

ABSTRACT

The polar, xenobiotic micropollutants 1-H-benzotriazole, 4- and 5-tolyltriazole (BTri, 4-TTri, 5-TTri, summarized as BTs), and the sulfonamide antibiotic sulfamethoxazole (SMX) are due to their widespread applications almost omnipresent in aquatic systems, including drinking water. Therefore, this work was conducted to evaluate the biodegradation potential of activated sludge communities (ASCs) and pure cultures towards these pollutants.

To screen a high number of different setups for BTs and SMX biodegradation within a short time, an easy to perform and very cost-efficient UV-absorbance-based measurement (UV-AM) system was established allowing monitoring biodegradation under laboratory conditions and at xenobiotic concentrations above 1.0 mg L⁻¹.

In a first attempt, three different wastewater treatment plants were monitored for their BTs concentrations and showed 5-TTri to be best removed with a mean of 75% followed by BTri with up to 45% and worst for 4-TTri with up to 15% only. Analysis of the removal in different treatment stages showed that 5-TTri was mainly biodegraded in the aeration tanks while BTri and 4-TTri were equally removed across all treatment stages. Measurements of the receiving rivers up- and downstream the WWTPs proved the latter to be a point source for benzotriazoles in the aquatic environment.

Up to 30 mg L⁻¹ BTri and 5-TTri were biodegraded in non-acclimated ASCs under aerobic conditions at 20°C in up to 49 and 7 days, respectively, but not under denitrifying, sulfate reducing or anaerobic conditions. 4-TTri was biologically stable under all applied conditions. Acclimation significantly improved BTri and 5-TTri biodegradation. While BTri, after acclimation, was removed within 7 days, 5-TTri removal could be reduced to 4 days. Nutrient supply crucially improved biodegradation, especially nitrogen concentrations were observed to play a critical role for biodegradation. While carbon showed no such effect, additionally supplied nitrogen increased biodegradation that became faster and more efficient.

Further experiments regarding the enhancement of 5-TTri biodegradation by optimizing nutrient supply and acclimation were performed. Acclimation and nutrient supply were identified as main factors to improve the biological removal of 5-TTri. Acclimation over several generations optimally adjusted the ASC to utilizing 5-TTri immediately after inoculation and with high biodegradation rates up to 5.2 mg L⁻¹ d⁻¹. Additional experiments, performed with an extract from autoclaved activated sludge supernatant to simulate wastewater nutrient conditions and with specific nitrogen compounds, significantly increased 5-TTri biodegradation rates up to 5.0 mg L⁻¹ d⁻¹ without any acclimation. These experiments indicated that 5-TTri removal is strongly dependent on nitrogen supply and thus might start with benzene ring cleavage, necessitating nitrogen supply. Acclimated ASCs that showed best biodegradation potential were characterized by DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis), metagenomic and metatranscriptomic analysis. DGGE revealed a low biodiversity in the ASC consisting of four dominant species: *Aminobacter* sp., *Flavobacterium* sp., *Hydrogenophaga* sp. and *Pseudomonas* sp.. In contrast, metagenomic analysis showed a higher diversity in the ASCs with the most prominent species being *Mesorhizobium* spp., *Pseudomonas* spp., *Acidovorax* spp. and *Hydrogenophaga* spp.. Metatranscriptomic analysis to reveal the ASCs' metabolic activity revealed *Pseudomonas* spp., *Hydrogenophaga* spp. and *Acidovorax* spp. as the most likely species contributing to 5-TTri biodegradation as they were found with high activities in the biodegrading setups.

A different approach aimed at the evaluation of SMX biodegradation. Nine different bacteria species, capable of SMX biodegradation, were isolated from SMX-acclimated ASCs. 16S rRNA gene sequencing revealed five *Pseudomonas* spp., one *Brevundimonas* sp., one *Variovorax* sp. and two *Microbacterium* spp.. These cultures, incubated in media containing 10 mg L⁻¹ SMX and different carbon and nitrogen concentrations, revealed biodegradation rates up to 2.5 mg L⁻¹ d⁻¹ in complex media under aerobic conditions and room temperature confirming that readily degradable energy sources were crucial for efficient SMX biodegradation. Moreover, media without any carbon and nitrogen supplementation proved the organisms' ability to utilize SMX as sole energy and nutrient source.

KURZFASSUNG

Die polaren Xenobiotika 1-H-Benzotriazol (BTri) sowie 4- und 5-Tolyltriazol (4-TTri, 5-TTri, zusammen als BTs bezeichnet) und Sulfamethoxazol (SMX, Sulfonamid-Antibiotikum) werden vielfältig eingesetzt und finden sich in nahezu allen Oberflächengewässern und im Trinkwasser. Die vorliegende Arbeit behandelt das biologische Abbaupotential von Belebtschlamm-Biozönosen als auch von Reinkulturen gegenüber den erwähnten Stoffen.

Um eine große Anzahl verschiedener Abbauprobversuche überwachen und kontrollieren zu können, wurde eine leicht anwendbare und kosteneffiziente UV-Absorptions-basierte Messmethode (UV-AM) etabliert. Sie ermöglicht die Darstellung des biologischen Abbaus der getesteten Xenobiotika unter Laborbedingungen und Konzentrationen größer 1,0 mg L⁻¹. Dadurch wurde es möglich weiterführende Experimente mit geringem Kostenaufwand zu realisieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Zu- und Ablaufkonzentrationen der drei Benzotriazole in drei verschiedenen Kläranlagen über ein Jahr gemessen. 5-TTri zeigte guten biologischen Abbau mit einer mittleren Elimination von 75%, gefolgt von BTri mit 45% und schließlich 4-TTri mit 15%. Konzentrationsmessungen im Vorfluter vor und nach der jeweiligen Kläranlage bestätigten sie als Haupteintragsquelle für BTs ins Gewässer.

Um die gewonnenen Ergebnisse im Labor zu überprüfen wurden Abbauprobversuche durchgeführt. 30 mg L⁻¹ BTri sowie 5-TTri konnten von Belebtschlamm-Biozönosen, die direkt aus der Kläranlage stammten, unter aeroben Bedingungen innerhalb von 21-49 beziehungsweise 2-7 Tagen biologisch abgebaut werden. Ein Abbau unter denitrifizierenden, sulfatreduzierenden oder anaeroben Bedingungen fand nicht statt, ebenso wenig wie ein biologischer Abbau von 4-TTri, unabhängig von den gewählten Bedingungen.

Durch Anpassung des Belebtschlammes an hohe BTri und 5-TTri Konzentrationen konnte die Abbauleistung wesentlich gesteigert werden, wodurch BTri innerhalb von sieben Tagen und 5-TTri innerhalb von vier Tagen vollständig eliminiert wurden. Zusätzlich angebotene Nährstoffe, v.a. Stickstoff, steigerten die biologische Abbauleistung zusätzlich, wohingegen zusätzlich angebotener Kohlenstoff nahezu keinen Einfluss auf die Eliminationsleistung zeigte.

Weiterführende Experimente zur Optimierung der Bedürfnisse der Belebtschlamm-Biozönose für den Abbau von 5-TTri durch gezielte Anpassung des Schlammes über mehrere Generationen hinweg erschufen eine für 5-TTri Abbau optimierte Biozönose mit einer Abbauleistung von 5,2 mg L⁻¹ d⁻¹. Durch Zugabe eines Belebtschlammextrakts, um annähernd natürliche Nährstoffbedingung zu simulieren, zeigten auch nicht-angepasste Schlämme sehr hohe Abbauraten bis zu 5,0 mg L⁻¹ d⁻¹. Eine ähnliche Verbesserung konnte durch die Zugabe von Stickstoff erzielt werden. Deshalb wird angenommen, dass der Abbau von Benzotriazolverbindungen mit der Spaltung des Benzolrings beginnt und deshalb Stickstoff, der nicht aus den Benzotriazolen gewonnen werden kann, den limitierenden Faktor darstellt.

Eine anschließende Charakterisierung der 5-TTri abbauenden Belebtschlamm-Biozönosen wurde mittels denaturierender Gradientengelelektrophorese (DGGE) und Next-Generation-Sequencing (Metagenom und Metatranskriptom Analyse) erreicht.

Die DGGE Resultate zeigten eine stark reduzierte Diversität mit vier dominanten Spezies: Aminobacter sp., Flavobacterium sp., Hydrogenophaga sp. und Pseudomonas sp..

Im Gegensatz dazu zeigte die Metagenomanalyse eine hohe Diversität und die Spezies Mesorhizobium spp., Pseudomonas spp., Acidovorax spp. und Hydrogenophaga spp. die größte Häufigkeit.

Die Analyse des Metatranskriptoms zur Bestimmung der metabolischen Aktivität der Organismen zeigte, dass die drei Spezies Pseudomonas spp., Hydrogenophaga spp. und Acidovorax spp. mit hoher Wahrscheinlichkeit am Abbau von 5-TTri beteiligt sind.

Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit behandelte das biologische Abbauverhalten von SMX mittels neun verschiedener, aus Belebtschlamm isolierter, bakterieller Reinkulturen. Die Sequenzierung des 16S rRNA Gens lieferte fünf Pseudomonas spp., einen Brevundimonas sp., einen Variovorax sp. und zwei Microbakterium spp.. Inkubation dieser Organismen in Medien mit 10 mg L-1 SMX und leicht abbaubaren Energiequellen zeigte, dass je nach verwendetem Medium Abbauraten von bis zu 2,5 mg L-1 d-1 erreicht werden konnten. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die gefundenen Kulturen fähig waren, SMX als alleinige Energie- und Nährstoffquelle zu nutzen.