



© Stadtwerte Trier (SWT)

Lockdown in der biologischen Abwasserreinigung?

Metalloxyanionen hemmen das Belebtschlammenzym Phosphatase

Klaus Fischer¹ und Marion Wacht¹

Enzyme sind das entscheidende molekulare Tool für den mikrobiellen Abbau von organischen Abwasserinhaltsstoffen in Kläranlagen. Enzymaktivitäten unterliegen vielen Einflussfaktoren und können durch Hemmstoffe herabgesetzt werden, was die vorliegende Studie am Beispiel der alkalischen Phosphatase, ein für die P-Eliminierung wichtiges Enzym, nachweist. Die Ergebnisse sollten Anlass geben, dem bisher vernachlässigten Aspekt der Enzymhemmung durch abwasserbürtige Spurenstoffe mehr Aufmerksamkeit zu widmen.

Enzymhemmung durch Spurenstoffe

Organische Abwasserinhaltsstoffe werden in modernen Kläranlagen üblicherweise in Belebungsbecken entfernt, wo zu Flocken aggregierte Mikroorganismen diese Verbindungen als Substrate nutzen und verstoffwechseln. Hierbei wird eine Vielzahl an mikrobiellen Enzymen aktiv. Da hochmolekulare, nicht zellgängige Verbindungen eine Hauptfraktion der organischen Schmutzfracht bilden, stehen am Anfang der enzymatischen Reaktionsketten häufig molekülpaltende extrazelluläre Hydrolasen. Eine Untergruppe dieser Enzymklasse, die Phosphohydrolasen beziehungsweise Phosphoesterasen, umfasst Schlüsselenzyme für den Abbau natürlicher

und synthetischer organischer Phosphorverbindungen. Deren Aktivität trägt wesentlich zur Einhaltung der Gesamtposphor-Anforderungswerte an das gereinigte Abwasser kommunaler Kläranlagen bei.

Entsprechend der Relevanz dieser Enzymgruppe für die biologische Abwasserreinigung werden technische Betriebsbedingungen und weitere Faktoren, die deren Aktivität beeinflussen, seit langem untersucht. Im Zentrum dieser Studien steht vorwiegend die alkalische Phosphatase (APA), eine Phosphomonoesterase, die bei der Elimination der organischen P-Fracht von zentraler Bedeutung ist. Als wesentliche Aktivitätsparameter wurden u.a. der pH-Wert, die Konzentration und Zusammensetzung der organischen Abwasserkomponenten, die Konzentration verschiedener anorganischer Phosphate sowie die Zusammensetzung der mikrobiellen Biozönose identifiziert. Dabei wurde dem Umstand, dass abwasserbürtige Hemmstoffe die Enzymaktivität herabsetzen und möglicherweise so die Reinigungseffizienz negativ beeinflussen können, bisher kaum Beachtung geschenkt. Soweit dieser Fragestellung hinsichtlich der Phosphatase nachgegangen wurde, konzentrierten sich die Untersuchungen auf Schwermetallkationen wie Hg^{2+} , Cd^{2+} oder Cu^{2+} , die gegenüber der Phosphatase erst ab millimolaren Konzentrationen Effekte auslösen [1].

Aus Studien mit isolierten Phosphatasen ist bekannt, dass phosphatanaloge Metall- und Metalloidoxyanionen wie Vanadat (VO_4^{3-}), Wolframat (WO_4^{2-}) oder Arsenat (AsO_4^{3-}) potente Hemmstoffe dieses Enzyms sind [2]. Für kommunale Abwässer ohne nennenswerte gewerbliche Einleitungen dürften diese Ionen von vernachlässigbarer Bedeutung sein, nicht dagegen für industrielle Abwässer, insbesondere der metallverarbeitenden Industrie [3].

Die vorliegende Arbeit verfolgte das Ziel, eine praktikable Vorgehensweise zu entwickeln, um Enzymhemmung direkt an nativem Belebtschlamm nachzuweisen. Hierbei sollten quantitative Aussagen zu den Wirkschwellen von potentiellen Inhibitoren gewonnen werden. Darüber hinaus waren Anhaltspunkte für eine Interpretation der Hemmmechanismen zu gewinnen. Die damit verbundene Langfristperspektive besteht darin, der Problematik einer möglichen Beeinträchtigung biologischer Abwasserreinigungsprozesse durch abwasserbürtige Enzymhemmstoffe größere Beachtung zu schenken und hierfür eine geeignete Untersuchungsmethodik anzubieten.

Untersuchungsmethodik

Alle Belebtschlämme wurden aus einem Belebungsbecken des Hauptklärwerks der Stadt

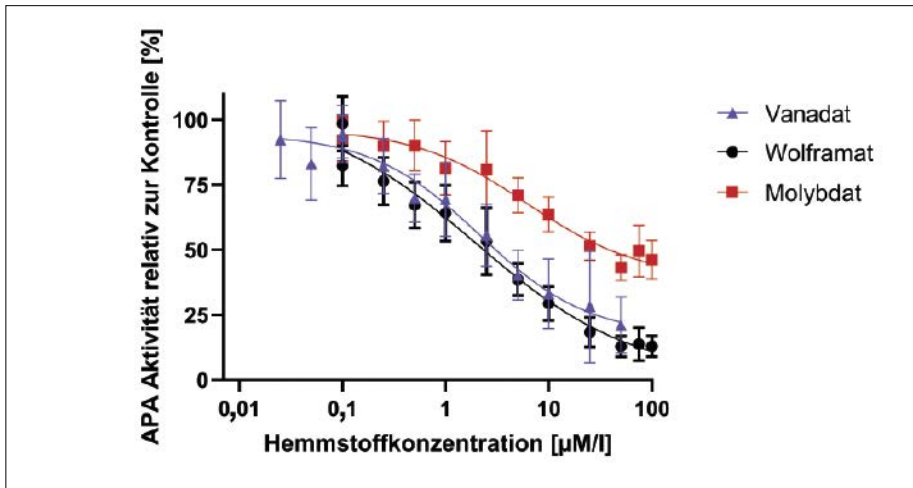


Abb. 1: Dosis-Wirkungsfunktionen für die Hemmwirkungen von Molybdat, Vanadat und Wolframat gegenüber belebtschlammgebundener alkalischer Phosphatase bei pH 7,5. Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse von 8 Versuchsreihen bei Vanadat und Wolframat sowie von 5 Versuchsreihen bei Molybdat.

Trier entnommen und in der Regel am Entnahmetag experimentell eingesetzt [4]. Benötigte Teilmengen wurden mittels HEPES-Puffer verdünnt und dabei auf pH 7,5 eingestellt, soweit die pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung nicht Untersuchungsgegenstand war. Alle Reaktionen wurden in 96-Well-Platten in einem Plattenreader unter Verwendung von 4-Methylumbelliferylphosphat (4-MUFP) als Enzymsubstrat durchgeführt. Die fluorimetrische Konzentrationsmessung des durch enzymatische Hydrolyse freigesetzten Reaktionsproduktes 4-Methylumbelliferon (4-MUF) über einen Zeitraum von 15 - 20 Minuten in Zeitabständen von 1,5 - 2,0 Minuten diente als Grundlage zur Bestimmung der Enzymaktivität mit der Einheit „mU/ml“. Ein mU entspricht hier der Bildung von einem Nanomol 4-MUF pro Minute.

Die Hemmwirkung von Vanadat, Wolframat und Molybdat wurde auf zweierlei Weise analysiert:

- Ermittlung von Dosis-Wirkungsfunktionen und des daraus hervorgehenden IC_{50} -Wertes (Hemmstoffkonzentration, die eine 50 % Enzymaktivitätsminderung bewirkt). Hierzu wurde eine Substratstartkonzentration von 10 $\mu\text{mol/l}$ in den Wells eingestellt und die Konzentration des ebenfalls zugegebenen Hemmstoffs über ca. 2,5 - 3 Größenordnungen in 11 Abstufungen variiert. Aus den experimentellen Daten wurde die Dosis-Wirkungsfunktion durch Fitting mit dem „4 Parameter logistischen Modell“ generiert. Die pH-Abhängigkeit der Dosis-Wirkungsfunktion wurde in Abstufungen von 0,25 Einheiten innerhalb des pH-Bereichs von 7,0 bis 8,5 mittels einer zweiten, zeitversetzt entnommenen Probenmenge untersucht.
- Bestimmung der enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von

der Substratkonzentration und Transformation der Daten in das enzymkinetische Modell von Michaelis-Menten mittels nichtlinearer Regression. Dieses Modell liefert die beiden Reaktionsparameter K_M (Michaelis-Menten-Konstante: Substratkonzentration bei halbmaximaler Reaktionsgeschwindigkeit) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit V_{max} .

Die Michaelis-Menten-Funktion setzt sich aus den Einzelkinetiken der gewählten Substratkonzentrationen zusammen; hier wurden 12 Startkonzentrationen über einen Bereich von ca. 2,5 Größenordnungen vorgegeben. Neben der Referenzkinetik („Kontrolle“) ohne Hemmstoffzusatz wurden Kinetiken unter dem Einfluss von 3 Hemmstoffkonzentrationen (5,0; 25,0 und 100,0 $\mu\text{mol/l}$; je Versuchsreihe eine konstante Hemmstoffkonzentration) aufgezeichnet.

Dosis-Wirkungsbeziehungen

Wolframat und Vanadat erwiesen sich als starke Hemmstoffe mit nahezu identischen Hemmwirkungen. Die bei pH 7,5 ermittelten IC_{50} belaufen sich auf $2,87 \pm 1,21 \mu\text{M/l}$ bzw. $330 \pm 139 \mu\text{g/l}$ für Vanadat und $2,45 \pm 0,90 \mu\text{M/l}$ bzw. $607 \pm 223 \mu\text{g/l}$ für Wolframat. Die vergleichsweise geringe Standardabweichung der IC_{50} lässt auf eine relativ konstante Hemmwirkung der Inhibitoren schließen, die durch jahreszeitlich bedingte Änderungen in der Schlammkonsistenz wenig beeinflusst wird. Eine Vanadatkonzentration von ca. 100 $\mu\text{g/l}$ ist bereits in der Lage, die APA-Aktivität um 20 % herabzusetzen.

Demgegenüber war die Molybdathe-mmwirkung weitaus geringer und hoch varia-

bel. Mehrfach lag auch bei der maximalen Testkonzentration von 100 $\mu\text{M/l}$ (15,9 mg/l) die Hemmung unter 50 %. In anderen Versuchsreihen wurden IC_{50} zwischen 34 und 57 $\mu\text{M/l}$ ermittelt. Abbildung 1 verdeutlicht die erheblichen Unterschiede in den Dosis-Wirkungsfunktionen der Hemmstoffe.

pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung

Der Name „alkalische Phosphatase“ weist bereits auf die pH-Abhängigkeit der katalytischen Enzymwirkung hin. Die Aktivität des ungehemmten Enzyms nahm nahezu linear innerhalb des getesteten pH-Bereichs mit zunehmendem pH-Wert zu und erreichte bei pH 8,5 etwa 125 % der Aktivität bei pH 7,0. Die faktische Aktivitätszunahme war in Gegenwart von Wolframat wesentlich größer, da dessen Hemmwirkung mit steigendem pH-Wert abnahm, was sich in der entsprechenden Zunahme der IC_{50} von ca. 1,0 $\mu\text{M/l}$ bei pH 7,0 auf ca. 5,2 $\mu\text{M/l}$ bei pH 8,5 widerspiegelt. Bei Vanadat war keine pH-Abhängigkeit der Hemmwirkung festzustellen. Die IC_{50} -Konzentrationen variierten zwischen 1,02 und 2,57 $\mu\text{M/l}$ und entsprachen in etwa denen von Wolframat oder unterschritten diese. Der stärkste Wirkungsunterschied der beiden Inhibitoren trat bei pH 8,5 auf. Bei diesem pH-Wert war der IC_{50} von Wolframat um das Vierfache gegenüber Vanadat erhöht (Abbildung 2).

Aufgrund der wesentlich geringeren und ungenügend reproduzierbaren Hemmwirkung von Molybdat war es nicht möglich, für dieses Oxyanion einen statistisch aussagekräftigen Datensatz für den ganzen pH-Bereich zu generieren. Der Trend weist in die gleiche Richtung wie bei Wolframat: abnehmende Hemmwirkung mit zunehmendem pH.

Kinetische Analyse

Der Vergleich der unbeeinflussten und der Hemmstoff-modifizierten Enzymkinetik kann Einblicke in den Hemmmechanismus, d.h. die molekulare Interaktion zwischen Enzym und Inhibitor, geben. Unter der Annahme, dass das Michaelis-Menten-Modell die Enzymkinetik zutreffend abbildet, macht sich der Hemmeffekt an einer Veränderung des K_M -Wertes und/oder der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bemerkbar. Während V_{max} nur gleich bleiben oder abnehmen kann, sind beim K_M -Wert sowohl eine Zunahme als auch eine Abnahme möglich.

Die große Mehrzahl der Studien zur Einwirkung von Metalloxyanionen auf isolierte und aufgereinigte APA kommt zu dem Schluss, dass der kompetitive Mechanismus dominiert, der sich durch eine Erhöhung

von K_M bei nahezu unverändertem V_{max} zu erkennen gibt. Dies bedeutet, dass die Hemmstoffe mit den Substraten um die Bindung im katalytischen Zentrum des Enzyms konkurrieren und dort reversibel gebunden werden. Die Erhöhung von K_M ist auf diesen Konkurrenzeffekt zurückzuführen: Je mehr Hemmstoff präsent ist, desto höher muss die Substratkonzentration sein, um diesen aus dem aktiven Zentrum zu verdrängen bzw. am Zutritt zu hindern. Dieses Phänomen veranschaulicht Abbildung 3, die das Ergebnis einer kinetischen Messung mit Wolframatzusatz wiedergibt. Deutlich zu erkennen ist das Abflachen der kinetischen Kurven mit zunehmender Wolframatkonzentration. Dem entspricht die gleichsinnige Zunahme der K_M -Werte, deren Lage auf der Substratkonzentrationsachse mit Pfeilen markiert ist. Es deutet sich zudem an, dass V_{max} mit zunehmender Wolframatkonzentration abnimmt. Aus der Datenregression werden folgende V_{max} -Werte erhalten: 5,0 mU/ml (Kontrolle), 3,9 mU/ml ($5 \mu\text{M}/\text{l WO}_4^{2-}$), 3,3 mU/ml ($25 \mu\text{M}/\text{l WO}_4^{2-}$) und 3,2 mU/ml ($100 \mu\text{M}/\text{l WO}_4^{2-}$). Weder die Zunahme von K_M noch die Abnahme von V_{max} ist proportional zur Zunahme der

Hemmstoffkonzentration. Dem entsprechend kann hier kein rein kompetitiver Mechanismus vorliegen. Es muss Sekundärreaktionen geben, die den enzymatischen Stoffumsatz zusätzlich beeinflussen oder überlagern. Bei einem derart heterogenen Reaktionssystem, wie es eine Belebtschlamm suspension darstellt, das potentiell auch in die Phasenverteilung und die chemische Spezies des Hemmstoffs eingreift, wäre das Auftreten einer „idealtypischen“ Reaktionskinetik auch eher unwahrscheinlich.

Fazit

Die phosphatstrukturanalogen Oxyanionen der Übergangsmetalle Vanadium und Wolfram erwiesen sich als starke Hemmstoffe gegenüber dem belebtschlammgebundenen Enzym alkalische Phosphatase. In Laborexperimenten mit verdünnten Belebtschlamm suspensionen lösten bereits Hemmstoffkonzentrationen von 100 bis 250 $\mu\text{g}/\text{l}$ signifikante Hemmeffekte aus. Kinetische Studien verdeutlichten einen hohen Verdrängungseffekt gegenüber dem Enzymsubstrat bereits bei einer Hemmstoffkonzentration von 5 $\mu\text{M}/\text{l}$. Dem entsprechend sind Auswirkun-

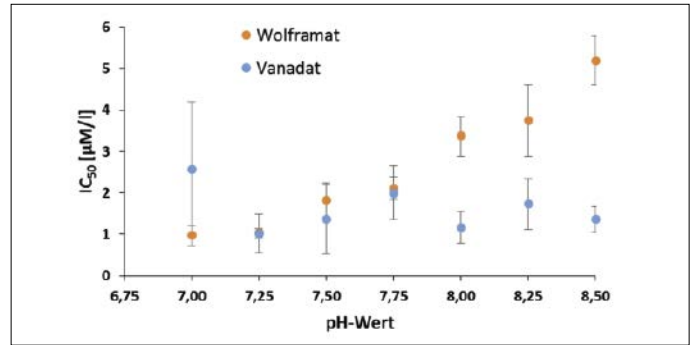


Abb. 2: pH-Abhängigkeit der IC_{50} -Werte von Wolframat und Vanadat im pH-Bereich 7,0 – 8,5. Mittelwerte und Standardabweichungen der Ergebnisse von jeweils 5 (Vanadat) bzw. 4 (Wolframat) pH-spezifischen Versuchsreihen.

gen auf den mikrobiellen Abbau organischer Phosphorverbindungen im Rahmen der biologischen Abwasserreinigung durch diese Metallverbindungen nicht auszuschließen. Zwar ist die Vorkommen dieser Stoffe weitgehend auf industrielle Abwässer beschränkt, doch ist deren Auftreten in kommunalen Abwasserströmen, die gewerblichen Einleitungen unterliegen, nicht ausgeschlossen. Darüber hinaus liefert die Studie Indizien dafür, dass eine mögliche Beeinträchtigung mikrobieller Abbaureaktionen in Kläranlagen durch Enzymhemmstoffe nicht rein hypothetischer Natur sein muss, sondern unter Umständen praktische Bedeutung erlangen kann. In Anbe-

tracht der vielen Spurenstoffen, zum Beispiel von Pharmaka und Pestiziden, deren Wirkprinzip auf einer Enzymhemmung beruht, wäre es verwunderlich, wenn solche Effekte nicht auftreten würden. Es spricht also vieles dafür, die Forschung auf diesem bisher stark vernachlässigten Feld zu intensivieren.

Danksagung

Unser Dank gilt vor allem den Mitarbeitern des Hauptklärwerks Trier, die uns seit etlichen Jahren zuverlässig Belebtschlammproben zur Verfügung stellen. Wir danken zudem Herrn Lambert Akongha, stellvertretender Leiter des SWT-Betriebslabors, für die stete Unterstützung unserer Arbeit, sowie Frau Dr. Beatriz Böger für die Mitwirkung bei der Versuchsdurchführung und -auswertung.

Zugehörigkeit

¹Analytische und Ökologische Chemie, Fachbereich VI, Universität Trier, Deutschland

KONTAKT |

Prof. Dr. Dr. Klaus Fischer
Analytische und Ökologische Chemie
Fachbereich VI
Universität Trier
Trier, Deutschland
fischerk@uni-trier.de
www.umweltchemie.uni-trier.de

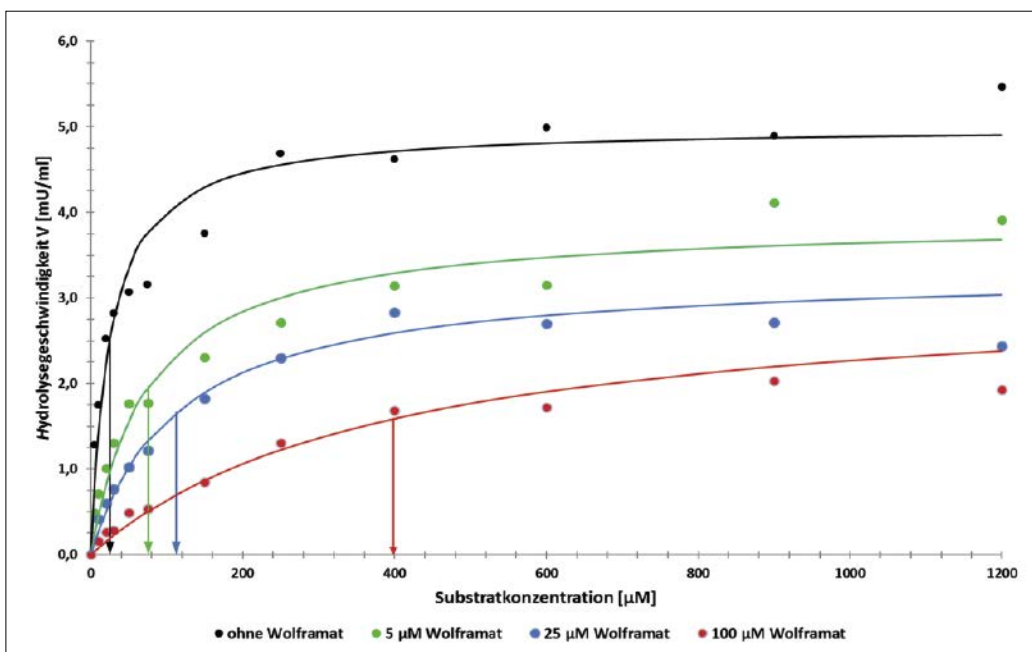


Abb. 3: Michaelis-Menten-Kinetikfunktionen für die Hydrolyse von 4-MUFP durch belebtschlammgebundene alkalische Phosphatase bei pH 7,5 ohne Hemmstoffzugabe und unter Einwirkung von 3 unterschiedlichen Wolframatkonzentrationen. Die Pfeile markieren die jeweiligen K_M -Werte.

[1]

Literatur:
<https://bit.ly/GIT-Fischer-1>