ammoniums wieder zum Erliegen kommt. Der Prozeß kann wiederholt werden, bis eine andere Nährstoffquelle als der NH₄⁺-Stickstoff das Wachstum limitiert. Abb. 2 zeigt die Regressionsgerade für die lineare Korrelation zwischen zugegebenem Ammoniumstickstoff und der Säureausscheidung der Kultur für 22 Meßwerte.

Beispiel 3

L. elongisporus EH 15 (D) wurde analog Beispiel 1 vorkultiviert. 20 ml dieser Kultur werden in 60 ml frischer stickstofffreier Nährsalzlösung aufgenommen und in einen Kleinfermenter überführt. Als stickstofffreie Kohlenstoffquelle wird Parex II im Überschuß zugesetzt. Die Reaktionsbedingungen sind wie folgt:

Rührung 1800 ± 100 rpm

Belüftung 4 VVm

Temperatur 32 ± 0,5 °C

pH-Statierung auf 4,60 ± 0,02 mit 0,100 n NaOH

Ausgangsvolumen 80 ml mit einer Biomasse von ca. 2 g Frischgewicht.

Nach dem Umsetzen wird der pH-Wert auf 4,60 statiert und einige Minuten zur Adaptation an die neuen Bedingungen gewartet. Bei eindeutiger N-Limitation, charakterisiert durch einen mehrere Minuten konstant bleibenden pH-Wert, erfolgt die Zugabe der zu untersuchenden Probe. Der Laugeverbrauch wird registriert. Die Reaktion kann wiederholt werden, bis eine andere Nährstoffquelle als das NH₄⁺ das Wachstum limitiert. Bei Zugabe äquimolarer Mengen (bezogen auf (NH₄⁺) an (NH₄)₂SO₄, NH₄Cl oder NH₄H₂PO₄ scheidet

die Kultur gleiche Säuremengen aus. Die Regressionsgerade für die Korrelation zwischen zugegebener Ammoniumkonzentration und Säureausscheidung der Kultur bei Zugabe von Ammoniumstickstoff in Form der genannten Salzlösungen ist in Abb. 3 dargestellt.

Erfindungsanspruch

Verfahren zur Bestimmung von NH_4^+ -Stickstoff, dadurch gekennzeichnet, daß man Mikroorganismen, die in der Lage sind, in einer wäßrigen Nährsalzlösung in Gegenwart aller für das Wachstum erforderlichen Nährsalze, einer stickstofffreien Kohlenstoffquelle und eines freien Sauerstoff enthaltenden Gases unter Verwendung von NH_4^+ -Stickstoff als einziger Stickstoffquelle zu wachsen, vorkultiviert, diese vorkultivierte Mikroorganismenkultur stickstofflimitiert, den pH-Wert mittels Basenzudosierung statiert, eine Ammoniumionen enthaltende Probe zugibt und den Ammoniumionenverbrauch direkt aus der Säureausscheidung der Kultur bestimmt.

Hierzu 2 Seiten Tabellen

Abb. 2

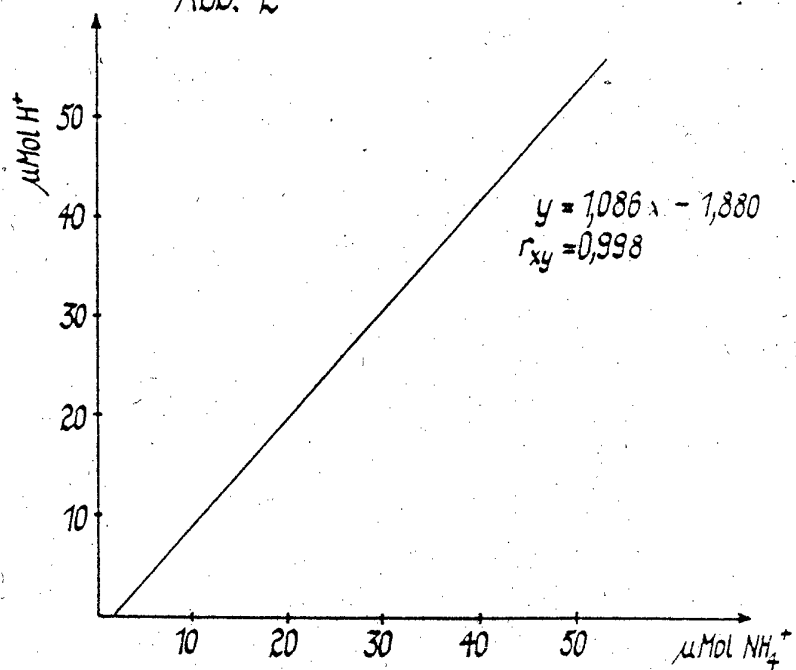


Abb. 3

