

Leistungen immobilisierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von Umweltschadstoffen

Habilitationsschrift

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium habilitus (Dr. rer. nat. habil.)

vorgelegt der

Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle - Wittenberg

von

Frau Dr. rer. nat. Marion Martienssen

geb. am: 31.07.59 in: Frankfurt (Oder)

Gutachter:

1. Prof. Dr. J. R. Andreesen, Univ. Halle
2. Prof. Dr. H. Köser, Univ. Halle
3. Prof. Dr. W. Trösch, Fraunhofer Institut Stuttgart

Halle(Saale), 10.4.2001

Abkürzungsverzeichnis

a	Gleichgewichtsbeladung bei der Adsorption (mg/g Adsorbens)
AOX	Organisch gebundenes Halogen
AU	Extinktionseinheit (attenuation unit)
B _R	Raumbelastung eines Reaktors (mg/l*d)
B _{TS}	Schlammbelastung eines Reaktors (mg/gBTS*d)
BSA	Rinderserumalbumin
BSB	Biologischer Sauerstoffbedarf (mg/lO ₂)
BTS	Biotrockenmasse (g TS)
BTX	BTX-Aromaten (summarische Bezeichnung für Benzol, Toluol und Xylol)
CHP	Cumolhydroperoxid
C _{eq}	Konzentration unter Gleichgewichtsbedingungen
C _{org}	organisch gebundener Kohlenstoff
Con.A	Concanavalin A
CPS	Zelloberflächengebundene extraplastidäre Substanzen
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
e	elektrische Elementarladung
ε	Dielektrizitätskonstante der elektrischen Doppelschicht
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
γ _{LV}	Grenzflächenspannung zwischen Luft und Meßflüssigkeit
γ _{SV}	Grenzflächenspannung zwischen Luft und Oberfläche
γ _{SL}	Grenzflächenspannung zwischen Meßflüssigkeit und Oberfläche
γ ^{LW}	Lifshitz-van der Waals Komponente der Oberflächenspannung
γ ^{AB}	polare Komponente der Oberflächenspannung (Lewis-Säure-Base-Komponente)
GC	Gaschromatographie
ΔG _{iwi}	freie Enthalpie (Gibbssche Energie) bei der Zusammenlagerung gleichartiger Partikel in Wasser
G _{tot}	Freie Enthalpie der Wechselwirkung
GE	elektrostatische Komponente der freien Enthalpie
GV	Lifshitz- van der Waals-Komponente der freien Enthalpie
HPLC	Hochdruck-Füssigkeits-Chromatographie (High-Pressure-Liquid Chromatography)
IEF	Isoelektrische Focussierung

IEP	Isoelektrischer Punkt
K	Boltzmannkonstante
k	Geschwindigkeitskonstante
λ	optische Wellenlänge
MIC	mikrobiell induzierte Korrosion
MHP	Methylhydroperoxid
μ_E	elektrophoretische Mobilität ($m^3/V*s$)
N	Avogadro-Konstante
η	Viskosität (cp)
PAH	Polyzyklische Aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PVA	Polyvinylalkohol
RPM	Umdrehungen je min.
σ_0	Netto-Ladungsdichte
S	Substanzmenge (Mol/l)
T	Temperatur (K)
T	hydraulische Verweilzeit
t	Zeit
TBT	Tributylzinn
TFA	Trifluoressigsäure
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoff (mg/l C)
TS	Trockensubstanz
WGA	Winkler-Generator-Asche
ξ	Zetapotential (mV)
z	Valenz

Inhalt	Seite	
1	Einführung und Zielstellung	1
2	Definition	3
3	Die Bedeutung von Biofilmen in Natur und Technik	3
4	Prinzipien für die Immobilisierung von Mikroorganismen	13
4.1	Oberflächenimmobilisierung	14
4.2	Immobilisierung in porösen Matrices	15
4.3	Einschlußimmobilisierung	16
4.4	Hydrodynamische Zellrückhaltung	17
4.5	Mikrobielle Zellaggregate	17
5	Entstehung und Aufbau von Biofilmen	18
5.1	Die primäre Adhäsion	20
5.1.1	Theoretische Grundlagen	20
5.1.2	Einflußfaktoren auf die Primäradhäsion	28
5.1.2.1	Die Struktur der bakteriellen Oberfläche	28
5.1.2.1.1	Makroskopische Charakterisierung mittels Oberflächenladung, Hydrophobizität und freier Oberflächenenergie	30
5.1.2.1.2	Wirkungen einzelner Bestandteile der bakteriellen Oberfläche	51
5.1.2.1.2.1	Extrazelluläre Polysaccharide	51
5.1.2.1.2.2	Proteine	61
5.1.2.1.2.3	Lipopolysaccharide	65
5.1.2.1.2.4	Spezielle Oberflächenstrukturen	66
5.1.2.1.3	Einflüsse von Umweltbedingungen und des physiologischen Zustandes der Organismen auf die Oberflächenstruktur	67
5.1.2.2	Eigenschaften der Trägermaterialien und ihre Wirkung auf die bakterielle Adhäsion	73
5.2	Entwicklung und Struktur des nativen Biofilmes	76
5.2.1	Einfluß des Trägers auf Zusammensetzung und Struktur der Biofilme	78
5.2.2	Wirkung von Umweltfaktoren auf Zusammensetzung und Struktur der Biofilme	82
6	Optimierung von Biofilmsystemen für den Abbau definierter Umweltschadstoffe	83
7	Leistungen trägerfixierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von ausgewählten Umweltschadstoffen	95
7.1	Abbau extremer Konzentrationen organischer Schadstoffe aus wäßrigen Medien	95

7.1.1	Problemstellung – Besondere Anforderungen an die Abbauleistung	95
7.1.2	Abbau phenolischer Verbindungen durch immobilisierte Organismen im Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor	99
7.1.3	Kombinierte adsorptiv- biologische Behandlung arsenhaltiger Wässer durch Biofilme auf Pulveraktivkohle	109
7.2	Eliminierung persistenter Verbindungen – Die Bedeutung des Biofilmträgers beim Abbau von Huminstoffen	123
7.3	Abbau persistenter organischer Verbindungen mit bakterientoxischen Eigenschaften durch die Kombination biotechnischer und chemischer Wirkmechanismen	129
7.3.1	Problemstellung – Besondere Anforderungen an die Abbauleistung	130
7.3.2	Mineralisierung organischer Peroxide durch Biofilmkonsortien auf katalytisch aktiven Trägern	131
7.3.3	Änderung der Biofilmstruktur unter dem Einfluß eines toxischen Substrates	136
7.4	Eliminierung von Substanzen mit geringer Bioverfügbarkeit	140
7.4.1	Abbau organischer Verbindungen aus stabilen Emulsionen	141
7.4.2	Einsatz immobilisierter Mikroorganismen zur Leistungssteigerung bei der Bodensanierung	143
7.5	Eliminierung von Umweltschadstoffen aus schwermetallbelasteten Abwässern durch die Kombination von biologischem Abbau und Biosorption	147
7.6	Einsatz von Biofilmtechnologien bei der biologischen Stickstoffelimination	155
7.6.1	Leistungen und Grenzen der biologischen Stickstoffelimination durch Biofilmverfahren	155
7.6.1.1	Die Nitrifikation	155
7.6.1.2	Die Denitrifikation	160
7.6.2	Einsatz trägerfixierter Nitrifikanten für die Messung von Nitrifikationsinhibitoren	162
8	Zusammenfassung	167
9	Literaturverzeichnis	170
10	Abbildungen	194
11	Tabellen	200
A.	Anhang	
A.1	Verwendete Methoden und Meßverfahren	i
A.2	Geräte und Chemikalien	i
A.2.1	Verwendete Geräte und Materialien	xxv
A.2.2.	Verwendete Chemikalien	xxv xxvi

1. Einführung und Zielstellung

Die Anlagerung von Mikroorganismen an feste Oberflächen und die Ausbildung von Biofilmen sind in der Natur ubiquitär. Bisher ist kein Werkstoff bekannt, der auf Dauer einer mikrobiellen Besiedelung widersteht [1. 5]

Die Fähigkeit der Bakterien zur dauerhaften Ansiedlung auf unterschiedlichsten Materialien führt einerseits zu unerwünschten Beeinträchtigungen technischer Anlagen (Biokorrosion, Biofouling, Verblockung von Membranen, Keimanreicherung in Rohrleitungssystemen etc.) [1. 7]. Andererseits werden immobilisierte Mikroorganismen seit langem gezielt und erfolgreich für verschiedene technische Prozesse, z.B. als Biofilmtechnologien in der Abwasserreinigung, verwendet [1. 4, 1. 9].

Die in Biofilmen angeordneten Mikroorganismen zeigen gegenüber frei suspendierten eine Reihe von Vorzügen. So werden oftmals deutlich höhere Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt, als mit konventionellen Verfahren, was u.a. die Eliminierung hoher Konzentrationen und extremer Frachten von Umweltschadstoffen ermöglicht [1. 6, 1. 12]. Biofilme, insbesondere solche auf adsorptionsfähigen Trägern sind dabei meist wenig empfindlich gegenüber Stoßbelastungen [1. 11] und besitzen vielfach eine herausragende Resistenz gegenüber toxischen Substraten und bakteriziden Wirkstoffen [1. 8]. Weiterhin werden durch adsorptive Anreicherung von Substraten auch Verbindungen aus vergleichsweise gering konzentrierten Lösungen mit genügend hohen Umsatzraten abgebaut [1. 15, 1. 17]. Besonderes Interesse erlangten Biofilmtechnologien jedoch vor allem für den biologischen Abbau stark persistenter Verbindungen [1. 2, 1. 9].

Die beachtliche Leistungsfähigkeit immobilisierter Mikroorganismen führte in den vergangenen Jahren zu intensiven Forschungsaktivitäten, welche zu einem größeren Verständnis der diesen Effekten zugrunde liegenden Mechanismen beigetragen haben. Aus einer Reihe von Untersuchungen verschiedener Autoren wurden dabei bisher mehrere Hypothesen abgeleitet. So kann davon ausgegangen werden, daß insbesondere in porösen Materialien spezifische „Mikrokonsortien“ existieren, die untereinander in Wechselwirkung treten und in denen ein Wachstum empfindlicher Spezialisten ermöglicht wird, welche zum Abbau persistenter Verbindungen befähigt sind [1. 10, 1. 16]. Für reversibel adsorbierbare Organika tritt ein als „Bioregeneration“ bezeichneter Prozeß ein, bei dem an der Trägeroberfläche adsorbierte Substanzen aufgrund sinkender Konzentration im Biofilm oder unter dem Einfluß extrazellulärer Enzyme desorbieren, an die äußere Oberfläche des Adsorbenskornes diffundieren und anschließend mikrobiell umgesetzt werden [1. 14]. Der Wechselwirkung von Adsorption und Abbau wird z.B. eine wesentliche Bedeutung für die bekannte hohe Prozeßstabilität von Biofilmsystemen beigemessen [1. 18].

Die Immobilisierung der Mikroorganismen erfolgt in oder auf Trägern mit unterschiedlichen Eigenschaften. Die dabei verwendeten Träger werden gegenwärtig überwiegend anhand verfahrenstechnischer Kriterien oder durch Voruntersuchungen mit potentiell verfügbaren Materialien ausgewählt [1. 1].

Für die technische Anwendung als besonders geeignet erwiesen sich bisher vor allem multifunktionale Trägermaterialien mit einem hohen Anteil an Makroporen, insbesondere solche natürlichen Ursprungs, wie Aktivkohlen, Anthrazite, Kokse, Tone oder Zeolithe [1. 4, 1. 13]. Die universelle Verwendbarkeit dieser Träger beruht auf einer Vielzahl von Wechselwirkungen im einem System Träger-Biofilm-Substrat. Diese Universalität der Trägermaterialien beinhaltet jedoch einen erheblichen Nachteil und zwar eine geringe Selektivität gegenüber bestimmten Organismengruppen. Damit sind diese Träger kaum geeignet, gezielt Einfluß auf die Anreicherung von Organismen mit bestimmten Stoffwechselleistungen zu nehmen. Entsprechend werden bei Biofilmprozessen, insbesondere dann, wenn die gewünschte Leistung nur von wenigen Arten realisiert wird, immer wieder Instabilitäten bzw. Verluste der gewünschten Leistung festgestellt [1. 11, 1. 19].

Untersuchungen verschiedener Autoren zeigen, daß z.B. in industriellen Abwasserbehandlungsanlagen eine Reihe von häufig eingesetzten Substanzen nicht abgebaut wird, obwohl natürlich vorkommende Organismen bekannt sind, die die Fähigkeit zur Mineralisierung dieser Verbindungen besitzen [1. 3, 1. 20]. So gelten u.a. Morpholin, Tetrahydrofuran, Dioxan und Glykolether als weitgehend persistent. Für diese Verbindungen könnte durch Etablierung geeigneter Mikroorganismenpopulationen eine wesentliche Entfrachtung des Abwassers und damit eine deutliche Entlastung der Umwelt erzielt werden.

Für eine gezielte Integration von eingesetzten Spezialisten oder gentechnisch optimierten Organismen in die mikrobielle Population eines Biofilmes ist die bewußte Gestaltung des Systems Träger-Biofilm-Substrat eine wesentliche Voraussetzung. In der vorliegenden Arbeit wurden deshalb an ausgewählten Modellsystemen die Wechselwirkungen von verwerteten Substraten, der Oberflächenstruktur der Mikroorganismen und den Eigenschaften der verwendeten Trägermaterialien in ihrer Abhängigkeit von verschiedenen äußeren Faktoren untersucht. Dabei bestand das Ziel der Arbeiten darin, mindestens für solche Systeme, die mit den charakterisierten vergleichbar sind, Voraussagen über deren Leistungsfähigkeit und Prozeßstabilität zu ermöglichen bzw. Kriterien für die Auswahl geeigneter Trägermaterialien zu definieren. Verschiedene der optimierten Träger-Biofilm-Systeme wurde mit natürlichen Medien oder unter technischen Bedingungen hinsichtlich ihre Leistungsfähigkeit getestet.

2. Definition

Biofilme entstehen, wenn Mikroorganismen sich an Grenzflächen anlagern und dort wachsen [2. 2]. Sie bestehen aus funktionalen bakteriellen Konsortien, welche in eine Matrix aus extraplastidären Substanzen (EPS), der Glycocalyx eingelagert sind und aneinander und/oder an Oberflächen oder Grenzflächen haften [2. 1]. In die Glycocalyx können gleichermaßen weitere gelöste oder partikuläre Stoffe eingelagert sein.

Entsprechend dieser Definition können auch mikrobielle Aggregate (z.B. Belebtschlammflocken) und mikrobielle Populationen Innerhalb der Porenräume poröser Medien im weiteren Sinne als Biofilme betrachtet werden.

3. Die Bedeutung von Biofilmen in Natur und Technik

Die sessile Lebensweise, also das Wachstum auf abiotischen oder biotischen Oberflächen ist die älteste bislang bekannte Daseinsweise von Leben auf der Erde [3. 30]. Die ersten bekannten Funde datieren etwa 3,5 Mrd. Jahre zurück und sie zeigen versteinerte Biofilme in stromatolitischen Gesteinsformationen [3. 73]. Im weiteren Verlauf der Erdgeschichte haben sich im mikrobiellen Bewuchs von Oberflächen, den „microbial mats“ Mikroorganismen entwickelt, die zu einfachen Formen der Photosynthese befähigt waren. Sie werden für die Umstellung der Erdatmosphäre von anaeroben zu aeroben Verhältnissen verantwortlich gemacht [3. 81]. Durch Anheftung von Mikroorganismen an zerfallendes organisches Material und dessen teilweisen Abbau haben Biofilme auch entscheidend zur Bildung fossiler Brennstoffe beigetragen [3. 41] und wirken in geologischen Dimensionen bei der Verwitterung von Gesteinen mit [3. 24, 3. 48]. Auch heute noch spielen Microbial mats eine bedeutende Rolle z.B. bei der Fixierung von atmosphärischem CO₂ [3. 15].

In der Geschichte der Mikrobiologie wurden die Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Oberflächen erst spät erkannt. Obwohl bereits Anfang unseres Jahrhunderts erste Beobachtungen über stimulierende Effekte von Partikeln auf mikrobielles Wachstum beschrieben wurden, hat erst Zobell [3. 84] vor etwas mehr als 50 Jahren die Bedeutung des sessilen Wachstums von Mikroorganismen erkannt und begonnen, dieses systematisch zu untersuchen. In der klassischen Mikrobiologie wurde das sogenannte „Wandwachstum“ bei der submersen Kultivierung von Mikroorganismen eher als Störung betrachtet und blieb lange Zeit ein Randgebiet der mikrobiologischen Forschung [3. 30]. Daß die so entstandenen Biofilme andere Eigenschaften aufweisen als die üblicherweise verwendeten Suspensionskulturen, wurde lange Zeit wenig beachtet.

Erst in den sechziger und siebziger Jahren nahm das Interesse an der Erforschung des mikrobiellen Lebens in Biofilmen deutlich zu. An dieser Entwicklung haben vor allem zwei Forschungsgebiete wesentlichen Anteil. Dies waren zum einen die Forderungen nach geeigneten Methoden zur Eliminierung bakterieller Beläge im medizinischen und zahnmedizinischen Bereich und zum anderen die neuen Anforderungen an die Leistungsfähigkeit umwelttechnischer Verfahren.

In unserer heutigen Umwelt sind Biofilme ubiquitär. Es gibt praktisch keine Oberfläche, die nicht von Mikroorganismen besiedelt wird oder – unter geeigneten Bedingungen – besiedelt werden kann. Es sind auch keine Werkstoffe bekannt, die dauerhaft einer mikrobiellen Besiedelung widerstehen [3. 12]. Die Voraussetzungen für die Existenz von Biofilmen sind gering: Grenzflächen, Mikroorganismen, hinreichende Feuchtigkeit und Nährstoffe [3. 30]. Entsprechend weit ist die Spannweite der Existenzbedingungen für Mikroorganismen in Biofilmen. Auch extreme und eher lebensfeindliche Lebensräume können besiedelt werden. Einen Überblick über die Bedingungen, unter denen mikrobielles Leben angetroffen wird, gibt Flemming [3. 32] (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Spannweite mikrobieller Existenz in Biofilmen nach Flemming [3. 32]

Milieufaktor	Spannweite
Temperatur	von -12°C (kalte salzhaltige Lösungen) bis >110°C (heiße Schwefelquellen im Meer)
pH-Bereich	von 0 (<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>) bis >13 (<i>Plectonema nostocoum</i> , Natronbakterien)
Hydrostatischer Druck	von 0 bis > 1400 bar („barophile Bakterien“)
Redoxpotential	von – 450 mV (methanogene Bakterien) bis +850 mV (Eisenbakterien)
Salinität	von 0 (aqua bidest.) bis zu gesättigten Salzlösungen (obligat halophile Bakterien in Salzseen)
Nährstoffangebot	von > 10 µg/l C _{org.} (Systeme mit hochreinem Wasser) bis Leben direkt auf Nährstoffquellen
Oberflächenmaterialien	Metalle, Beton, Kunststoffe, Glas, Mineralien, Öle, pflanzliche und tierische Gewebe
Strahlenbelastung	Biofilme auf Quarzhüllen von UV-Lampen Biofilme auf radioaktivem Material (> 500 krad)
Biozidkonzentrationen	>2 mg/l freies Chlor Biofilme in Desinfektionsmittelleitungen

Biofilme spielen eine entscheidende Rolle bei der Selbstreinigung von Gewässern und Böden. In aquatischen Ökosystemen sind Mikroorganismen die ersten, die neue Habitate kolonisieren. Ihnen folgen Mikroalgen und Invertebraten.

In Auswertung detaillierter Analysen von zahlreichen aquatischen Systemen kamen Costerton et al. [3. 20] zu dem Ergebnis, daß in nahezu allen natürlichen Ökosystemen Biofilme die dominante Daseinsweise des mikrobiellen Lebens sowohl im Hinblick auf die Zahl der Organismen, als auch hinsichtlich ihrer metabolischen Aktivität darstellen. Der weitaus größte Teil der Mikroorganismen auf der Erde lebt offensichtlich an Oberflächen gebunden, und zwar im Boden, in Sedimenten, in Gesteinsporen und auf Schwebstoffen im Wasser. Auch in der Grenzflächenschicht zwischen Wasser und Luft bilden sich Biofilme in Form von Microlayer, Kamnhäuten oder Schwimmschichten.

Das Leben in Biofilmen bietet für Mikroorganismen offensichtlich eine Reihe von Vorteilen gegenüber der Existenz als Einzelorganismen in suspendiertem Zustand. So können in der gelartigen Matrix Nährstoffe angereichert werden. Gleichzeitig bietet der Biofilm einen gewissen Schutz vor hydraulischen Belastungen, pH-Schwankungen, osmotischem Streß und Bioziden. Die Existenz verschiedener Organismen auf engem Raum und in engem Kontakt bildet einen Pool genetischer Information mit der Möglichkeit zum Gentransfer. Die vorhandenen Mikrokonsortien sind zur konzertierten Aktion verschiedener Spezialisten z.B. bei der Nutzung schwer abbaubarer Substrate befähigt. Gleichzeitig können für bestimmte Gruppen ökologische Nischen durch lokal veränderte Umweltbedingungen (z.B. anaerobe Bereiche in tieferen Biofilmschichten) entstehen. Zonen verminderter Diffusion verhindern einen schnellen Abtransport abbaubarer Stoffwechselprodukte, die dann als Nährstoffe für andere Bakterienarten zur Verfügung stehen. Auch der Verlust extrazellulärer Enzyme an die Wasserphase wird durch das Vorhandensein der EPS vermindert. Verschiedentlich wurde auch die Fixierung und Stabilisierung extrazellulärer Enzyme in der Biofilmmatrix beschrieben [3. 34].

Besonders unter oligotrophen Bedingungen stellt die Bildung von Biofilmen eine wichtige Überlebensstrategie dar. Auch heute noch können viele natürliche Wässer weltweit als oligotroph bezeichnet werden, d.h. sie haben einen Nährstofffluß von weniger als $1 \text{ mg C}_{\text{org.}} / \text{l} \cdot \text{d}$. Die Besiedelung von Oberflächen unter solchen oligotrophen Bedingungen erfolgt in einer charakteristischen zeitlichen Abfolge. Zuerst siedeln sich wenige anspruchslose Arten (wie z.B. einige Pseudomonaden) [3. 30] an und bilden einen Biofilm. Durch ihre Fähigkeit, dem Medium Nährstoffe zu entziehen, diese in der Gelmatrix lokal zu akkumulieren und sie durch Zellwachstum im Biofilm zu fixieren, bieten sie mit der Zeit auch solchen Arten eine ökologische Nische, die unter dem vorhandenen Nährstoffangebot sonst nicht wachsen könnten. Diese leben dann als Destruenten von der Biomasse der ursprünglichen Flora [3. 12].

Ein klassisches Beispiel für die Ausbildung von Biofilmen in natürlichen aquatischen Medien ist der Bewuchs an Schiffsrümpfen. Der mikrobielle Biofilm bildet hier die entscheidende Voraussetzung für die Ansiedlung von höheren Organismen, wie Algen

oder Muscheln. Da die Erhöhung des Reibungswiderstandes durch den Bewuchs zu erheblichen Einbußen bei der Geschwindigkeit bzw. zu entsprechenden Mehraufwendungen für Treibstoff führt [3. 14], wurden in der Vergangenheit erhebliche Anstrengungen unternommen, um den Oberflächen der Schiffsrümpfe weitgehend antibakterielle Eigenschaften zu verleihen. Dazu wurden den Anstrichen vor allem bakterizide Substanzen, wie Tributylzinn (TBT) beigemischt. Wie Ergebnisse aktueller Untersuchungen zeigen, blieb der Einsatz dieser Bakterizide insbesondere bei TBT jedoch nicht ohne Auswirkungen auf die natürliche Umwelt [3. 62, 3. 82]. Die Suche nach Alternativen besitzt daher gerade auf diesem Gebiet eine hohe aktuelle Brisanz.

Auch in höchst oligotrophen Umgebungen, wie bidestilliertem Wasser und Reinstwasseranlagen werden Mikroorganismen in Form von Biofilmen festgestellt [3. 58]. Die Entwicklung von Biofilmen in solchen Anlagen kann zu erheblichen Störungen und zu Einschränkungen der Wasserqualität führen. Diese unerwünschte Ausbildung von mikrobiellen Belägen wird allgemein als „Biofouling“ bezeichnet [3. 13]. Biofouling tritt in allen Wasser führenden Systemen auf und kann zur Beeinträchtigung von Gewinnung, Aufbereitung, Transport, Lagerung und Nutzung von Wasser beitragen [3. 33]. Durch Biofouling wird die Leistungsfähigkeit von Anlagen verringert und die Lebensdauer von Anlagenteilen z.T. erheblich verkürzt. So können Biofilme in Rohrleitungen durch Erhöhung des Reibungswiderstandes und Verminderung der Querschnittsfläche deren Transportkapazität wesentlich vermindern. Der dabei auftretende Bewuchs erreicht eine Dicke von teilweise mehreren Zentimetern und kann bei geringen Querschnitten auch zum vollständigen Verschließen von Rohrleitungen und Schläuchen führen. Durch abgerissene Biofilmteile und Belege entstehen zusätzlich ernste Sicherheitsprobleme durch Verstopfungen an Pumpen, Ventilen und Grenzwertgebern [3. 66, 3. 68].

Auf Grund ihrer Struktur beeinträchtigen Biofilme auch die Effektivität von Wärmetauschern. Dabei macht sich nicht nur der höhere Reibungswiderstand bemerkbar. Durch Verringerung des konvektiven Wärmetransportes hin zur Metalloberfläche wird auch der Wärmeaustausch mit der Umgebung erheblich eingeschränkt [3. 16].

Besondere Aufmerksamkeit erlangte das Problem des Biofouling bei Ultrafiltrations- und Umkehrosmoseanlagen. Die Ausbildung gelartiger Biofilmschichten auf der Membran verhindert hier die direkte tangentielle Anströmung der Oberfläche. Dadurch kommt es zu einer Konzentrationspolarisation auf der Rohwasserseite, wodurch der transmembrane Druck ansteigt, die Permeatausbeute sinkt und schließlich auch die Salzurückhaltung verschlechtert wird [3. 69]. Mikrobielle Beläge auf Membranen können bis zur vollständigen und irreversiblen „Verblockung“ führen.

Die Ausbildung von Biofilmen führt jedoch nicht nur zur Einschränkung der Funktion technischer Anlagen. Mikrobielle Beläge sind in vielen Fällen auch direkt an der Alterung und Zerstörung der von ihnen besiedelten Materialien beteiligt. Die Eigenschaft von Biofilmen, Wasser zu binden, Stoffwechselprodukte (z.B. organische und anorganische Säuren, Chelat- und Komplexbildner, Exoenzyme) zu erzeugen und u.U. auch Bestandteile ihrer Unterlage als Nährstoff zu verwenden, führt regelmäßig zu erheblichen Schäden an Kunststoffen, mineralischen Baumaterialien und Metallen. So können Mikroorganismen durch den Abbau von Polymerbestandteilen und Zusätzen (z.B. Weichmachern) zur Alterung und Versprödung von Kunststoffen beitragen [3. 10]. Auch die Bildung von verschiedenen Säuren durch Mikroorganismen kann Schädigungen von Kunststoffen verursachen [3. 1].

Die Bildung von Säuren ist gleichfalls eine wesentliche Ursache für mikrobiell verursachte Schäden an mineralischen Werkstoffen. Auf der Oberfläche der Baustoffe können sich epilithische Biofilme ausbilden, die durch Nährstoffe aus der Luft versorgt werden. Durch Ausscheidung von anorganischen (lithoautotrophe Bakterien) bzw. organischen Säuren (chemoorganotrophe Mikroorganismen) wird dabei karbonatisches Bindematerial aufgelöst und so das Gesteinsgefüge geschwächt [3. 71]. Von den anorganischen Säuren sind dabei vor allem Schwefelsäure und Salpetersäure von Bedeutung. Als Verursacher der Bildung von Schwefelsäure wurden hauptsächlich Organismen der Gattung *Thiobacillus* [3. 72] identifiziert. Die Akkumulation von Salpetersäure erfolgt durch verschiedene Nitrifikanten wie *Nitrosomonas*, *Nitrosovibrio* und *Nitrobacter* [3. 5]. Als wichtige organische Säuren wurden u.a. Acetat, Gluconat, Oxalat, Citrat und Succinat festgestellt. Die chelatisierende Wirkung vieler organischer Säuren und die Ausscheidung weiterer komplexbildender Substanzen (z.B. Aminosäuren und Zuckersäuren) führt zusätzlich zu einer Mobilisierung von Metallen, wodurch die Stabilität der Baumaterialien weiter geschwächt wird.

Die mineralzerstörende Wirkung von Biofilmen beschränkt sich jedoch nicht nur auf die Oberfläche der betroffenen Materialien. Mit Hilfe der EPS füllen Biofilme auch die Porenräume von Gesteinen und Mineralien aus und reichern so in der Tiefe des Materials Wasser an, welches bei Temperaturänderungen zu starken mechanischen Beanspruchungen führt [3. 31].

Biofilme sind in erheblichem Umfang auch an der Korrosion von Metallen beteiligt. Diese Wirkungen werden als mikrobiell induzierte Korrosion (MIC) oder Biokorrosion bezeichnet. Die MIC kann nahezu alle Metalle betreffen, einschließlich der als bakterientoxisch bekannten Schwermetalle. Außer Titan und Nickel-Cadmium ist praktisch kein Metall gegen Korrosion unter der Einwirkung von Mikroorganismen resistent [3. 31].

Korrosion ist kein primär mikrobieller Prozeß, sondern sie findet auch ohne das Zutun von Mikroorganismen unter abiotischen Bedingungen statt. Dabei werden Atome der Metalloberfläche durch elektrochemische Grenzflächenprozesse in ionische Form überführt. Die ablaufenden Reaktionen werden durch lokale Heterogenitäten, durch Redoxverhältnisse, durch den pH-Wert, durch die Konzentration an Elektrolyten und die Weiterreaktion primärer Korrosionsprodukte beeinflusst. Diese Faktoren können jedoch durch mikrobielle Aktivitäten maßgeblich verändert werden. Die Struktur der gelartigen Beläge auf der Metalloberfläche ermöglicht die Bildung von Diffusionsbarrieren und Konzentrationszellen für Stoffwechsel- und Korrosionsprodukte. Damit können Mikroorganismen Korrosion induzieren. Sie greifen jedoch auch in die Kinetik der Korrosionsprozesse ein [3. 9, 3. 33]. Die dabei ablaufenden Mechanismen sind je nach Umweltbedingungen und beteiligten Organismen unterschiedlich.

Eine bedeutende Rolle bei der Biokorrosion spielen sulfatreduzierende Bakterien. Sie gelten als Leitorganismen für das Vorliegen von MIC. Sulfatreduzierende Bakterien produzieren in großem Umfang Sulfide, welche durch Ausfällung von schwerlöslichen Metallsulfiden die anodische Dissoziation der Metalle beschleunigen [3. 63]. Die gleichzeitig entstehenden H^+ Ionen bewirken eine kathodische Depolarisation. Durch das Vorhandensein von Biofilmen wird zusätzlich die Kathodenoberfläche erheblich vergrößert. Die damit verbundene Erhöhung der Stromdichte an der Anode beschleunigt die Korrosion. Bei der korrosiven Wirkung der Sulfatreduzierer wird das Zusammenwirken verschiedener Organismen in mikrobiellen Konsortien besonders deutlich. Die sulfatreduzierenden Bakterien (z.B. der Gattungen *Desulfibrio*, *Desulfobacter*) sind obligat anaerob. Viele Arten weisen zusätzlich ein begrenztes Nährstoffspektrum auf (bevorzugt kurzkettige organische Säuren und Alkohole). Sie sind deshalb in hohem Maße abhängig von anderen Organismen des Biofilmes, welche geeignete organische Nährstoffe bereitstellen und benötigen für ihre Entwicklung eine intakte Biofilmstruktur, die den notwendigen Stoffaustausch ermöglicht [3. 23].

Auch säurebildende Bakterien verursachen MIC. Durch starke lokale pH-Absenkung im Biofilm wird die kathodische Reduktion von Wasserstoffionen stark begünstigt. Zusätzlich besitzen organische Säuren eine komplexierende Wirkung auf die Metallionen und beschleunigen so die anodische Depolarisierung.

Komplexierende Eigenschaften besitzen auch verschiedene Bestandteile der EPS (z.B. einige saure Polysaccharide). Durch die unterschiedliche Wirkung der EPS verschiedener Organismen können Konzentrationsgradienten der Metallionen an der Metalloberfläche entstehen. Die Strukturiertheit des Biofilmes ermöglicht auch Gradienten der Sauerstoffkonzentration, des Redoxpotentials und von verschiedenen Korrosions-

produkten. Damit werden Voraussetzungen für die Korrosion auch widerstandsfähiger Materialien wie Kupfer und einiger Edelstähle geschaffen [3. 3].

Neben technischen Problemen können Biofilme insbesondere bei Trinkwasser auch die ästhetische oder gar die hygienische Qualität des Produktes beeinträchtigen. Mikroorganismen, die in geringer Zahl bei der Herstellung im Wasser verbleiben, siedeln sich an Rohrleitungswänden an und bilden Biofilme [3. 59, 3. 60]. Diese Biofilme erwiesen sich in vielen Fällen als Habitat für verschiedene pathogene Keime [3. 52, 3. 32]. So wurden u.a. Mycobakterien, Klebsiellen, Legionellen, sowie E. coli bzw. coliforme Keime in mikrobiellen Belägen von Trinkwasserleitungssystemen nachgewiesen [3. 31, 3. 45]. Jedoch tragen auch nicht pathogene Organismen durch kontinuierliche Abgabe oder stoßweisen Abriß von Belagfetzen zur Minderung der Wasserqualität bei.

Um den Aufwuchs von Mikroorganismen während des Transportes in Trinkwasserleitungen zu begrenzen, werden dem Wasser häufig antibakterielle Wirkstoffe, z.B. Chlor beigemischt [3. 38]. Die Minderung von Belägen oder auch die Beseitigung von pathogenen Organismen in Trink- und Brauchwasserleitungen wird jedoch erheblich erschwert durch die Tatsache, daß Bakterien in Biofilmen in vielen Fällen eine wesentlich höhere Resistenz gegenüber bakteriziden Wirkstoffen aufweisen als planktonisch lebende Organismen der gleichen Art. So fanden LeChevallier et al. [3. 51] in Biofilmen eine bis zu 3000fach höhere Resistenz gegenüber freiem Chlor als bei vergleichbaren Organismen in freier Suspension. Diese herausragende Resistenz gegenüber den verschiedensten antimikrobiellen Agenzien ist seit langem bekannt und vielfach beschrieben worden [3. 38, 3. 53, 3. 67]. Sie wird durch eine Reihe unterschiedlicher Mechanismen bedingt, die sich aus der Struktur des Biofilmes und seiner heterogenen Zusammensetzung ergeben [3. 35]. Einen Überblick über die verschiedenen Wirkmechanismen geben Foley und Gilbert [3. 35]. Sie werden im wesentlichen durch zwei Modelle widergespiegelt. Dies ist zum einem das sogenannte Reaktions-Diffusions-Modell [3. 18, 3. 78]. Dieses Modell geht davon aus, daß antibakterielle Wirkstoffe auf ihrem Weg durch den Biofilm aufgrund einer verminderten Diffusionsgeschwindigkeit im Vergleich zur freien Wasserphase wesentlich langsamer transportiert werden. Gleichzeitig können sie während des Transportes sukzessive abgebaut oder deaktiviert werden. Dabei wird die Beteiligung von extrazellulären Polysacchariden und Exoenzymen diskutiert [3. 35, 3. 39]. Das verwendete Modell schließt auch die feste Adsorption der Wirkstoffe an Biofilmkomponenten ein.

Eine andere Theorie geht davon aus, daß durch die räumliche Heterogenität im Biofilm auch der Wachstumszustand der einzelnen Zellen deutlich variiert. Viele Organismen

weisen darüber hinaus deutlich geringere Wachstums- und Vermehrungsraten auf, als in suspendierter Kultur. Auch völlig inaktive Zellen können vorhanden sein. Demzufolge sind auch die Umsatzraten mit antimikrobiellen Substanzen teilweise stark vermindert, wodurch die Einwirkzeiten für eine ausreichende Wirkung deutlich verlängert werden.

Die erhebliche Resistenz von Bakterien in Biofilmen führt in zunehmendem Maße zu medizinischen Problemen. Seit längerem bekannt ist die Übertragung von Infektionskrankheiten durch Ansiedlung von pathogenen Organismen (z.B. *Legionella pneumophila*) in wasserführenden Armaturen [3. 70]. Intensiv diskutiert wird die Bedeutung von Biofilmen auch für die Etablierung und Ausbreitung von antibiotikaresistenten Bakterienstämmen in medizinischen Einrichtungen. Das Vorhandensein eines subinhibitorischen Levels antibiotischer Wirkstoffe in der Tiefe des Biofilmes erzeugt einen Selektionsdruck auf die Organismen, welcher letztendlich zur Entwicklung resistenterer Phänotypen, sowie zur Selektion und Expression von Resistenzplasmiden beiträgt [3. 35]. Durch diese Selektion antibiotikaresistenter Typen erlangen auch bisher als harmlos geltende Bakterienarten klinische Relevanz. Biofilme auf Implantaten, Prothesen oder Kathedern führen zu chronischen Infektionen und Bakteraemien. Solche „Biofilminfektionen“ können in vielen Fällen aufgrund der erhöhten Resistenz auch durch solche Antibiotika nicht behandelt werden, die für diese Bakterien in Suspension eine ausreichende Wirksamkeit zeigen [3. 19].

Besondere Aufmerksamkeit erlangten Biofilme im Zusammenhang mit der Entstehung des dentalen Plaques in der Zahnmedizin. Bereits frühzeitig wurde der Zusammenhang von mikrobiellen Ablagerungen auf der Zahnoberfläche und der Entstehung von Karies erkannt. Entsprechend hoch ist der Anteil, den Forschungsarbeiten über die Entstehung von Biofilmen auf Zahnoberflächen zum Verständnis der Biofilmbildung allgemein beigetragen haben [3. 8].

Die Beschäftigung mit der Entstehung und Struktur von Biofilmen wurde in der Vergangenheit vor allem durch zwei Forschungsgebiete geprägt. Dies waren zum einen die bereits dargestellten unerwünschten Wirkungen mikrobieller Ablagerungen. Zum anderen werden Biofilme aber auch seit mehreren Jahrzehnten erfolgreich und in zunehmendem Maße in der Umwelttechnologie eingesetzt. Gerade jene Eigenschaften, die bei unerwünschten Biofilmen zu erheblichen Problemen führen, ermöglichen in der biotechnologischen Anwendung herausragende Leistungen.

Ein wesentlicher Vorteil wurde zunächst in der vergleichsweise einfachen Entkopplung von hydraulischer Verweilzeit des Substrates und der mittleren statistischen Verweilzeit

der Mikroorganismen, dem Schlammalter, gesehen [3. 17]. Häufig wird dabei auch eine absolute Erhöhung der Biomassedichte diskutiert [3. 6, 3. 27, 3. 29]. Jedoch ist gerade bei Hochleistungsanlagen die absolute Biomassekonzentration in den Reaktoren in vielen Fällen vergleichbar oder gar geringer als bei konventionellen Anlagen mit suspendierten Organismen [3. 65, 3. 77, 3. 79]. Hohe Biofilmdicken ($>100\ \mu\text{m}$) erwiesen sich wegen der verminderten Nährstoffversorgung in der Tiefe des Filmes, wegen des erhöhten Diffusionswiderstandes [3. 2, 3. 74] und der möglichen Verblockung freier Strömungskanäle [3. 83] sogar eher als nachteilig für die Leistungsfähigkeit der Reaktoren. Aber auch bei vergleichbaren Biomassekonzentrationen werden mit Biofilmreaktoren z.T. erheblich größere Raum-Zeit-Ausbeuten erzielt, als dies mit konventionellen Belebtschlammanlagen der Fall ist [3. 22, 3. 46]. Dies ermöglicht die Realisierung kompakterer Bauformen mit geringerem Raumbedarf und z.T. auch verminderten Kostenaufwendungen. In verschiedenen Fällen wurden überlastete und erweiterungsbedürftige Abwasserbehandlungsanlagen durch den Einsatz von Biofilmträgern stabilisiert und damit die Leistungsfähigkeit der vorhandenen baulichen Substanz ohne nennenswerte zusätzliche Kosten deutlich erhöht [3. 25, 3. 75].

Hohe Raum-Zeit-Ausbeuten wurden mit trägerfixierten Organismen auch auf dem Gebiet der weitergehenden Abwasserbehandlung, insbesondere bei der biologischen Stickstoffelimination mittels Nitrifikation und Denitrifikation beschrieben. So erzielten Garrido et al. [3. 37] mit einem Biofilm-Airlift-Suspensions-Reaktor eine mehr als 99%ige Ammoniumoxidation bei einer Raumbelastung von $5\ \text{kg}/\text{m}^3\cdot\text{d}$. Ein von McDonald [3. 57] untersuchter Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor im technischen Maßstab ($7500\ \text{m}^3/\text{d}$) wurde für eine N-Eliminationsleistung von $3\ \text{kg}/\text{m}^3\cdot\text{d}$ ausgelegt und erreichte bei dieser Belastung stabil eine Nitrat-Elimination zwischen 95 % und 100 %. Im Vergleich mit konventionellen Systemen, die N-Eliminationsraten von kaum mehr als $0,2\ \text{kg}/\text{m}^3\cdot\text{d}$ erreichen, ergibt sich somit für diese konkrete Anlage eine Leistungssteigerung auf das 10-15fache.

Obwohl die Prozesse Nitrifikation und Denitrifikation sehr unterschiedliche Umweltbedingungen verlangen und deshalb normalerweise räumlich oder zeitlich getrennt realisiert werden, wurden Biofilme auch bereits für eine recht effektive quasi simultane Prozeßführung verwendet, bei der Nitrifikation und Denitrifikation gleichzeitig, jedoch in unterschiedlichen Kompartimenten des gleichen Biofilmpartikels ablaufen [3. 11].

Besondere Beachtung erlangten Biofilmtechnologien für den Abbau von Verbindungen, die unter konventionellen Bedingungen als biologisch schwer oder nicht abbaubar gelten [3. 76]. Da viele dieser Substanzen nur durch das Zusammenwirken verschiedener Organismenarten mineralisiert werden können, besitzen Biofilme gerade auf diesem

Gebiet besondere Vorteile. Die Ausbildung hochspezialisierter Mikrokonsortien erlaubt ein enges und konzertiertes Zusammenwirken unterschiedlicher Mikroorganismen beim Abbau solcher persistenter Verbindungen. So wurden u.a. für heterozyklische Aromaten [3. 44] oder auch polycyklische aromatische Kohlenwasserstoffe (PAH) [3. 47] mit Biofilntechnologien deutlich bessere Abbauleistungen erzielt, als mit konventionellen Verfahren. Auch zahlreiche andere wäßrige Medien mit persistenten Inhaltsstoffen, wie Sickerwasser aus Deponien, Abwässer der chemischen Industrie oder kontaminierte Grundwässer können durch Verwendung immobilisierter Organismen mit hoher Effektivität behandelt werden [3. 43, 3. 54, 3. 55].

Für die technische Anwendung von Interesse ist neben der hohen Leistungsfähigkeit der Technologie auch die herausragende Stabilität gegenüber sogenannten Stoßbelastungen, die durch extreme Anstiege der Substratkonzentration oder schnelle Änderungen der Zusammensetzung des Substrates, aber auch durch Einträge toxischer Stoffe oder starke pH-Schwankungen verursacht werden können [3. 4, 3. 40, 3. 50].

Biofilme gewährleisten nicht nur das Zusammenwirken unterschiedlicher Organismen in Form von Mikrokonsortien, sondern sie ermöglichen auch die nahezu simultane Kombination des biologischen Abbaus mit anderen, insbesondere chemischen und physiko-chemischen Wirkmechanismen. So schafft die adsorptive Anreicherung von Substraten die Voraussetzung dafür, daß auch Verbindungen aus vergleichsweise gering konzentrierten Lösungen mit genügend hohen Umsatzraten abgebaut werden können [3. 49, 3. 64]. An dieser adsorptiven Bindung von Substraten können sowohl die Biofilmmatrix selbst [3. 21], wie auch die eingesetzten Trägermaterialien [3. 42] beteiligt sein. Das hohe Adsorptionsvermögen für gering konzentrierte Substrate ist z.B. eine wichtige Voraussetzung für die Verwendung von Biofilmprozessen in der Abluftreinigung, wo z.B. Biofilter seit vielen Jahren zum Stand der Technik bei der Eliminierung organischer Schadstoffe gehören [3. 80].

Ein weiterer wichtiger Vorteil der Kopplung von Adsorption und biologischem Abbau ist die vergleichsweise hohe Geschwindigkeit, mit der Schadstoffe durch Adsorption gebunden werden können. Damit ermöglicht die adsorptive Bindung gerade in Abluftströmen, wo allgemein hohe Durchsätze bei geringer Konzentration der Inhaltsstoffe zu beherrschen sind, die erforderlichen kurzen Kontaktzeiten. Die zunächst adsorptiv gebundenen Schadstoffe können anschließend durch die wesentlich langsameren mikrobiellen Abbauprozesse mineralisiert werden.

Auch katalytische und biokatalytische Umsetzungen sind in Biofilmen möglich. Dies kann sowohl durch extrazelluläre Enzyme erfolgen, welche in die Biofilmmatrix ausgeschieden

werden, aber auch durch den gezielten Einsatz katalytisch aktiver Trägermaterialien [3. 56].

Auf Grund ihrer guten adsorptiven Eigenschaften eignen sich Biofilme auch für den Einsatz als Biosorber für nicht abbaubare Verbindungen. Dabei kommen sowohl Mechanismen der passiven Biosorption [3. 61], wie auch aktive Biosorptionsprozesse [3. 36] in Betracht. Durch Biosorption können z.T. erhebliche Anreicherungen realisiert werden. So erreichten Morper und Fürst [3. 61] mit einer anaeroben Schlammbettenanlage eine Kupferanreicherung auf bis zu 20 % der Biomasse. Bei eigenen Untersuchungen wurden mit einem Wirbelschichtreaktor für Blei Anreicherungen von bis zu 100 mg/g BTS festgestellt [3. 26]. Auch in der technischen Anwendung hat sich dieses Verfahren z.B. für die Rückgewinnung edler Metalle in der Mikroelektronik bewährt [3. 61].

Für die technische Umsetzung von Biofilmverfahren stehen eine Reihe von unterschiedlichen Prinzipien zur Verfügung. Der vermutlich älteste technisch genutzte Biofilmprozeß ist der Festbettreaktor in Form von Tropfkörpern. Auch Tauchkörper in Form von Scheiben oder Walzentauchkörpern sind seit mehreren Jahrzehnten im Einsatz. Leistungsfähiger aber mit größerem steuer- und regelungstechnischem Aufwand zu betreiben sind Wirbelschichtreaktoren und Airliftreaktoren. Für einzelne Aufgaben werden auch Membranreaktoren oder Verfahren unter Verwendung der Einschlußimmobilisierung verwendet. Einen Überblick über den aktuellen Stand geben Brower und Barford [3. 7], sowie Fitch et al. [3. 28].

4. Prinzipien für die Immobilisierung von Mikroorganismen

Die technische Nutzung der Leistungen immobilisierter Mikroorganismen setzt voraus, daß diese gezielt an Oberflächen gebunden werden können und stabile mikrobielle Populationen für die Realisierung der gewünschten Prozesse bereitgestellt werden. Dafür stehen grundsätzlich mehrere verschiedene Prinzipien zur Verfügung. Einen Überblick über mögliche Methoden der Immobilisierung gibt Abbildung 4.1.

Die verbreitetste Form der Immobilisierung von Mikroorganismen ist die Anlagerung an Oberflächen oder in den Poren der Trägermaterialien. Jedoch können Mikroorganismen auch durch Einschluß in geeigneten Materialien immobilisiert werden. Wachsende Bedeutung erlangt die Zellrückhaltung durch den Einsatz von Membranen. Letztlich stellen auch mikrobielle Zellaggregate und Belebtschlammflocken eine Form der Immobilisierung für Mikroorganismen dar. Einen Überblick über die Leistungen, welche mit unterschiedlichen Verfahren erzielt werden, geben u.a. Fitch et al. [4. 4]

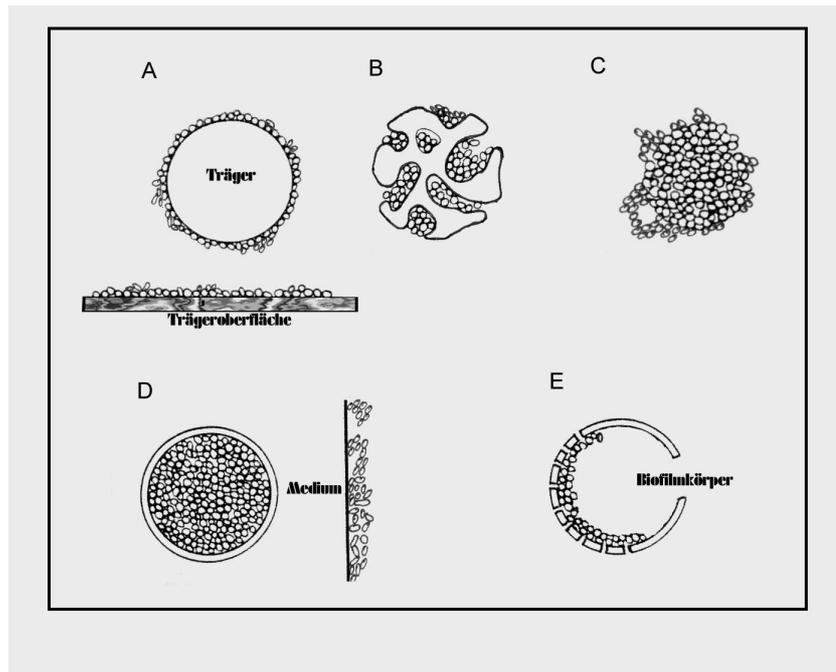


Abbildung 4.1: Die grundlegenden Prinzipien für die Immobilisierung von Mikroorganismen

- A: Oberflächenimmobilisierung
- B: Immobilisierung in porösen Matrices
- C: Mikrobielles Zellaggregat
- D: Einschlußimmobilisierung bzw. Zellrückhaltung durch Barrieren
- E: Hydrodynamische Zellrückhaltung

4.1 Oberflächenimmobilisierung

Das Prinzip der Oberflächenimmobilisierung ist in der Umwelttechnik weit verbreitet und bildet die Grundlage für eine Reihe von Biofilmsystemen. Diese Technologien nutzen den spontan ablaufenden Prozeß der Adsorption von Mikroorganismen an natürliche oder synthetische Oberflächen (vgl. Abbildung 4.1.A). Die oberflächenimmobilisierten Organismen stehen in unmittelbarem Kontakt mit ihrer Umgebung, eventuell vermittelt durch die Biofilmmatrix oder andere Organismen des Biofilmes. Dies ermöglicht einerseits einen hohen Stoffaustausch zwischen den Organismen und dem sie umgebenden Medium, bedingt aber auch einen regelmäßigen Austrag von Organismen, entweder durch Ablösung einzelner Zellen oder durch Abscheren ganzer Aggregate. Systeme mit Oberflächenimmobilisierung sind somit wenig geeignet, wenn ein zellfreier Ablauf gefordert wird.

Neben der Umwelttechnik liegt ein weiteres Hauptanwendungsgebiet der Oberflächenimmobilisierung auf dem Gebiet der tierischen [4. 8] und pflanzlichen [4. 10] Zellkulturen. Insbesondere für viele tierische Zellen ist die Anheftung an Oberflächen eine zwingende Voraussetzung für normales Wachstum. Jedoch ist die Möglichkeit des

intensiven und effektiven Stoffaustausches eine wichtige Voraussetzung für die erfolgreiche Kultivierung. Deshalb gewinnt neben der traditionellen Kultivierung in Kulturflaschen vor allem der Einsatz sogenannter „Mikrocarrier“ zunehmend an Bedeutung. Das Wachstum der Zellen erfolgt dabei auf inneren Partikeln von 100 bis 200 µm Durchmesser, die als Aufwuchskörper für die Zellkulturen eingesetzt werden. Dabei kommt der Struktur der Carrieroberfläche eine wesentliche Rolle zu [4. 8].

In der Vergangenheit sind auch verschiedene Versuche unternommen worden, Zellen auf chemischem Wege an Oberflächen zu binden, beispielsweise durch Chelatisierung mit Metalloxiden oder kovalente Bindung mittels Glutaraldehyd. Diese Formen der Immobilisierung sind jedoch einer sehr begrenzten Anzahl von Anwendungsfällen vorbehalten geblieben.

4.2 Immobilisierung in porösen Matrices

Die Immobilisierung von Zellen ausschließlich auf der Oberfläche der Träger beinhaltet einige Nachteile. Diese bestehen zum einen darin, daß die verwendeten Partikel nur eine begrenzte Oberfläche aufweisen und damit die Einhaltung einer optimalen Biofilmdicke nur geringe Biomassekonzentrationen zuläßt. Hinzu kommt, daß vor allem die Organismen an der Oberfläche des Filmes unmittelbar der Partikelkollision, sowie einer starken hydrodynamischen und Scherbelastung ausgesetzt sind. Dies kann zur Schädigung von Zellen führen und begünstigt die Auswaschung vor allem schwach adsorbierter Organismen.

Deshalb kann durch den Einsatz makroporöser Trägermaterialien, wie porösen Gläsern, Keramiken, Lava oder Kohlematerialien, in vielen Fällen eine Leistungssteigerung erzielt werden [4. 6]. Makroporöse Träger ermöglichen nicht nur die Ausbildung einer deutlich größeren Biofilmoberfläche [4. 7], im Innern der Makroporen können sich auch spezialisierte Mikrokonsortien geschützt vor äußerem Scheerstreß entwickeln. Nachteilig wirkt sich dabei aus, daß die vorhandenen Makroporen mit zunehmender Besiedelung verstärkt vom äußeren Medium abgeschirmt werden und dann u.U. nur noch eingeschränkt für den Stoffaustausch zur Verfügung stehen. Eine mechanische Abtrennung von Überschussschlamm, wie dies bei oberflächlich besiedelten Trägern erfolgt, ist hier nur begrenzt möglich.

4.3 **Einschlußimmobilisierung**

Immobilisierung durch Einschluß in einen begrenzten Reaktionsraum kann auf mehreren verschiedenen Wegen erfolgen. Einerseits durch Einbettung in eine Gelmatrix und zum anderen durch Begrenzung des Reaktionsraumes mittels permeabler Membranen. Auch der Einsatz stabiler Emulsionen stellt eine Form der Einschlußimmobilisierung dar. Solche „Mikroemulsionen“ können u.a. für den Abbau stark hydrophober Substrate mit geringer Wasserlöslichkeit verwendet werden [4. 2]. Für den Einschluß in porösen Gelen wurden bisher verschiedene Materialien verwendet, die sowohl einer gewissen Bioverfügbarkeit unterliegen können (Alginat, Kollagen, Chitosan) oder widerstandsfähig gegenüber einem mikrobiellen Abbau sind (Polyacrylamid, Polyvinylalkohol – PVA, Polyurethan, Polyethylenglycol, χ -Carrageenan) [4. 5, 4. 11, 4. 12, 4. 13, 4. 14]. Beide Materialgruppen haben für bestimmte Anwendungen Vorteile oder auch Nachteile. Ein schneller Abbau des Einschlußpolymers ist vor allem dort erwünscht, wo die Immobilisierung vor allem der Konservierung einer mikrobiellen Kultur dient. Bei intensiver Vermehrung stoßen die eingeschlossenen Organismen schnell an die Grenze ihres Reaktionsraumes und können dann eher wirksam werden, wenn sie innerhalb einer kürzeren Zeit den Polymerpartikel verlassen. Häufig wird eine Einschlußimmobilisierung jedoch mit dem Ziel verwendet, besonders spezialisierte Organismen über längere Zeit in einem System zu halten. In solchen Fällen sind bioinerte Materialien von Vorteil. Wie Boley et al. [4. 1] demonstrierten, läßt jedoch auch der Einschluß in abbaustabilen Polymeren einen Austrag von Organismen in das umgebende Medium zu. Nachdem die Organismen den Raum innerhalb der verwendeten PVA-Partikel weitgehend ausgefüllt hatten, erfolgte in den beschriebenen Versuchen ein Austrag von Zellaggregaten durch Abschnürung. Die immobilisierten Organismen dienten so vor allem als Reservoir für die Bereitstellung der gewünschten Abbauleistung.

Zunehmendes Interesse erlangt der Einsatz von einschlußimmobilisierten Organismen durch die Verfügbarkeit von ausreichend stabilen Membranen für die Zellrückhaltung. In sogenannten Membranbiofilmreaktoren besiedeln die Organismen die innere Oberfläche z. B. von Hohlfasermodulen. Der Stoffaustausch erfolgt limitiert durch die Diffusion an der Membran. Zusätzlich können die Organismen über den Modulinnenraum mit fehlenden Nährstoffen versorgt werden. Durch die räumliche Trennung der Organismen von dem zu reinigenden Wasser eignet sich diese Form der Immobilisierung vor allem für den Abbau von Organika aus stark toxischen Wässern. Aber auch geringe Konzentrationen leicht flüchtiger Stoffe können erfolgreich eliminiert werden [4. 3, 4. 9].

4.4 Hydrodynamische Zellrückhaltung

Die hydrodynamische Zellrückhaltung ist eine vergleichsweise selten angewandte Methode der Immobilisierung. Bei dieser Methode werden hohle Mikropartikel mit unterschiedlich großen Öffnungen verwendet (vgl. Abbildung 4.1.E). Die mehrere μm großen Makroporen können sowohl von Bakterien wie auch von gelösten Substanzen passiert werden, während zahlreiche Mikroporen im Nanometerbereich lediglich die Passage von gelösten Verbindungen zulassen. In einer Kolonne, gefüllt mit derartigen Mikropartikeln entsteht an der Partikelinnenfläche eine hydrodynamische Druckdifferenz, welche erhebliche Anteile mitgeführter Organismen im Inneren der Partikel festhält. Nach Salter et al. [4. 11] bietet dieses Verfahren erhebliche Vorteile hinsichtlich des Strömungsverhaltens der verwendeten Reaktoren und in Bezug auf die Homogenität der Biomasseverteilung. Entsprechend wurden z.B. für die Produktion von Ethanol sehr gute Umsatzraten erzielt.

Aufgrund der aufwendigen Trägergestaltung ist die Anwendung dieser Methode jedoch eher auf Spezialfälle, wie die Herstellung kostenintensiver mikrobieller Produkte beschränkt.

4.5 Mikrobielle Zellaggregate

Im weiteren Sinne stellt auch die Bildung mikrobieller Zellaggregate eine Form der Immobilisierung von Zellen dar. Die Bildung von Belebtschlammflocken, d.h. die Anlagerung von Mikroorganismen aneinander, folgt im wesentlichen den gleichen Mechanismen wie die Immobilisierung auf einer inertierten Oberfläche. Unter einigen Bedingungen, z.B. bei der Verwendung von pulverförmiger Aktivkohle zur Verbesserung der Abbauleistung und der Schlammstruktur in der Abwasserbehandlung (PAC-Verfahren), ist eine eindeutige Trennung zwischen der Aggregation von Bakterien und der Ansiedlung auf der Oberfläche des Trägers ohnehin nicht möglich.

Die Bildung von Belebtschlammflocken erfolgt normalerweise spontan in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Mikroorganismenpopulation und den vorhandenen Umweltbedingungen. Jedoch kann die Aggregation der Organismen z.B. durch den Zusatz von Polyelektrolyten auch gezielt beeinflusst werden.

5. Entstehung und Aufbau von Biofilmen

Die Bildung eines Biofilmes auf einer inertten Oberfläche ist ein komplexer Vorgang, der von einer Reihe verschiedener Umweltfaktoren beeinflusst wird. Obwohl Biofilme sehr heterogene Systeme darstellen und hinsichtlich ihrer Zusammensetzung und Struktur eine große Variabilität aufweisen, kann für die Abfolge der Biofilmbildung ein charakteristisches Schema angegeben werden. Diese Abfolge wurde bereits Anfang der 90iger Jahre von verschiedenen Autoren beschrieben. Van Loosdrecht et al. [5. 100] geben dabei vier charakteristische Etappen für die Besiedelung einer Oberfläche an (Abbildung 5.1).

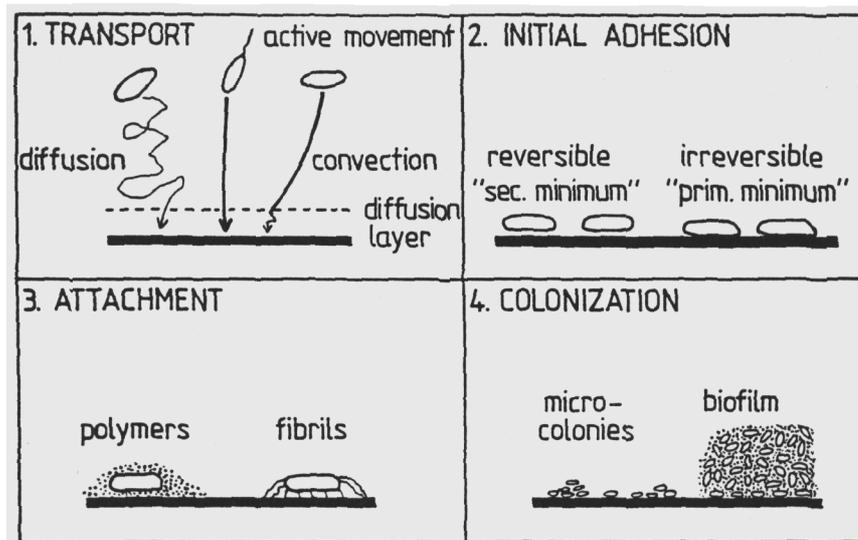


Abbildung 5.1: Verlauf der Biofilmbildung in 4 Phasen (nach van Loosdrecht et al. [5. 100]).

In einem ersten Schritt werden die Organismen zur Oberfläche hin transportiert. Dieser Transport kann durch unterschiedliche Mechanismen erfolgen. So können Mikroorganismen infolge der Brownschen Molekularbewegung durch Diffusion transportiert werden. Diese Bewegung erfolgt zwar nur langsam (ca. 40 $\mu\text{m}/\text{h}$), sie ermöglicht aber beispielsweise auch die Passage von Diffusionsgrenzschichten, in denen kein konvektiver Transport stattfinden kann. Da diese Diffusionsgrenzschichten (10-100 μm) in technischen Systemen die Ausmaße der Mikroorganismen deutlich überschreiten, ist der diffusive Transport eine wichtige Voraussetzung für die Herstellung eines direkten Kontaktes zwischen Organismen und Substratum. Dabei entsteht ein unspezifischer Kontakt von Bakterien und Oberflächen.

Um mehrere Größenordnungen schneller als die Diffusion ist der konvektive Transport infolge von Strömungen des flüssigen Mediums. Er stellt in den meisten technischen Systemen den Hauptmechanismus der mikrobiellen Fortbewegung dar. Diese Form des

Transportes ist jedoch nicht geeignet, um die unmittelbare Diffusionsgrenzschicht an der Oberfläche eines Trägers oder anderer Organismen zu passieren.

Einen bedeutenden Beitrag zum Transport von Mikroorganismen kann in ruhenden Gewässern auch die Sedimentation leisten. Schließlich verfügen viele Bakterienarten über verschiedene Zellanhänge (Fimbrien, Flagellen) die ihnen eine aktive Fortbewegung ermöglichen.

Dem Transport der Organismen zur Oberfläche hin folgt die initiale Adhäsion. Diese kann sowohl reversibel, wie auch irreversibel verlaufen und wird meist als rein physiko-chemischer Prozeß betrachtet [5. 28, 5. 103]. An die initiale Adhäsion schließt sich nach dem Modell von van Loosdrecht et al. [5. 100] eine feste, irreversible Anheftung der Zellen an die Trägeroberfläche an, die häufig durch Strukturen der Zelloberfläche, wie Fimbrien oder spezifische Polysaccharide, vermittelt wird. Die Unterscheidung zwischen dem Stadium der initialen Adhäsion und der festen Anheftung kann nach Marschall et al. [5. 52] experimentell durch Beobachtung der Brownschen Molekularbewegung getroffen werden. Im Stadium der initialen Anheftung ist danach die Brownsche Molekularbewegung deutlich vorhanden. Gleichzeitig ist die Wechselwirkung zwischen den Organismen und der Oberfläche gering, so daß die Wechselwirkung bereits durch leichte Scherkräfte (z.B. fließendes Wasser) wieder aufgehoben werden kann. In der zweiten Phase sind die Mikroorganismen hingegen fest an der Oberfläche fixiert. Nach Untersuchungen von Sjölema et al. [5. 83] ist die Phase der reversiblen Adhäsion nur sehr kurz (etwa 5-10 s). Im Einzelfall ist eine eindeutige Unterscheidung zwischen initialer Adhäsion und der Herstellung einer festen Bindung an die Trägeroberfläche nicht immer möglich (vgl. Abschn. 5.1.2). Deshalb werden in den folgenden Ausführungen die Phasen der initialen Adhäsion und der irreversiblen Anheftung unter dem Begriff primäre Adhäsion zusammengefaßt. Damit folgt die hier verwendete Nomenklatur in diesem Punkt dem Modell von Flemming [5. 27].

Die letzte Etappe der Biofilmbildung wird als Kolonisation bezeichnet und beschreibt die Ausbildung des „reifen Biofilmes“. Die Phase der Kolonisation wird bei Flemming [5. 27] nochmals unterteilt in eine Wachstumsphase (eine Phase der logarithmischen Biofilmmakkumulation) und eine Plateauphase in der die Biofilmdicke konstant bleibt (Phase, in der Biofilmwachstum und Abtrennung von Biofilmbestandteilen ein Gleichgewicht bilden). Eine solche Unterteilung gilt jedoch streng genommen nur für Biofilme unter relativ konstanten Umweltbedingungen z.B. im kommunalen Bereich. Gerade in Hochleistungsanlagen mit teilweise erheblichen Änderungen in der organischen Fracht und ihrer Zusammensetzung unterliegen auch die „reifen Biofilme“ einer stetigen

Veränderung mit einer unregelmäßigen Abfolge von Wachstums- und Plateauphasen (vgl. Abschn. 7).

Sowohl der Zeitraum, der erforderlich ist, bis die Besiedelung einer Oberfläche beginnt, wie auch Geschwindigkeit und Ausmaß der Biofilmbildung werden von einer Reihe von Faktoren bestimmt. Ein wichtiger Einflußfaktor ist die zu besiedelnde Oberfläche selbst. Seine chemische Zusammensetzung, Hydrophobizität, Oberflächenenergie, Oberflächenladung und seine Oberflächenstruktur (Porosität, Rauigkeit) entscheiden wesentlich nicht nur über die Geschwindigkeit der Besiedelung, sondern auch über die Struktur des Biofilmes (vgl. Abschnitt 5.2.1) und nach Angaben von Busscher et al. [5. 7] auch über seine Festigkeit. Die zweite wichtige Komponente sind die Organismen, gekennzeichnet durch ihre Hydrophobizität, ihre Oberflächenenergie und Oberflächenladung, sowie die spezifische Struktur der Zelloberfläche. Diese Eigenschaften werden in gewissen Grenzen durch die beteiligten Spezies festgelegt. Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, daß die Oberflächeneigenschaften der Organismen kein feste Größe darstellen. Sie können in Abhängigkeit von der Wachstumsphase, vom Ernährungszustand der Zellen und unter dem Einfluß verschiedener Umweltfaktoren erheblich variieren. Auch die Bildung von EPS kann die Eigenschaften sowohl der Organismen, wie auch des Trägers wesentlich verändern. Die dritte wichtige Komponente für die Biofilmbildung ist das umgebende Medium. Die flüssige Komponente beeinflusst durch seine Zusammensetzung, durch das Vorhandensein gelöster organischer und anorganischer Verbindungen, seine Oberflächenspannung und Viskosität, seinen pH-Wert und seine Temperatur, sowie durch hydrodynamische Wirkungen, wie Druck und Scherkraft den Aufbau und die Struktur der Biofilme.

Bei der Ausbildung des Biofilmes treten die einzelnen Komponenten in unterschiedlicher Weise in Wechselwirkung.

5.1 Die primäre Adhäsion

5.1.1 Theoretische Grundlagen

Die Entwicklung eines Biofilmes wird durch die primäre Adhäsion eingeleitet. Sie ist gekennzeichnet durch die Annäherung und Anheftung von einzelnen Organismen an eine Oberfläche. An diesem Prozeß ist eine Reihe verschiedenartiger Wirkmechanismen beteiligt, die in Abhängigkeit von den Eigenschaften der Partner, ihrem Abstand zueinander und von verschiedenen äußeren Einflußfaktoren einen unterschiedlichen Beitrag zur Anziehung oder Abstoßung zwischen Organismen und Substratum leisten

können. Einen Überblick über die Möglichkeiten der Wechselwirkung zwischen einer innerten Oberfläche und den sich anlagernden Organismen gibt Abbildung 5.2.

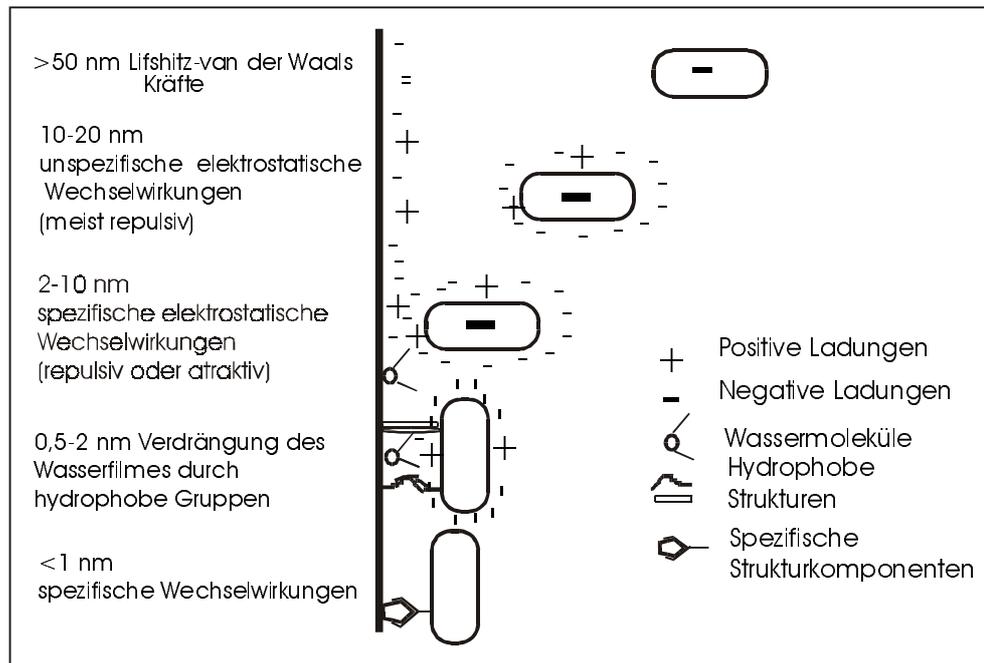


Abbildung 5.2: Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Oberflächen in ihrer Abhängigkeit vom Abstand der wechselwirkenden Partner zueinander

Die primäre Adhäsion wird allgemein als physiko-chemischer Prozeß betrachtet. Danach lassen sich die ablaufenden Adsorptionsprozesse, sowohl auf molekularer Ebene wie auch im makroskopischen Bereich (innerte kolloidale Partikel oder auch Bakterien) auf die Wirkung weniger grundlegender Kräfte zurückführen. Dies sind neben den stets vorhandenen Lifshitz - Van der Waals Kräften elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen und die Brownsche Molekularbewegung [5. 7].

Lifshitz - Van der Waals Kräfte beruhen auf dem elektrischen Moment der Elektronen, welches in den Atomen anderer Moleküle ein entgegengesetztes elektrisches Moment induziert und beinhalten eine Dispersions, Induktions- und eine Orientierungskomponente. Durch dieses elektrische Moment entstehen zwischen den Molekülen Anziehungskräfte. Diese Anziehungskräfte sind ubiquitär und nur von der Zahl der Elektronen abhängig. Lifshitz - Van der Waals Kräfte sind vergleichsweise schwach [5. 11]. Sie wirken aber über relativ große Distanzen (> 50 nm).

Nähern sich die wechselwirkenden Partner einander weiter an und erreichen einen Abstand von 10 bis 20 nm, so werden zunehmend elektrostatische Kräfte wirksam. Diese Wechselwirkungen im „long range“ Bereich sind makroskopischer Natur und von der Nettoladung der wechselwirkenden Oberflächen abhängig. Auf der Bakterienoberfläche

liegen normalerweise sowohl negative, wie auch positive Ladungszentren nebeneinander vor. Ist das Verhältnis von negativen zu positiven Ladungen ausgeglichen, so ist die Nettoladung dieser Organismen gering. Solche Organismen können dann trotz hoher Ladungsdichte auf der Oberfläche stark hydrophobe Eigenschaften aufweisen. Da die meisten Organismen zumindest in physiologischen Bereich eine negative Nettoladung besitzen und auch die meisten natürlichen Oberflächen negativ geladen sind, wirken long range elektrostatische Kräfte überwiegend repulsiv. Bei der weiteren Annäherung (<10 nm) können jedoch auch Ionen direkt miteinander in Wechselwirkung treten. Aus der Anziehung gegensätzlicher Ladungen kann dann eine Erhöhung der Bindungsstärke resultieren.

Die Nettoladungen und damit das Ausmaß der elektrostatischen Wechselwirkungen sind stark abhängig von der Ionenstärke und vom pH-Wert des umgebenden Mediums (vgl. Abschn. 5.1.2.1.1).

Eine wichtige Rolle für den Prozeß der primären Adsorption wird von vielen Autoren den hydrophoben Wechselwirkungen zugesprochen [5. 89, 5. 103]. Sie beruhen letztendlich auf dem Ordnungszustand des Wassers, der durch Wasserstoffbrückenbindungen stabilisiert wird und dadurch zu einer Minimierung der freien Energie des Systems führt. Durch hydrophobe Gruppen wird dieser natürliche Ordnungszustand des Wassers gestört und die freie Energie des Systems erhöht. Der energetisch günstigste Zustand wird erreicht, wenn die hydrophoben Gruppen aggregieren und eine „hydrophobe Zone“ bilden. Die dabei gewonnene freie Energie stellt die energetische Basis der hydrophoben Bindung dar.

Der direkte Kontakt zwischen Bakterien und Oberflächen wird häufig durch den vorhandenen Wasserfilm auf der Oberfläche von Bakterien und Substratum verhindert. Die Beseitigung dieses Wasserfilmes führt zwar allgemein zu einer deutlichen Verstärkung der adsorptiven Bindung, ist aber selbst zunächst mit einem hohen energetischen Aufwand verbunden. Bei der Eliminierung des Wasserfilmes leisten deshalb hydrophobe Strukturelemente auf der Bakterienoberfläche einen wichtigen Beitrag. Sie können den vorhandenen Film durchdringen und hydrophobe Bindungen mit entsprechenden Strukturelementen des Substratums eingehen.

Wird der Wasserfilm in genügendem Umfang verdrängt, so können im „short range“ Bereich (<1 nm) weitere Bindungsformen, wie Wasserstoffbrückenbindungen oder Ionenbeziehungen aufgebaut werden. Auch echte Ligand-Rezeptor-Beziehungen werden beobachtet. Diese Wechselwirkungen, die im mikroskopischen Bereich wirksam sind und zwischen stereochemisch komplementären Oberflächenkomponenten stattfinden, werden im folgenden als „spezifische Wechselwirkungen“ bezeichnet. Obwohl auch diese

Beziehungen letztendlich auf die bekannten nicht kovalenten Bindungen zurückgeführt werden können [5. 10, 5. 103], lassen sie sich bisher nicht mit genügender Genauigkeit aus den makroskopischen physiko-chemischen Parametern ableiten. Dies beruht zum einen darauf, dass spezifische Strukturen, z.B. Polysaccharide oder andere „Adhäsine“ auf der Bakterienoberfläche ungleichmäßig verteilt vorliegen. Das Auftreten solcher Strukturen führt damit zwar zu einer Veränderung der makroskopischen Zelloberflächeneigenschaften wie Hydrophobizität und Nettoladung. Da jedoch diese Änderungen auf wenige Bereiche der Zelloberfläche begrenzt bleiben, können sie mit den vorhandenen Methoden nicht mit genügender Genauigkeit meßtechnisch erfaßt werden. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß bei spezifischen Wechselwirkungen sterische Effekte eine wichtige Rolle spielen. Diese werden von den bisher beschriebenen Modellen gleichfalls nicht berücksichtigt.

Spezifische Wirkmechanismen können eine erhebliche Bedeutung für die Zusammensetzung und Leistungsfähigkeit von Biofilmpopulationen besitzen (vgl. Abschnitt. 5.1.2.1.2). Deshalb ist die Betrachtung dieser Wechselwirkungen als eine separate Gruppe, obwohl nicht unumstritten, unserer Auffassung nach gerechtfertigt.

Obwohl die verschiedenen Mechanismen, die die Anlagerung von Bakterien an innere Oberflächen beeinflussen, weitestgehend bekannt sind, existiert bis heute keine allgemeingültige Theorie, um das komplexe Gefüge von Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Oberflächen vollständig zu beschreiben. Jedoch werden im wesentlichen zwei Modelle diskutiert die beide auf den Gesetzen der Kolloid- und Grenzflächenchemie beruhen; die DLVO-Theorie und das thermodynamische Modell.

Die Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) Theorie [5. 77] der kolloidalen Stabilität beschreibt die Wechselwirkung eines kolloidalen Partikels bei der Annäherung an eine Oberfläche als Änderung der freien Enthalpie (Gibbssche Energie) in Abhängigkeit vom Abstand der beiden Oberflächen zueinander. Die totale Gibbssche Energie der Wechselwirkung (G_{tot}) wird dabei als Summe aus Van der Waals (G_V) und elektrostatischer (G_E) Wechselwirkung betrachtet. Je nach Größe der beiden Komponenten ergibt sich ein charakteristischer funktionaler Zusammenhang, der schematisch in Abbildung 5.3 wiedergegeben wird. Eine starke elektrostatische Abstoßung (Abbildung 5.3A) bedingt danach die Ausbildung einer hohen Energiebarriere, die eine Annäherung von Partikeln in den short range Bereich (Primäres Minimum, Abstand <1 nm) verhindert. Diese Energiebarriere kann mehrere 100 KT (K: Boltzmannkonstante; T: Temperatur in °K, $1 \text{ KT} = 4 \cdot 10^{-21} \text{ J/Bakterium}$) betragen. Mit abnehmender elektrostatischer Abstoßung vermindert sich die Höhe dieser Energiebarriere. Ab einem bestimmten Level kann sie durch die kinetische Energie zumindest einiger

Partikel überwunden werden. Es erfolgt ein Übergang dieser Partikel in das primäre Minimum und damit eine irreversible Adhäsion. Mikroorganismen überwinden diese Energiebarriere auch durch Ausbildung spezifischer Strukturen der Zelloberfläche (Fimbrien oder Flagellen), die beispielsweise hydrophobe Wechselwirkungen mit der Trägeroberfläche oder lectinartige Bindungen eingehen [5. 45, 5. 72]. Vermindert sich die elektrostatische Abstoßung weiter oder existiert gar eine attraktive elektrostatische Beziehung, so können alle Partikel in den Bereich des primären Minimums vordringen und irreversibel adsorbieren (Abbildung 5.3C). Bei bestimmten Verhältnissen von Van der Waals und elektrostatischen Kräften existiert in einer Distanz zwischen 10 und 20 nm neben dem primären ein zweites weniger tief ausgeprägtes Energieminimum, das sogenannte sekundäre Minimum. Dieses sekundäre Minimum beträgt nach Berechnungen von Busscher und Weerkamp [5. 12] ca. 3-4 KT. Die reversible oder initiale Adhäsion [5. 100] wird durch die DLVO-Theorie als Anlagerung in diesem sekundären Minimum verstanden. Bei statischen Adsorptionsversuchen (zur experimentellen Durchführung vgl. Abschn. 6) berechneten van Loosdrecht et al. [5. 99] Adhäsionsenergien von 2-3 KT, was eine primäre Adhäsion im sekundären Minimum zu bestätigen scheint. Das sekundäre Minimum ist nach van Loosdrecht et al. [5. 100] besonders stark ausgeprägt bei Systemen mit hoher Van der Waals Attraktion, bei größeren Partikeln und bei mittlerer Ionenstärke des Mediums.

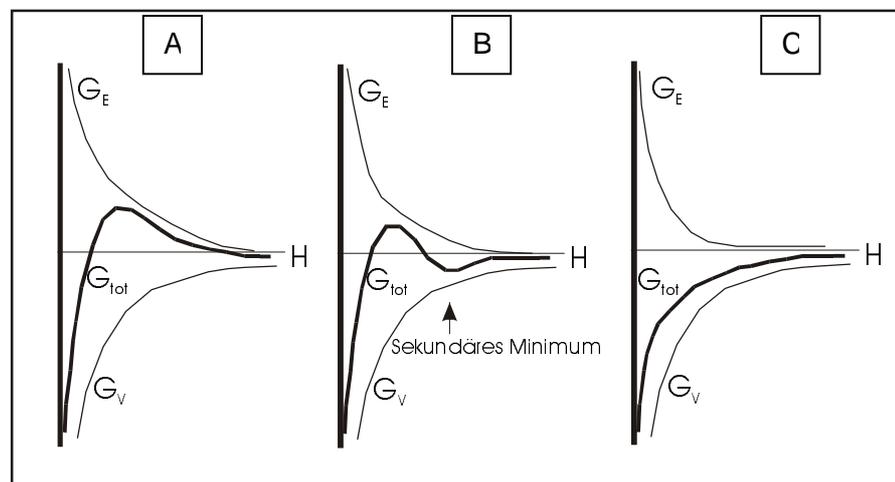


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der Änderung der Gibbs'schen Energie bei der Annäherung eines Partikels an eine plane Oberfläche.
A: $G_E \gg G_V$, B: $G_E > G_V$, C: $G_E < G_V$
 G_E : elektrostatische Komponente, G_V : Van der Waals Komponente,
 G_{tot} : resultierende Gibbs'sche Energie, H: kürzeste Entfernung zwischen den wechselwirkenden Partnern

In der DLVO-Theorie werden die Wechselwirkungen zwischen Partikeln im „short range“ Bereich nicht betrachtet. Das bedeutet, daß beispielsweise Wasserstoffbrücken, ionische Wechselwirkungen oder sterische Effekte, die für die Stärke der adsorptiven Bindung von erheblicher Bedeutung sind, nicht beschrieben werden können. Diese Theorie ist somit zwar in der Lage, eine Vorhersage über die Möglichkeit einer irreversiblen Adsorption im primären Minimum zu treffen, sie gestattet jedoch keine Aussage über die Bindungsstärke in diesem Bereich. Deshalb wird von vielen Autoren ein weiteres, das thermodynamische Modell verwendet. Die Theorie von van Oss [5. 102] beschreibt die Adsorption von Mikroorganismen an eine Oberfläche als einen Prozeß der Minimierung der Gibbsschen Energie eines Systems und beruht damit auf den gleichen Grundlagen, wie die Betrachtung des Verhaltens fester Partikel in einer Suspension. Im Falle der mikrobiellen Adsorption ist die flüssige Phase dabei üblicherweise Wasser und nach den Gesetzen der physikalischen Chemie läßt sich die freie Enthalpie der Wechselwirkung zweier Partikel in Wasser (ΔG_{iwi}) aus der Grenzflächenspannung dieser Partikel mit Wasser berechnen als:

$$\Delta G_{iwi} = -2\gamma_{iw} \quad (\text{Gleichung 5.1})$$

wobei γ_{iw} die Grenzflächenspannung zwischen den Partikeln und Wasser beschreibt. Die Grenzflächenspannung zweier unterschiedlicher Partikel i und j (γ_{ij}) in Wasser kann allgemein aus den Grenzflächenspannungen der beiden Komponenten berechnet werden. Die entsprechende Beziehung ist in Gleichung 5.2 dargestellt.

$$\Delta G_{ijw} = \gamma_{ij} - \gamma_{iw} - \gamma_{jw} \quad (\text{Gleichung 5.2})$$

Nach dieser Theorie sollte eine adsorptive Anlagerung stattfinden, sobald $\Delta G_{ijw} \leq 0$ ist.

Die Grenzflächenspannung wird üblicherweise durch Bestimmung des Kontaktwinkels einer Flüssigkeit auf einer ebenen Oberfläche ermittelt und nach der Formel von Young (Gleichung 5.3) berechnet. Die dabei wirkenden Kräfte sind in Abbildung 5.4 dargestellt. (vgl. auch Abschn. A.1.r, S. xi im Anhang)

$$\gamma_{LV} \cos\theta = \gamma_{SV} - \gamma_{SL} \quad (\text{Gleichung 5.3})$$

γ_{LV} : Grenzflächenspannung zwischen Luft und Meßflüssigkeit

γ_{SV} : Grenzflächenspannung zwischen Luft und Oberfläche

γ_{SL} : Grenzflächenspannung zwischen Meßflüssigkeit und Oberfläche

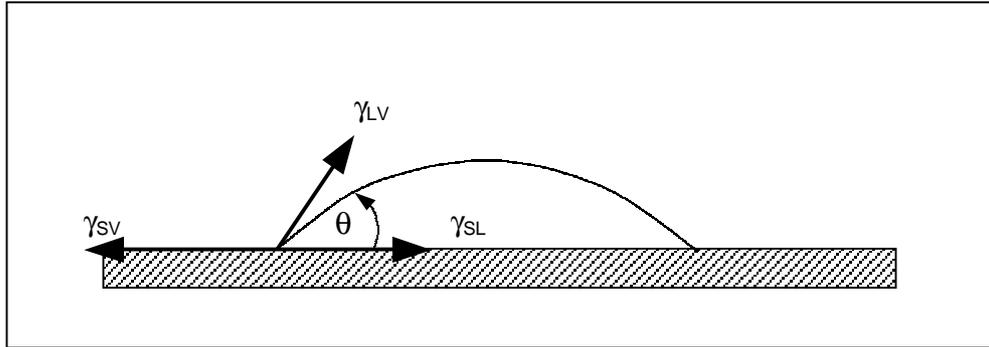


Abbildung 5.4: Die Beziehung zwischen den wirksamen Kräften und dem Kontaktwinkel bei der Ausbreitung eines Wassertropfens auf einer ebenen Oberfläche

Steht eine Flüssigkeit mit bekannter Oberflächenspannung zur Verfügung (Bei der mikrobiellen Adsorption üblicherweise Wasser), so kann für beliebige Oberflächen die Grenzflächenspannung berechnet werden. Dazu können die von Neumann et al. [5. 67] entwickelten empirischen Rechenformeln bzw. die für unterschiedliche Grenzflächenspannungen tabellierten Werte herangezogen werden.

Die Oberflächenspannung eines Partikels γ_i enthält nach der Theorie von van Oss eine apolare Komponente γ_i^{lw} (Lifshitz-van der Waals Komponente), die im long range Bereich wirksam wird, und eine polare short range Komponente γ_i^{AB} (Gleichung 5.4). Letztere berücksichtigt den Lewis-Säure-Base-Charakter der wechselwirkenden Partner (Elektronen-Donor-Akzeptor Eigenschaften der beteiligten Komponenten). Ionische Wechselwirkungen (Brönsted-Säure-Base-Beziehung) sind dabei als integraler Teil in der polaren Komponente enthalten.

$$\gamma_i = \gamma_i^{lw} + \gamma_i^{AB} \quad (\text{Gleichung 5.4})$$

Die polare Komponente enthält 2 Parameter; den Elektronen-Akzeptor-Parameter γ_i^{\oplus} und den Elektronen-Donor-Parameter γ_i^{\ominus} . Daraus ergibt sich für den polaren Anteil der Oberflächenspannung eines Partikels in Wasser:

$$\gamma_i^{AB} = 2 \sqrt{\gamma_i^{\oplus} \cdot \gamma_i^{\ominus}} \quad (\text{Gleichung 5.5})$$

Entsprechend sind für die separate Bestimmung der Van der Waals Komponente, sowie des Beitrages von Elektronen-Donor und Elektronen- Akzeptorkomponente mindestens 3 verschiedene Lösungsmittel mit unterschiedlichen Lewis-Säure-Base-Eigenschaften erforderlich. Für eine Reihe von Lösungsmitteln sind die Werte für γ^{lw} , γ^{AB} , sowie γ^{\oplus} und

γ^\ominus bekannt. Einen Überblick über die gebräuchlichsten für die Kontaktwinkelmessung verwendeten Verbindungen gibt Tabelle 5.1. Anhand der ermittelten Kontaktwinkel kann die Bestimmung von ΔG_{iwj} entsprechend der mathematischen Ableitung von van Oss [5. 103] erfolgen.

Tabelle 5.1: Oberflächenspannungen der gebräuchlichsten Flüssigkeiten für die Bestimmung der Oberflächenenergie von Bakterien und innerten Oberflächen (mJ/m²) nach [5. 5 und 5. 92]

Medium	γ_{lv}^{LW}	γ_{lv}^{AB}	γ_{lv}^\oplus	γ_{lv}^\ominus
Wasser	21,8	51	25,5	25,5
Formamid	39,0	19,0	2,3	39,6
Diethylether	16,7	0	0	16,4
Ethylacetat	23,9	0	0	19,4
Methylenjodid	50,8	0	0	0
1-Bromnaphthalen	44,4	0	0	0
Hexadekan	27,7	0	0	0
Chloroform	27,2	0	3,8	0

Die thermodynamische Beschreibung der bakteriellen Adhäsion ermöglicht eine Aussage über die prinzipielle Möglichkeit der adsorptiven Bindung von Organismen an eine Oberfläche. Die theoretischen Berechnungen von van Oss [5. 103], sowie zahlreiche experimentelle Resultate lassen den Schluß zu, daß die bakterielle Adsorption dabei vor allem durch die im short range Bereich wirksamen polaren Wechselwirkungen beeinflusst wird. Für diese Annahme spricht einerseits der mit maximal etwa 7 mJ/m² nur geringe Anteil der Van der Waals Komponente am freien Energiepotential der Bakterien, eine Annahme, die von mehreren Autoren experimentell bestätigt werden konnte [5. 12]. Andererseits ist der Anteil der Van der Waals Komponente an der Oberflächenspannung für viele häufig verwendete Trägermaterialien annähernd gleich [5. 104], so daß das adsorptive Verhalten der Träger überwiegend durch die polare Komponente bestimmt wird.

Die durch thermodynamische Betrachtungen gewonnenen Aussagen über das adsorptive Verhalten von Bakterien an innerten Oberflächen entspricht in vielen Fällen der experimentellen Erfahrung [5. 89, 5. 95, 5. 104, 5. 112]. Wieder andere Resultate können jedoch bisher nicht mit diesem Modell erklärt werden [5. 4, 5. 16, 5. 62, 5. 93]. Dafür kommen mehrere Ursachen in Betracht. Dies ist einerseits die Tatsache, das die

inhomogene Bakterienoberfläche räumlich begrenzte Wechselwirkungen eingehen kann, welche durch die makroskopischen Betrachtungen der Thermodynamik nicht ausreichend wiedergespiegelt werden. Auch sind Konformationsänderungen von Oberflächenmolekülen während des Adsorptionsprozesses möglich. Schließlich ist zu berücksichtigen, daß die Thermodynamik davon ausgeht, daß sich Systeme im Gleichgewichtszustand befinden. Lebende Organismen besitzen aber die Fähigkeit, gezielt metabolische Energie aufzuwenden, um ihre adsorptiven Eigenschaften zu verändern oder adsorptive Bindungen zu verstärken. Solche aktiven metabolischen Prozesse sind darüber hinaus auch stark von Umweltfaktoren beeinflusst und können somit je nach Versuchsbedingungen zu unterschiedlichen Ergebnissen führen.

5.1.2 Einflußfaktoren auf die Primäradhäsion

Die primäre Adhäsion von Mikroorganismen an eine innerte Oberfläche wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst. Dies ist zunächst die Struktur der bakteriellen Oberfläche selbst, die je nach Stoffwechselsituation, Wachstumsphase und in Abhängigkeit von verschiedenen äußeren Faktoren auch Veränderungen unterworfen sein kann. Ein zweiter wesentlicher Einflußfaktor ist das Substratum. Dieses kann sich unter der Einwirkung des umgebenden Mediums gleichfalls verändern. Schließlich wirkt auch das Medium, welches Organismen und Substratum umgibt in unterschiedlicher Form auf das Adhäsionsgeschehen ein. Bei der Betrachtung der Adhäsion als komplexen Prozeß kommt der Wechselbeziehung der unterschiedlichen Einflußfaktoren eine besondere Bedeutung zu.

5.1.2.1 Die Struktur der bakteriellen Oberfläche

Die bakterielle Oberfläche ist eine heterogene, dreidimensionale Struktur mit außerordentlich komplexer chemischer Zusammensetzung. Dabei finden sich einerseits Strukturelemente, die für alle Organismen oder zumindest für größere Gruppen, wie den Gram positiven oder Gram negativen Bakterien, charakteristisch sind (vgl. Tabelle 5.2). Andererseits werden einige Strukturelemente nur bei wenigen Arten oder gar nur bei einzelnen Stämmen nachgewiesen.

Die erstere Gruppe bestimmt wesentlich die makroskopischen Eigenschaften der Organismen, wie Hydrophobizität oder elektrostatisches Verhalten. So werden die elektrostatischen Eigenschaften Gram positiver Bakterien meist durch Carboxylgruppen (Peptidoglycan, Teichuronsäuren und Protein) und die Phosphatgruppen der Teichonsäuren geprägt. Die makroskopischen Eigenschaften der Zellen können

zusätzlich durch verschiedene Kapseln und Schleime, die sich auf der Zelloberfläche anlagern, beeinflusst werden.

Tabelle 5.2: Charakteristische Komponenten der Zellwand Gram positiver bzw. Gram negativer Bakterien nach [5. 39].

Verbindung	Vorkommen in Gram+ oder Gram- Organismen	Struktur	Makroskopisch wirksame Gruppen
Murein	Gram+ 20-80nm dick Gram- 10-15nm dick	Peptidoglycan	Carboxyl- OH- Amino-
Teichonsäuren	Gram+	Ribitol- oder Glycerol- zucker-Phosphate oder einfache N- Acetylhexosamin-Phosphat- Polymere, kovalent gebunden an Peptidoglycan	Phosphat, -OH stark hydrophil anionisch
Teichuron- säuren	Gram+	kovalent an Petidoglycan gebunden	Carboxyl- anionisch
Lipoteichon- säuren	Gram+	Teichonsäure (meist Polyglycerol-Phosphate) an Glycolipide gebunden, verankert in der Cytoplasmamembran	Phosphat -OH amphiphil
Polysaccharide	Gram+	hier kovalent an Peptidoglycan gebunden	-OH
Lipide	Gram-	Glucolipide, (Phospholipide)	lipophile Gruppen oder amphiphil (apolar oder polar)
Lipopoly- saccharide		Lipide mit kovalent gebundenem hydrophilen Polysaccharidanteil	Alkyl- OH- Phosphat- Amino- amphiphil
Proteine	Gram+ Gram-	kovalent oder nicht kovalent gebunden	Carboxyl- Amino- amphiphil

Zu den art- oder gar zellinientypischen Zellwandstrukturen gehören z.B. einige Saccharide und Proteinstrukturen, die hochspezifisch sind und u.a. die Anheftung und den Abbau von persistenten Verbindungen vermitteln. Solche spezifischen Mechanismen wirken im mikroskopischen Bereich.

Die wohl am besten untersuchte spezifische Oberflächenstruktur, die direkt am Abbau von Substraten beteiligt ist, ist das Cellulosom, ein multifunktionaler Proteinkomplex der Zelloberfläche, welcher für *Clostridium thermocellum* beschrieben wurde [5. 3]. Dieser Proteinkomplex vermittelt nicht nur die Anheftung der Bakterien an die Oberfläche des zu

verwertenden Substrates Zellulose, sondern er besitzt auch mehrere enzymatisch aktive Untereinheiten, die die primäre Spaltung der Zellulose in Zellobioseeinheiten realisieren. Aber auch für den pathogenen Charakter vieler Bakterien sind spezifische Zelloberflächenstrukturen verantwortlich.

Die unterschiedliche Wirkung unspezifischer makroskopischer und spezifischer mikroskopischer Mechanismen bestimmt letztendlich den Umfang und die Intensität der adsorptiven Bindung eines Bakteriums an eine Oberfläche.

5.1.2.1.1 Makroskopische Charakterisierung mittels Oberflächenladung, Hydrophobizität und freier Oberflächenenergie

Wie in Abschn. 5.1.1. erläutert, kann die bakterielle Zelloberfläche mittels makroskopischer Parameter, wie Hydrophobizität, Oberflächenladung oder der freien Oberflächenenergie beschrieben werden. Diese makroskopische Charakterisierung läßt zwar bisher keine allumfassende und eindeutige Vorhersage über das adsorptive Verhalten der Organismen zu, sie kann jedoch wertvolle Hinweise für die Optimierung des Systems Bakterienzelle-Träger-Substrat geben. Dabei spielen vor allem zwei charakteristische Kenngrößen eine wesentliche Rolle. Dies sind die Hydrophobizität und die Oberflächenladung. Die Hydrophobizität eines Bakteriums steht in direktem Zusammenhang mit der freien Energie bzw. der Grenzflächenspannung zwischen den Organismen und dem sie umgebenden wäßrigen Medium (vgl. Abschn. 5.1.1.). Nach der Theorie von van Oss [5. 102] sind danach solche Verbindungen hydrophob, für die $\Delta G_{iwi} < 0$ gilt. Diese Verbindungen sollten nach den Gesetzen der Thermodynamik aggregieren bzw. sich an innerte Oberflächen anlagern, soweit dies nicht durch die Eigenschaften des Trägers verhindert wird (vgl. Abschn. 5.1.2.2). Da sich die Oberflächenspannung des Wassers im wesentlichen aus der kohäsiven Wechselwirkung der Wasserstoffbrückenbindungen mit $\gamma_i^{\oplus} = \gamma_i^{\ominus} = 25,5 \text{ mJ/m}^2$ ergibt, können Verbindungen, deren Grenzflächenspannung zu Wasser $\geq 45 \text{ mJ/m}^2$ beträgt als hydrophob bezeichnet werden. Alle Verbindungen, für die sowohl γ^{\oplus} wie auch γ^{\ominus} bei 0 oder nahe 0 liegen, werden als vollständig hydrophob bezeichnet. Für vollständig hydrophobe Verbindungen, z.B. gesättigte Kohlenwasserstoffe liegt ΔG_{iwi} bei -84 mJ/m^2 oder darunter. Alle anderen mit einem ΔG_{iwi} zwischen -84 mJ/m^2 -45 mJ/m^2 und sind partiell hydrophob. Eine der stärksten bekannten hydrophoben Oberflächen ist die Grenzfläche zwischen Wasser und Luft. Deshalb ist in technisch relevanten Anlagen die Passage dieser Grenzfläche eine wesentliche Einflußgröße auf die Adsorption von Mikroorganismen an Trägeroberflächen.

Zur Bestimmung der thermodynamisch definierten Hydrophobizität der mikrobiellen Oberfläche kommt gegenwärtig ausschließlich die Kontaktwinkelmethode in Betracht (vgl. Abschn. 5.1.1). Da die Oberfläche eines Bakteriums jedoch der Messung nicht direkt zugänglich ist, erfolgt die Kontaktwinkelmessung üblicherweise durch Auftragen eines Flüssigkeitstropfens auf einen geschlossenen Film von Bakterien. Dieser Film wurde in unseren Untersuchungen mittels Filtration auf einem Membranfilter (0,45 µm) erzeugt. Für die Messung des Kontaktwinkels ist eine möglichst glatte Oberfläche erforderlich, weil die Oberflächenrauheit die Ausbreitung der Flüssigkeit auf dem Film behindern kann und dann zu Verfälschungen der Meßergebnisse führt. Eine besondere Beachtung verlangt auch die Feuchtigkeit des verwendeten Bakterienfilmes. Da die Bakterien Wechselwirkungen mit Oberflächen im hydratisierten Zustand eingehen, muß dieser Zustand bei der Messung des Kontaktwinkels möglichst zuverlässig simuliert werden. Zu starke Austrocknung, d.h. Dehydratisierung, führt zu erheblichen Änderungen der bakteriellen Oberfläche und ermöglicht keine Rückschlüsse auf das Verhalten der Organismen im nativen Zustand. Verbleibende Feuchtigkeit auf der Oberfläche führt ebenfalls zu falschen Meßergebnissen. Üblicherweise wird deshalb der sogenannte Plateauwinkel angegeben. Dies ist der Kontaktwinkel der gemessen wird, nachdem sich ein Gleichgewicht zwischen der Wasserphase im Bakterienfilm und der umgebenden Luftfeuchtigkeit eingestellt hat. Unter diesen Bedingungen liegt Wasser nur noch als Hydratwasser an der Bakterienoberfläche gebunden vor. Eine ausführliche Methodenbeschreibung erfolgt im Anhang (Abschn. A.1.r, S. xi).

Resultate aus Bestimmungen der Hydrophobizität durch Kontaktwinkelmessungen liegen von verschiedenen Autoren und für zahlreiche Organismen vor. Den wahrscheinlich umfassendsten Überblick geben van der Mei et al. [5. 92].

Für stark hydrophobe bzw. hydrophile Organismen läßt sich allgemein eine gute Übereinstimmung der thermodynamischen Voraussagen mit dem adsorptiven Verhalten der Organismen feststellen (Tabelle 5.6) [5. 89, 5. 95, 5. 104, 5. 112]. Gleiches gilt für das Verhalten bestimmter Organismen und unterschiedlicher Träger mit bekannter Oberflächenenergie [5. 12]. Allerdings ist die Korrelation der Ergebnisse der thermodynamischen Betrachtungen gerade für die häufig auftretenden Organismen mittlerer Polarität in vielen Fällen eher gering [5. 104] oder das adsorptive Verhalten steht sogar den thermodynamischen Annahmen entgegen. Ein charakteristisches Beispiel dafür ist die Existenz trägerfixierter Nitrifikanten, obwohl die Anlagerung dieser Organismen an die meisten der verwendeten Oberflächen thermodynamisch nicht favorisiert ist (vergl. [5. 89] bzw. Abschn. 7.6.1.1 und 7.6.2).

Aufgrund des erheblichen apparativen Aufwandes aber auch wegen der bekannten Einschränkungen dieser Methode bei der Vorhersage des Adsorptionsverhaltens, werden

neben dem thermodynamisch exakten Verfahren der Kontaktwinkelmessung auch eine Reihe von Methoden angewendet, die eine näherungsweise Charakterisierung des „hydrophoben Verhaltens“ der Organismen ermöglichen. Die wohl am häufigsten angewandte Methode ist die von Rosenberg [5. 76] beschriebene Adsorption von Mikroorganismen an einem unpolaren, d.h. vollständig hydrophoben organischen Lösungsmittel, der sogenannte MATH-Test (microbial adsorption to hydrocarbons) (vgl. Anhang Abschn. A.1.s, S. xii). Als organische Phase wird dafür meist Hexadekan eingesetzt [5. 98], aber auch n-Oktan, p-Xylen und Toluol sind verwendet worden [5. 8, 5. 65]. Dabei diente der Anteil der an der organischen Phase gebundenen Organismen lange Zeit als Maß für die Hydrophobizität [5. 98]. Tatsächlich wurde auch bei einigen Untersuchungen eine gute Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen im MATH-Test und den Resultaten der Kontaktwinkelanalyse festgestellt (5. 98, 5. 94). Van der Mei et al. [5. 94] setzten neben dem apolaren Lösungsmittel auch solche mit Lewis-Säure- oder -Base-Eigenschaften ein und ermittelten auch hier eine gute Übereinstimmung mit dem thermodynamischen Ansatz von van Oss [5. 103]. Spätestens seit den Arbeiten von Busscher et al. [5. 8] ist jedoch bekannt, daß alle Kohlenwasserstoffe, einschließlich Hexadekan, im wäßrigen Medium eine erhebliche negative Nettoladung von bis zu -60 mV bei pH 7 aufweisen. Die Adsorption an Hexadekan und anderen Kohlenwasserstoffen beruht also nicht ausschließlich auf hydrophoben Wechselwirkungen, sondern stellt ein kompliziertes Gefüge aus Lifshitz-van der Waals, polaren und elektrostatischen Wechselwirkungen dar, wodurch die Interpretation von Resultaten aus dem MATH-Test wesentlich erschwert wird. Zur Bewertung der Hydrophobizität der Organismen empfehlen van der Mei et al. [5. 94] deshalb die Auswertung der zeitabhängigen Abnahme der Zellzahl in der wäßrigen Phase bei einem pH-Wert, der dem isoelektrophoretischen Punkt der Organismen entspricht. Nach unseren Erfahrungen ist der MATH-Test jedoch für die Vorhersage des Adsorptionsverhaltens von Mikroorganismen an hydrophoben Oberflächen eher geeignet als die thermodynamisch exaktere Kontaktwinkelmessung (vgl. Abbildung 5.5) [5. 57]. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, daß die meisten hydrophoben Materialien, einschließlich solcher, die als vollständig hydrophob gelten (z.B. Teflon), gleichfalls eine negative Nettoladung aufweisen. Damit entspricht das komplexe Adsorptionsverhalten der Organismen an Hexadekan der natürlichen Situation besser, als die streng thermodynamisch charakterisierte Meßgröße Hydrophobizität. Für Trägermaterialien, die selbst eine starke Polarität aufwiesen, oder gar ionische Gruppen enthielten, konnte in unseren Arbeiten allerdings mit keiner der untersuchten Methoden eine zufriedenstellende Korrelation zum Adsorptionsverhalten der Organismen festgestellt werden (vgl. Tabelle 5.6).

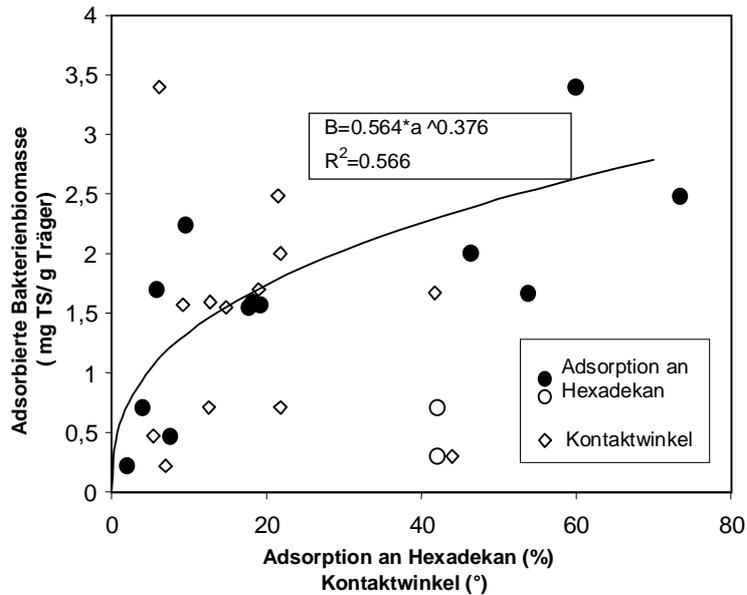


Abbildung 5.5: Korrelation zwischen der Adsorption von Mikroorganismen an eine hydrophobe Oberfläche und ihrer Hydrophobizität (Kontaktwinkelmessung) bzw. ihrer Adsorption an Hexadekan (MATH-Test). [5. 57] (○ für die Berechnung nicht verwendet)

Neben der Adsorption an hydrophobe Lösungsmittel sind von verschiedenen Autoren auch andere Systeme für die Bewertung der Hydrophobizität herangezogen wurden. So erzielten van Loosdrecht et al. [5. 98] mit einem wässrigen Zweiphasensystem vor allem im sensiblen Bereich mittlerer Polarität gute Ergebnisse.

Als weitere Methoden seien die hydrophobe Chromatographie z.B. an Phenyl -Sephrose oder Oktyl-Sephrose oder der Salzaggregationstest genannt [5. 23, 5. 65]. Beide Methoden wurden bisher vor allem zur Charakterisierung von pathogenen Organismen im medizinischen Bereich eingesetzt. Mit dem von uns verwendeten Material Oktyl-Sephrose und den in dieser Arbeit beschriebenen Organismen wurden mittels hydrophober Chromatographie allerdings nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt. Offensichtlich wurde unter den von uns verwendeten Versuchsbedingungen ein erheblicher Teil der Organismen unspezifisch zurückgehalten, so daß die meßbaren Unterschiede zwischen den Organismen keine Relation zu anderen Methoden erkennen ließen.

Verschiedentlich wurde auch die direkte Anlagerung von hydrophoben Substanzen, wie Dodekansäure oder Mikropartikeln zur Bestimmung der Hydrophobizität verwendet [5. 23]. Diese Methoden eignen sich in Kombination mit einer radioaktiven oder besser Fluoreszenzmarkierung auch zu Untersuchungen im mikroskopischen Bereich.

Neben den hydrophoben sind für das adsorptive Verhalten der Bakterien vor allem die elektrostatischen Eigenschaften von Bedeutung. Zur Bewertung der Oberflächenladung wird meist die elektrophoretische Mobilität bzw. das Zetapotential der Organismen herangezogen. Die Bestimmung dieser Kenngrößen erfolgt durch Partikelelektrophorese in nativen oder verdünnten Elektrolytlösungen. Da bei dieser Methode die zu messenden Partikel eine Größe von mehreren μm aufweisen, kann im Gegensatz zu solchen Techniken, die beispielsweise für die Trennung von Proteinen oder Nucleinsäuren entwickelt wurden, keine stabilisierende Matrix verwendet werden. Deshalb stellt der elektroosmotische Flüssigkeitsstrom bei der Partikelelektrophorese ein erhebliches Problem dar. Der elektroosmotische Effekt bewirkt in einer geschlossenen Elektrophoresezelle eine konstante Flüssigkeitsbewegung, die in der äußeren Zone zur Kathode hin erfolgt. Im Inneren der Zelle findet eine entgegengesetzte Bewegung statt. Die Migration der Partikel setzt sich also zusammen aus der Bewegung der Partikel im elektrischen Feld und ihrem Transport mit dem elektroosmotischen Flüssigkeitsstrom. Lediglich in einem engen Bereich an der Grenze zwischen dem äußeren und dem inneren Flüssigkeitsstrom ist die Bewegung der Flüssigkeit vernachlässigbar. Da die Mobilität der Partikel nur in diesem Bereich von der Flüssigkeitsbewegung unabhängig ist, wird diese Zone für die Messung der elektrophoretischen Mobilität herangezogen. Die Vorgänge in der Elektrophoresezelle sind in Abbildung 5.6 schematisch dargestellt.

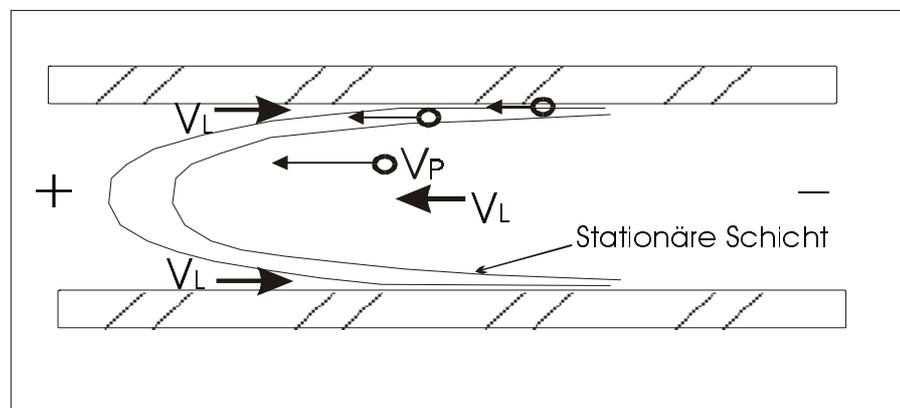


Abbildung 5.6: Das Meßprinzip der Partikelelektrophorese. V_L : Flüssigkeitsstrom.
 V_P : Relativgeschwindigkeit der Partikel in verschiedenen Zonen der Meßzelle

Für die Erfassung der Partikelbewegung in einem engen räumlichen Bereich ist eine sehr genaue Meßmethode erforderlich. Üblicherweise wird dafür die Laser-Doppler-Technik eingesetzt. Eine detaillierte Beschreibung der in unseren Untersuchungen verwendeten Methode erfolgt im Anhang (Abschn. A.1.aa, S. xvii).

Aus der elektroforetischen Geschwindigkeit der Partikel im elektrischen Feld lässt sich mit Hilfe der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung (Gleichung 5.6) das Zetapotential berechnen.

$$\xi = \frac{\mu_E \cdot 4\pi \eta}{\epsilon} \quad (\text{Gleichung 5.6})$$

μ_E : elektroforetische Mobilität ($\text{m}^3/\text{V}\cdot\text{s}$)

η : Viskosität (cp)

ϵ : Dielektrizitätskonstante der elektrischen Doppelschicht

ξ : Zetapotential (mV)

Das Zetapotential kann als Maß für die Netto-Oberflächenladung eines Partikels bei einer gegebenen Ionenstärke verwendet werden. Dabei gilt:

$$\sigma_0 = \sqrt{\frac{N \cdot \epsilon \cdot k \cdot T}{2000\pi}} \cdot \sqrt{\sum c_i \left(e^{-z_i \frac{e \cdot \xi}{k \cdot T}} - 1 \right) + \sum c_j \left(e^{+z_j \frac{e \cdot \xi}{k \cdot T}} - 1 \right)} \quad (\text{Gleichung 5.7})$$

σ_0 : Netto-Ladungsdichte

T: Temperatur [K]

N: Avogadro-Konstante

c: Ionenkonzentration [mol/l]

K: Boltzmann-Konstante

ξ : Zetapotential [V]

e: elektrische Elementarladung

ϵ : Dielektrizitätskonstante

z: Valenz

Die Definition des Zetapotentials geht auf das Modell von Stern aus dem Jahre 1924 zurück. Danach ordnen sich auf der Oberfläche eines geladenen Partikels die Gegenionen zunächst in einer fest gebunden (Stern- Schicht) und in größerer Entfernung in einer diffusen Grenzschicht an, innerhalb der eine freie Bewegung der einzelnen Gegenionen möglich ist. Wird an einen solchen Partikel ein elektrisches Feld angelegt, so bewegen sich nur die Gegenionen der Stern-Schicht mit dem Partikel zur Anode bzw. Kathode, während die Ionen der diffusen Grenzschicht sich zur entgegengesetzten Elektrode bewegen. Dabei entsteht zwischen der Stern- und der diffusen Grenzschicht ein Potential, das Zetapotential.

Die Berechnung des Zetapotentials nach der Helmholtz-Smoluchowski-Gleichung ist an enge Bedingungen geknüpft. Sie gilt nur dann, wenn das Produkt aus dem kleinsten Krümmungsradius des Partikels (r) und der reziproken Dicke der diffusen Grenzschicht

(k) $k \cdot a > 100$ beträgt. Diese Bedingung ist erfüllt für Partikel mit einem Radius > 10 nm und verdünnte Elektrolytlösungen, jedoch z.B. nicht für destilliertes Wasser.

Die Messung in verdünnten Elektrolyten (z.B. 1 mM NaCl) stellt hohe Anforderungen an die Meßmethodik. Da unter diesen Bedingungen der pH-Wert vor allem im neutralen Bereich bereits durch geringe Mengen an CO_2 stark verändert wird, muß die Messung unter vollständig oder zumindest weitgehend CO_2 -freien Bedingungen erfolgen. Auch ist der geringen Stabilität der Organismen unter den Verhältnissen eines starken osmotischen Stresses Rechnung zu tragen.

Unter physiologischen Bedingungen ist aufgrund der erhöhten Elektrolytkonzentration die diffuse Grenzschicht jeweils stark gestaucht. Unter diesen Bedingungen kann aus der elektrophoretischen Mobilität nicht direkt auf das Zetapotential geschlossen werden. Die Messung der elektrophoretischen Mobilität erlaubt jedoch eine näherungsweise Berechnung der auf der Bakterienoberfläche vorhandenen Ladungsdichte unter den vorhandenen realen Bedingungen. Dabei ist zu berücksichtigen, daß die Nettoladung der Mikroorganismen unter realen Bedingen stets deutlich geringer ist, als dies durch das Zetapotential, gemessen in verdünnter Elektrolytlösung ausgedrückt wird. Diese Tatsache beruht einerseits auf der Kompression der diffusen Grenzschicht, andererseits ist auch der Dissoziationsgrad der Ladungsträger von der Ionenstärke des umgebenden Mediums abhängig und unter physiologischen Bedingungen stets geringer, als in stark verdünnten Elektrolyten. Weiterhin diskutieren verschiedene Autoren, daß durch die geringere Dicke der diffusen Grenzschicht bei hoher Ionenstärke die Oberflächenrauheit der Bakterienoberfläche verstärkt zum Tragen kommt und unter diesen Bedingungen die Ladungsträger in den „Tälern“ nicht vom elektrophoretischen Feld erfaßt werden können [5. 82].

Anhand von thermodynamischen Berechnungen kamen Giese et al. [5. 31] zu dem Schluß, daß für Partikel mit einem Zetapotential von weniger als -25 bis -30 mV die elektrostatischen Wechselwirkungen gegenüber den polaren Lewis - Säure - Base- und auch gegenüber den Lifshitz - van der Waals - Wechselwirkungen vernachlässigbar sein sollten. Die meßbare Nettoladung von Mikroorganismen bewegt sich unter physiologischen Bedingungen in diesem Potentialbereich und liegt meist zwischen 0 und -30 mV. Dennoch wurde in vielen Fällen eine deutliche Abhängigkeit der primären Adsorption von elektrostatischen Wechselwirkungen festgestellt [5. 66, 5. 101]. Wie im folgenden noch gezeigt werden soll, werden die Auswirkungen der bakteriellen Oberflächenladung auf das Adsorptionsverhalten weniger von der Nettoladung, sondern vielmehr durch die Art der Ladungsträger und ihrer Anordnung auf der Bakterienoberfläche bestimmt. Für die Charakterisierung der elektrostatischen Eigenschaften ist deshalb nicht nur die meßbare Nettoladung von Interesse, sondern

auch ihre Abhängigkeit vom pH-Wert. Da die Dissoziation geladener Gruppen auf der Bakterienoberfläche nicht nur von der Ionenstärke des umgebenden Mediums, sondern auch vom pH-Wert abhängig ist, können die Zetapotentialkurven als Funktion des pH-Wertes nach unseren Erfahrungen wertvolle Aufschlüsse über die Art der vorhandenen Ladungsträger geben. Die von uns ermittelten Nettoladungsprofile von Organismen aus zahlreichen unterschiedlichen Systemen lassen den Schluß zu, daß die Zetapotentialkurven stärker als alle anderen Parameter mit den Substraten korreliert sind, die von den jeweiligen Organismen verwertet werden können [5. 57] (vgl. auch Tabelle 5.6). Einige charakteristische Beispiele sind in Abbildung 5.7 bis Abbildung 5.9 zusammengestellt. Abbildung 5.7 zeigt die Zetapotentialkurven von Denitrifizierern, isoliert aus einem anaeroben Modellreaktor zur Elimination von Nitrat aus Sickerwasser [5. 57]. In der dargestellten Untersuchung zeigten alle isolierten Organismen ein vergleichbares Zetapotentialprofil. Alle untersuchten Organismen verwerteten gleichfalls Methanol als Hauptkohlenstoffquelle.

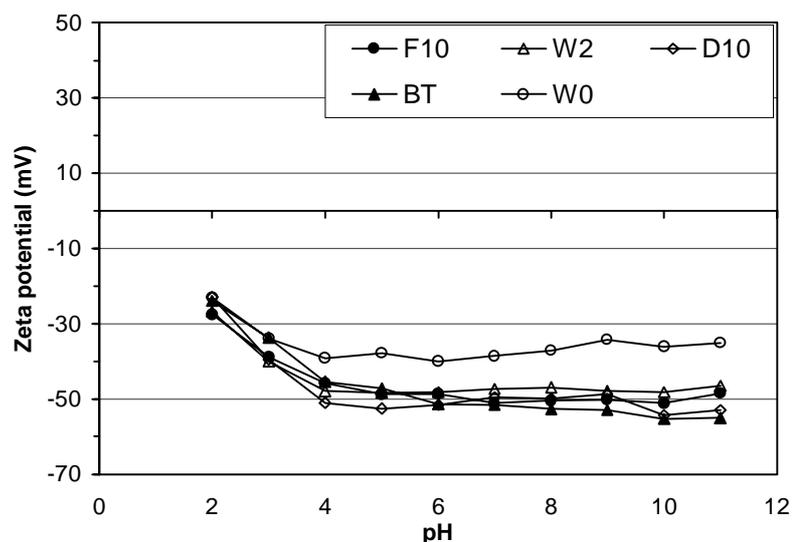


Abbildung 5.7: Zetapotentialkurven denitrifizierender Organismen aus einer Modellanlage zur Stickstoffelimination aus Sickerwasser [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$

Wurden in einem adaptierten System Organismen mit abweichender Potentialkurve gefunden, so war in den meisten Fällen auch mit einem abweichenden Substratspektrum dieser Organismen zu rechnen. In Abbildung 5.8 sind die Zetapotentialkurven von verschiedenen Isolaten aus einer Versuchsanlage zum Abbau von Phenol, Kresolen und Xylenolen aus Grundwasser dargestellt. Während die Isolate SCH1 bis SCH4 und SCH8 sowohl vergleichbare Zetapotentialkurven wie auch ein vergleichbares Substratspektrum

aufwiesen, waren die Isolate SCH5 und SCH7 nicht zum Abbau der untersuchten aromatischen Verbindungen befähigt. SCH6 hingegen verwertete auch höherkondensierte Aromaten. Zum Vergleich wurde der Stamm PheB2 in die Abbildung aufgenommen. PheB2 repräsentiert die kultivierbaren Organismen der Population aus einer kontinuierlichen Versuchsanlage zum Abbau von 3,4-Dimethylphenol als einzige Kohlenstoff- und Energiequelle. Dieses Isolat zeigt erwartungsgemäß ein vergleichbares Zetapotentialprofil, wie die Aromatenabbauer aus der Versuchsanlage zur Grundwasserreinigung.

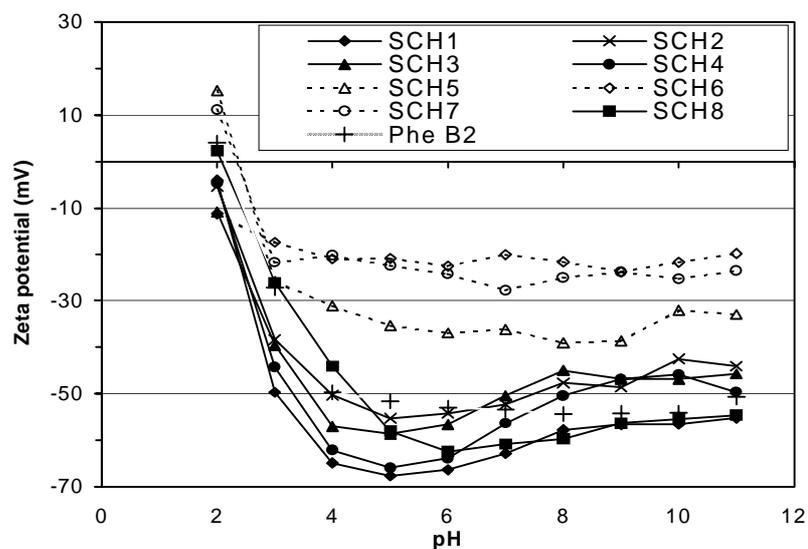


Abbildung 5.8: Zetapotentialkurven von Organismen aus einer Modellanlage zur Eliminierung von Phenol und Kresolen bzw. Xylenolen [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$

Auch Isolate aus Industriekläranlagen mit einem breiter angelegten Substratspektrum zeigten eine vergleichsweise geringe Variation der Zetapotentialprofile (Abbildung 5.9). Die isolierbaren Organismen stimmten dabei weitgehend mit dem Potentialprofil der Gesamtpopulation überein.

Bemerkenswert ist, daß adaptierte Systeme eine deutlich geringere Variation aufweisen, als solche die sich noch in der Adaptionphase befinden. Abbildung 5.10 zeigt die Änderung der Zetapotentialverteilung und der Halbwertsbreiten der Potentialverteilung einer Modellkläranlagen, die mit dem gleichen Abwasser wie bei Abbildung 5.9 betrieben wurde, während der Adaptionphase.

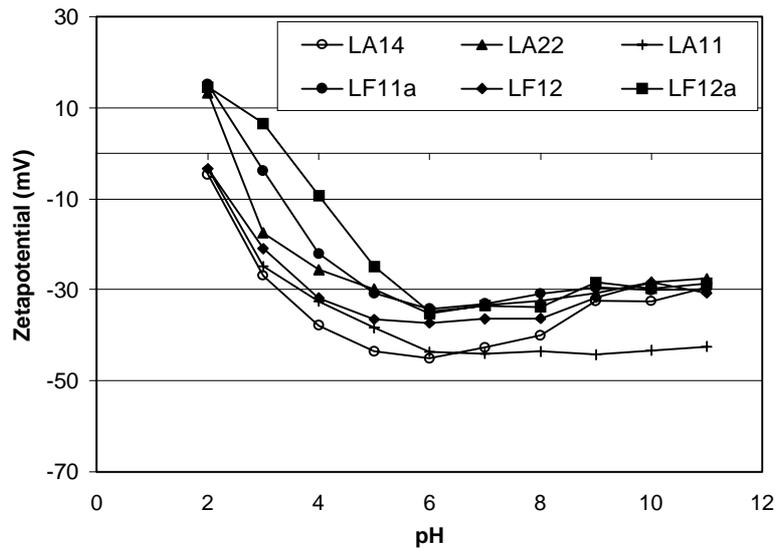


Abbildung 5.9: Zetapotentialkurven von Organismen aus einer Industriekläranlage, die vornehmlich Kohlenwasserstoffe und Alkylsulfonate, aber auch aliphatische Amine eliminiert [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$

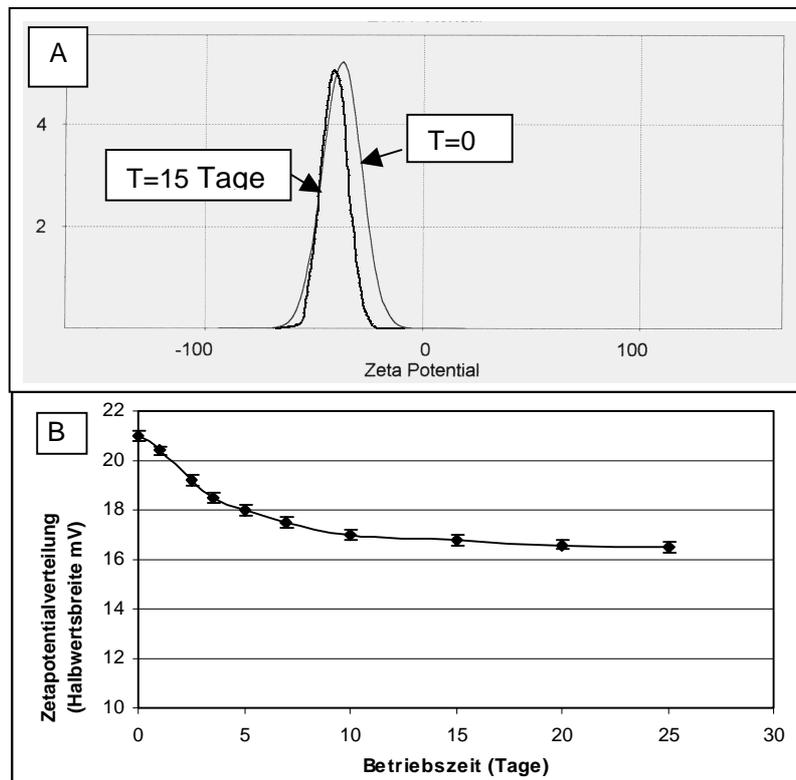


Abbildung 5.10: Variabilität des Zetapotentials der Organismen einer Modellkläranlage in Abhängigkeit von der Betriebszeit der Anlage. A: Zetapotentialverteilung zu Versuchsbeginn und nach 15 Tagen Betriebsdauer. B: Zeitliche Änderung der Halbwertsbreiten der Zetapotentialverteilung während der Adaption.

Im Gegensatz zu der relativ geringen Variationsbreite von Organismen mit vergleichbarem Substratspektrum, zeigten solche mit stark unterschiedlichem Abbauverhalten auch deutlich verschiedene Zetapotentialkurven (Abbildung 5.11).

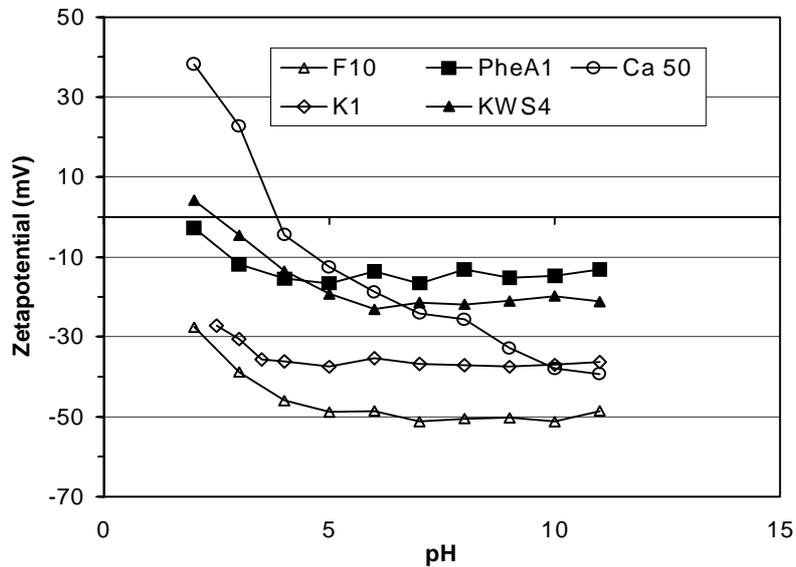


Abbildung 5.11: Zetapotentialkurven von Organismen mit unterschiedlichem Substratspektrum [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$

F10: Methanol
PheA1: 3,4-Dimethylphenol
Ca 50: Chlornitrobenzole
K1: Tetrahydrofuran
KWS4: n-Alkane

Die festgestellte geringe Variation der Zetapotentialkurven von Organismen mit vergleichbarem Substratspektrum weisen auf eine gewisse Ähnlichkeit der dissoziierbaren Oberflächenstrukturen hin. Für ein bestimmtes Substrat existierten in den untersuchten Fällen jeweils nur ein oder wenige Typen von Zetapotentialkurven. So wurden für eine Reihe von Organismen, die zum Abbau von zyklischen Ethern befähigt waren, hinsichtlich der Netto-Oberflächenladung zwei voneinander verschiedene Strukturtypen festgestellt (Abbildung 5.12). Dabei ist bemerkenswert, daß die untersuchten Organismen in unterschiedlichen Laboratorien und aus verschiedenen Quellen isoliert wurden. Die gefundenen Zetapotentialkurven waren jedoch nicht mit der Isolation oder den jeweiligen Quellen korreliert.

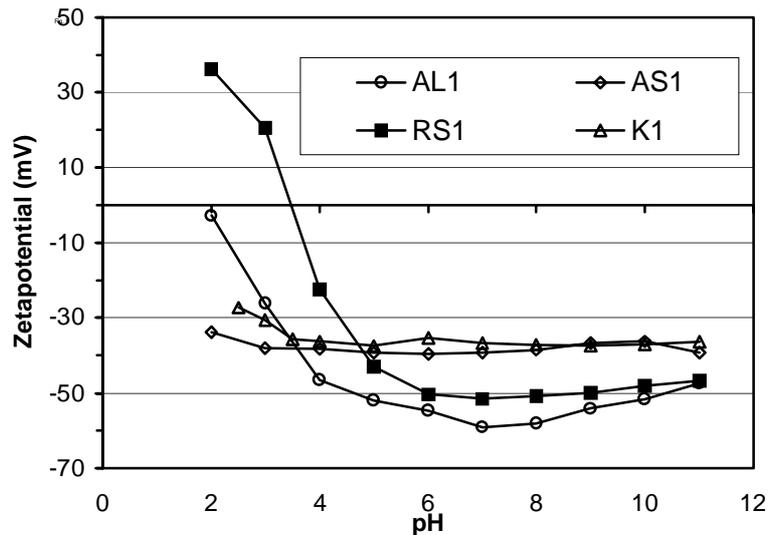


Abbildung 5.12: Zetapotentialkurven von Organismen, die zur Spaltung von Etherstrukturen befähigt sind [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Pelletier et al. [5. 69], die bei der Analyse von 8 unterschiedlichen *Lactobacillus*-Stämmen zwei charakteristische Strukturtypen feststellten. Milsap et al. [5. 60] fanden eine Korrelation solcher Strukturtypen mit der genetischen Verwandtschaft der Organismen. In jüngsten Untersuchungen beschreiben Reid et al. [5. 75] vier *Lactobacillus*-Stämme, von denen sich jeweils zwei hinsichtlich ihrer Oberflächeneigenschaften deutlich von den beiden anderen unterscheiden. Auffallend ist auch für diese Organismen ein charakteristisches Zetapotentialprofil. Bemerkenswert ist dabei die Tatsache, daß die beiden beschriebenen Strukturtypen jeweils mit dem Vorhandensein bzw. dem Fehlen eines zusätzlichen Plasmides korreliert waren. Erwähnenswert sind in diesem Zusammenhang auch die Ergebnisse von Groenink et al. [5. 38] bei der Analyse der Oberflächeneigenschaften von 4 *Actinobacillus actinomycetemcomitans* Stämmen. Während die Zetapotentialkurven von zwei frischen Isolaten weitgehend vergleichbar waren, zeigten zwei weitere aus Laborkulturen mehr oder weniger deutliche Abweichungen von diesem Typus. Dieses Ergebnis bestätigt die Resultate eigener Untersuchungen [5. 57], wonach eine längere Kultivierung in komplexen Medien zu signifikanten Veränderungen der bakteriellen Oberfläche und einer zunehmenden Variabilität der Oberflächeneigenschaften führen kann (vgl. Abbildung 5.24 und Abbildung 5.25 in Abschn. 5.1.2.1.3).

Die offensichtlich geringe Variationsbreite der Netto-Oberflächenladung kann bei der Etablierung von Abbaupotentialen in vorhandenen Populationen von erheblicher

Bedeutung sein. Dabei spielen die Wechselbeziehungen von Substrat- und Ladungseigenschaften sicher nicht nur zufällig eine herausragende Rolle. Damit ein bestimmtes Substrat von einem Bakterium verwertet werden kann, muß dieses zunächst genügend nahe an die Bakterienoberfläche herankommen, um dann von spezifischen Transportmechanismen oder auch unspezifisch durch Diffusion von der Zelle aufgenommen zu werden. Dabei sind jene Organismen bevorteilt, die von einem energetisch geringen Aufwand für den Substrattransport profitieren. Gerade im long range Bereich kommt jedoch, wie in Abschn. 5.1.1 gezeigt wurde, den elektrostatischen Kräften eine wesentliche Bedeutung zu. Aus diesem Grunde ist es durchaus nicht verwunderlich, daß die Freiheitsgrade für eine mikrobielle Population und für die Verwertung eines bestimmten Substratspektrums vor allem in Bezug auf die elektrostatischen Eigenschaften relativ begrenzt sind. Dieser begrenzten Variationsbreite muß bei der Etablierung von Organismen mit bestimmten Abbaupotentialen in einer mikrobiellen Population Rechnung getragen werden. Entsprechend kann die Änderung der Oberflächeneigenschaften des Substrates oder der Organismen im Einzelfall auch erhebliche Verschlechterungen der Abbauleistung nach sich ziehen. Das Vorhandensein enger Wechselbeziehungen von Substrat und Oberflächenstruktur ist u.a. eine mögliche Erklärung für die sehr unterschiedlichen Effekte, die für den Einsatz oberflächenaktiver Substanzen bei der Mobilisierung hydrophober Verbindungen während der Bodensanierung beschrieben werden. Das primäre Ziel dieser Maßnahmen besteht vor allen darin, solche meist adsorptiv gebundenen Verbindungen in die wäßrige Phase zu überführen, wo sie für die vorhandenen Mikroorganismen besser zugänglich sein sollten. Die dabei erzielten Ergebnisse reichen jedoch von der Verbesserung bis hin zur vollständigen Einstellung des biologischen Abbaus [5. 105]. Bei diesen Maßnahmen ist zu berücksichtigen, daß durch den Tensideinsatz mittels Emulsions- bzw. Micellenbildung die Oberflächeneigenschaften des Substrates verändert werden. Dies bedingt einerseits eine verbesserte Wassermischbarkeit, kann aber andererseits die Kompatibilität mit der Oberfläche der entsprechenden Organismen einschränken und so den Transport des Substrates hin zur Zelloberfläche beeinträchtigen. Eine Bestätigung dieser Annahmen findet sich z.B. bei Stelmack [5. 84]. Die dort beschriebenen Untersuchungen zeigen eine deutliche Verringerung des Kontaktes zwischen nicht wasserlöslichen Substraten und Mikroorganismen unter dem Einfluß von verschiedenen Tensiden. Selbst jene Organismen, die bereits adsorptiv an den Substrattropfen angelagert waren, wurden unter dem Einfluß der Tenside wieder abgelöst.

In einzelnen Fällen können zugesetzte Spezialisten zu Konflikten mit den Oberflächeneigenschaften der vorhandenen Population führen bzw. die energetisch optimale Verwertung eines bestimmten Substrates kann Einschränkungen bei der

Verwertung eines anderen verursachen. Besonders problematisch wird die Situation, wenn die gewünschte Abbauleistung durch genetische Manipulation etabliert werden soll. Häufig wird der gewählte Target-Organismus hinsichtlich seiner Oberflächeneigenschaften nicht mit den für dieses Substrat üblichen Zelloberflächenstrukturen übereinstimmen, was u.U. zu einem erheblichen Nachteil in Konkurrenz zu kooperativ strukturierten Zellaggregaten führen kann.

Andererseits sind vor allem im medizinischen Bereich verschiedene Organismen bekannt, die eine sogenannte „Co-Adhäsion“ eingehen [5. 10]. Durch die Wechselwirkung spezifischer Oberflächenstrukturen der co-aggregierenden Partner können dabei die Oberflächeneigenschaften der einzelnen beteiligten Organismen verändert werden. Dadurch entstehen lokal begrenzt neue Bedingungen, die u.U. für die beteiligten Bakterien einen Selektionsvorteil bedeuten. Inwieweit die von uns aus verschiedenen Biofilmen isolierten Organismen mit einem abweichenden Ladungsprofil und meist auch abweichender Substratspezifität (vgl. u.a. Abbildung 5.8) die Aufgabe einer solchen „Optimierung der lokalen Umweltbedingungen“ der Organismen (beispielsweise durch Stabilisierung der Festigkeit des Biofilmes) übernehmen, konnte bisher nicht geklärt werden. Versuche zur Identifizierung co-aggregierender Paare waren bisher nicht erfolgreich.

Mit Hilfe des Zetapotentials lassen sich wichtige Schlußfolgerungen hinsichtlich der elektrostatischen Eigenschaften und damit auch hinsichtlich des adsorptiven Verhaltens von Mikroorganismen ableiten. In einigen Fällen können aus der Kenntnis von freier Oberflächenenergie und elektrostatischer Abstoßung bereits gute Voraussagen über das adsorptive Verhalten der jeweiligen Organismen an bestimmten Trägermaterialien getroffen werden. In anderen Fällen zeigen jedoch Organismen mit ähnlicher Hydrophobizität und vergleichbarer Nettoladungsstruktur deutlich verschiedene adsorptive Eigenschaften. Ein Beispiel für unterschiedliche adsorptive Eigenschaften geben die denitrifizierenden Organismen, deren Oberflächeneigenschaften in Abbildung 5.7 bzw. Tabelle 5.6 näher charakterisiert werden. Dieses unterschiedliche Adsorptionsverhalten kann einerseits darin begründet sein, daß einzelne Organismen spezifische Strukturen ihrer Oberfläche für die Adsorption einsetzen (vgl. Abschn. 5.1.2.1.2.1), die durch die makroskopischen physiko-chemischen Parameter nicht ausreichend erfaßt werden. Ein charakteristisches Beispiel dafür ist der von uns charakterisierte *Bacillus niacini* W0. Andererseits stellt das Zetapotential lediglich ein Maß für die Netto-Oberflächenladung dar, gibt also keinerlei Aussagen über Art und Dichte der tatsächlich vorhandenen Ladungsträger. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß nach Untersuchungen von Sherbert und Lakshmi [5. 82] bei der zur Bestimmung des Zetapotentials verwendeten

Partikelelektrophorese nur der äußere Oberflächenbereich von ca. 1 nm Tiefe erfaßt wird. Damit gestattet die mittels Zetapotentialmessung erfaßte Netto-Oberflächenladung lediglich eine Einschätzung der elektrostatischen Wechselwirkungen im long range Bereich. Bei der irreversiblen Bindung von Mikroorganismen an eine Oberfläche können jedoch auch direkte Ionenbeziehungen eine Rolle spielen. Deshalb sind zusätzliche Informationen über Art und Anzahl der tatsächlich für adsorptive Wechselwirkungen verfügbaren Ladungen von großem Wert. Eine Möglichkeit, Aussagen über diese tatsächlich verfügbaren Ladungen zu gewinnen, bietet nach unseren Untersuchungen die potentiometrische Mikrotitration.

Methoden der konduktometrischen oder potentiometrischen Titration wurden in den siebziger Jahren vor allem bei der Charakterisierung der Oberflächenladung von polymeren Ionenaustauscherharzen eingesetzt [5. 87, 5. 91]. In Anlehnung an die technischen Austauscherpolymeren können auch Bakterien als allerdings sehr elastische Ionenaustauscher aufgefaßt werden, die zu einer reversiblen Adsorption von Kationen und Anionen befähigt sind. Gegenwärtig findet die Titration vor allem als Polymertitration für die technische Bewertung der Reaktion von Belebtschlammflocken mit ionischen Flockungsmitteln Verwendung [5. 81].

In der klassischen Polymerchemie werden die erhaltenen Titrationskurven meist direkt ausgewertet. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Störanfälligkeit der Methode ist es jedoch nach unseren Erfahrungen besser, die Differenzkurve zwischen dem verwendeten Medium und dem Versuchsansatz zu verwenden. Dazu ist ein effektives Datenerfassungssystem für die kontinuierliche Speicherung und Bearbeitung der Titrationsdaten erforderlich, welches durch Kopplung des Meßsignals über eine leistungsstarke AD-Wandlerkarte mit einer PC-gestützten Auswertung realisiert wurde. Die in dieser Arbeit dargestellten Untersuchungen wurden mittels potentiometrischer Titration durchgeführt. Eine ausführliche Methodenbeschreibung findet sich im Anhang (Abschn. A.1.j, S. vi). Charakteristische Titrationskurven von Medium und Organismen mit unterschiedlichen Oberflächeneigenschaften sind in Abbildung 5.13 dargestellt.

Vorteile der Mikrotitration gegenüber der Partikelelektrophorese ergaben sich vor allem hinsichtlich der höheren Auflösung der Kurven. Eine meßbare Nettoladung kann sowohl durch eine geringe Anzahl gleicher Ladungsträger erzeugt werden, wie auch durch eine Vielzahl gegensätzlich geladener Gruppen, deren Ladungen sich gegeneinander aufheben. Weiterhin sind bei der Zetapotentialmessung in gering konzentrierten Elektrolyten schon pH-Unterschiede von einer pH-Einheit vor allem im Bereich zwischen pH 6 und 8 nur schwer einzuhalten. Dagegen konnten mittels Mikrotitration noch pH-Unterschiede von 0,1 pH-Einheiten und Titrationsvolumina von 1 µl gut ausgewertet werden. Damit war es auch möglich, Dissoziationsbereiche verschiedener Ladungsträger

relativ gut erkennen, die durch Zetapotentialkurven kaum auflösbar sind. Aminogruppen (in Form von α -Aminogruppen, ϵ -Aminogruppen oder Guanidylgruppen) besitzen einen pKa im Bereich von pH 7,5 bis 9, wurden also in pH-Bereichen >7 titriert. Dagegen wird der pH-Bereich für Carboxylgruppen üblicherweise mit 3,2 bis 4,5 angegeben [5. 82]. PO_4^{2-} - und SO_3^- -Gruppen dissoziieren in einem Bereich von $\text{pH} < 3,5$ und konnten mit der dargestellten Methode nur teilweise oder gar nicht erfaßt werden. Gleiches gilt für aromatische Hydroxylgruppen, die erst oberhalb von pH 11 dissoziieren.

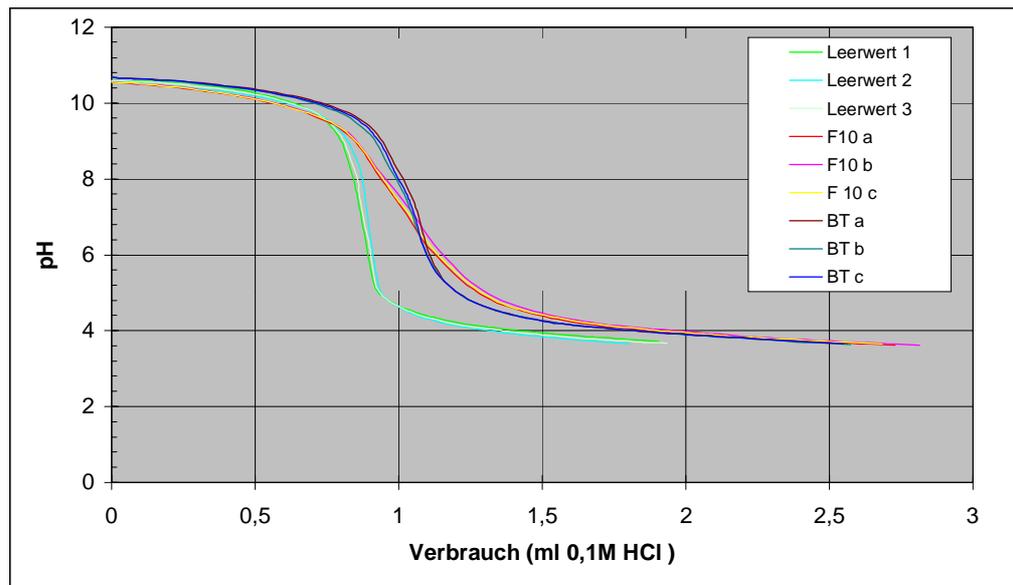


Abbildung 5.13: Titrationskurven für zwei ausgewählte Organismen (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* F10, *Pseudomonas spec.* BT)

Ein weiterer wichtiger Vorteil der Mikrotitration gegenüber der Zetapotentialmessung ergibt sich aus der Möglichkeit, die Messungen ohne erhebliche Störungen unter physiologischen Bedingungen durchzuführen. Dennoch besitzt die Mikrotitration gegenüber anderen Methoden auch erhebliche Nachteile, die bei der Bewertung der Versuchsergebnisse beachtet werden müssen. Ein wesentlicher Nachteil ist die vergleichsweise lange Versuchszeit. Da sich die Dissoziationsgleichgewichte nur langsam einstellen, kann die Titration nur sehr langsam erfolgen, was je nach Organismen zu Versuchszeiten zwischen 15 min und mehr als einer Stunde führte. In solchen Zeiträumen muß auch mit einer Freisetzung von Ionen aus dem Zellinneren gerechnet werden. Bei der verwendeten 150 mM NaCl-Lösung als Meßmedium war die als Potentialänderung meßbare Zellschädigung jedoch gering. Desweiteren ist zu berücksichtigen, daß durch Änderungen des Dissoziationsgrades einzelner Ladungsträger Änderungen der Oberflächenstruktur auftreten können, wodurch sich die Verfügbarkeit anderer Ladungsträger drastisch ändern kann. Eine wesentliche Fehlerquelle ist der Eintrag von

CO₂, welches bei der hohen Empfindlichkeit des Meßsystems mit erfaßt wird. Die Arbeit mit CO₂-freien Medien war daher eine Grundvoraussetzung der Methode.

Trotz dieser erheblichen Nachteile stellt die Mikrotitration eine wertvolle Ergänzung der elektrophoretischen Methoden dar. So wird erst durch die Mikrotitration deutlich, daß die denitrifizierenden Organismen aus Abbildung 5.7 bei vergleichbaren Zetapotentialprofilen in der Verteilung der Ladungsträger erhebliche Unterschiede aufweisen (Abbildung 5.14).

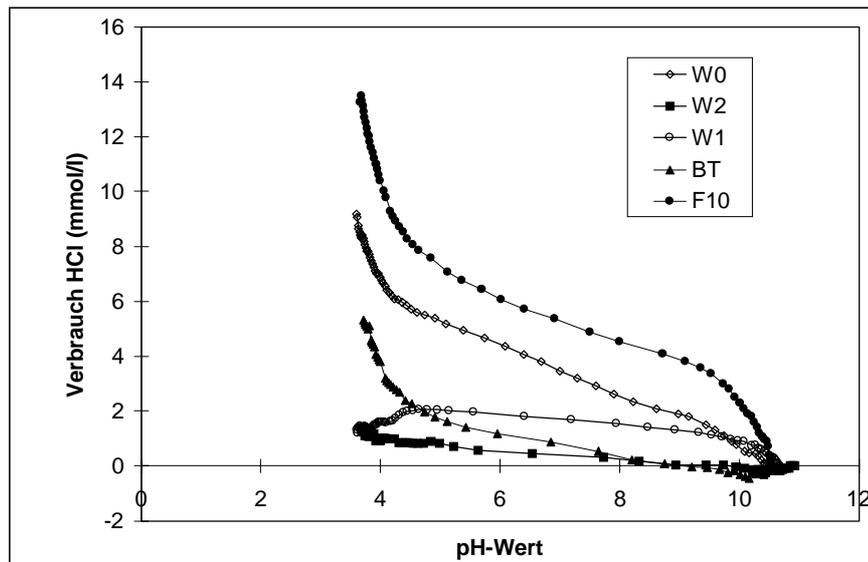


Abbildung 5.14: Potentiometrische Differenztitrationskurven verschiedener denitrifizierender Organismen. Die dargestellten Kurven zeigen den Durchschnitt von 3 unabhängigen Messungen bei einer Standardabweichung von $\leq 3\%$.

Die Gram positiven Kokken (*Staphylococcus spec.* W1 und *Artrobacter spec.* W2) wiesen im titrierbaren Bereich kaum Ladungsträger auf. Dies deutet darauf hin, daß die Nettoladung vornehmlich durch negative Ladungen und hier vor allem durch Phosphatgruppen erzeugt wird. Hingegen zeigten die drei anderen Organismen (*Bacillus niacini* W0, *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F10 und *Pseudomonas spec.* BT) einen deutlichen Anteil an Carboxylgruppen mit einer meßbaren Säurekapazität im Bereich $< \text{pH } 4,5$. Für die Stämme W0 und F10 kamen unterschiedliche Gehalte titrierbarer Aminogruppen im pH-Bereich $> \text{pH } 7$ hinzu. Diese unterschiedliche Zusammensetzung der äußeren Oberfläche wirkte sich erheblich auf das Adsorptionsverhalten der Organismen aus. Dabei konnten durch Adsorptionsexperimente an definierten Modelloberflächen zwei charakteristische Typen unterschieden werden. Für Arten mit geringer Anzahl geladener Oberflächengruppen, wie dem dargestellten *Pseudomonas spec.* BT (vgl. Abbildung 5. 14), stellen Ladungen auf der Trägeroberfläche in den meisten Fällen eher ein Hindernis für die adsorptive Anlagerung dar. Wie Abbildung 5.15 verdeutlicht, zeigten

diese Organismen demzufolge im physiologischen Bereich zwischen pH 5 und pH 8 die geringste Adsorption. In diesem Bereich liegen kationische Aminogruppen und auch die anionischen Ladungsträger in dissoziierter Form nebeneinander vor. Dieses Nebeneinander von Anionen und Kationen führte jedoch nicht zu einer Ladungskompensation und damit zu verbesserten Adsorptionseigenschaften der jeweiligen Organismen, sondern verringerte vielmehr die Anlagerung sowohl an anionischen, wie auch an kationischen Oberflächen. Die Struktur der Oberfläche dieser Bakterien ist offensichtlich zu inhomogen und die Ladungsdichte zu gering, um eine effektive Wechselwirkung anionischer und kationischer Gruppen zu ermöglichen.

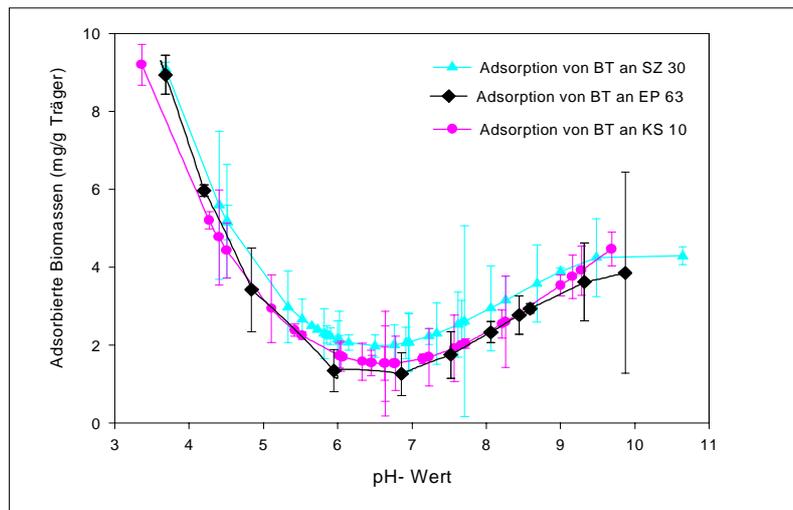


Abbildung 5.15: Adsorption von *Pseudomonas spec.* BT an verschiedene Modellträger. Die Ladungsträgerdichte der Organismen ist gering und überwiegend durch anionische Gruppen geprägt. Verwendete Träger: EP 63: Polystyren unmodifiziert, KS10: Polystyren anionisch (modifiziert mit $-\text{SO}_3^-$), SZ 30: Polystyren kationisch (modifiziert mit Trimethylammoniumgruppen). Die Struktur der eingesetzten Modellträger, sowie die Methoden werden im Abschn. 6 (Tabelle 6.1) erläutert.

Eine Verringerung des Dissoziationsgrades sowohl der anionischen Ladungsträger im Bereich $\text{pH} < 6$, wie auch der kationischen im Bereich $\text{pH} > 7,5$ führte entsprechend zu einer deutlichen Erhöhung der Anzahl der adsorbierten Organismen. Dabei war eine sehr gute Korrelation zwischen der Änderung der Adsorption und der Anzahl der im jeweiligen pH-Bereich titrierbaren Ladungen erkennbar (Abbildung 5.16). Wie Abbildung 5.15 weiterhin verdeutlicht, hat die Ladung der verwendeten Träger bei Organismen vom Typ *Pseudomonas spec.* BT, die nur eine geringe Ladungsdichte aufweisen, nahezu keinen Einfluß. Die meßbaren Unterschiede der Adsorption dieser Bakterien an den verschiedenen Modellträgermaterialien (vgl. Abschn. 6) waren nur gering und nicht signifikant. Spezifische ionische Wechselwirkungen scheinen für diese Organismen also

im Gegensatz zu den repulsiven makroskopischen Wirkungen eine nur untergeordnete Rolle zu spielen.

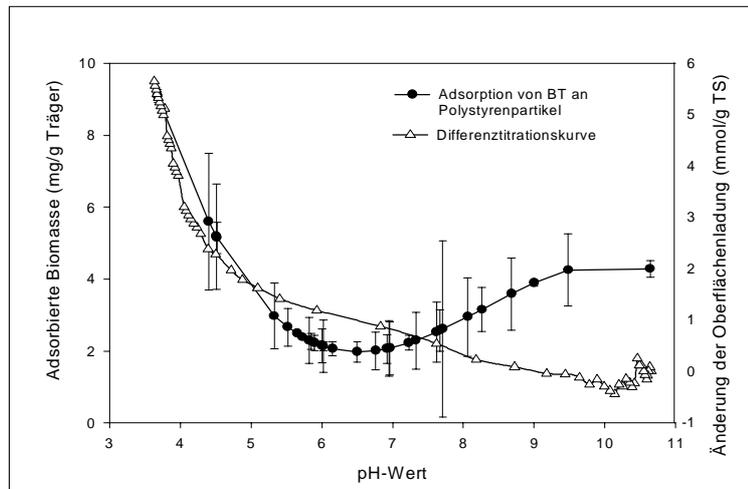


Abbildung 5.16: Adsorptionsverhalten von *Pseudomonas spec.* BT. in Abhängigkeit vom pH-Wert und die Differenztitrationkurve der Organismen. Die Änderung der Anzahl der adsorbierten Organismen steht in guter Übereinstimmung mit der Dissoziation der geladene Gruppen der Bakterienoberfläche.

Deutlich anders verhalten sich Organismen mit einer hohen Dichte anionischer und kationischer Ladungen. Als Beispiel dieses Organismenstyps ist in Abbildung 5.17 das Adsorptionsverhalten von *Bacillus niacini* W0 unter aeroben Bedingungen dargestellt.

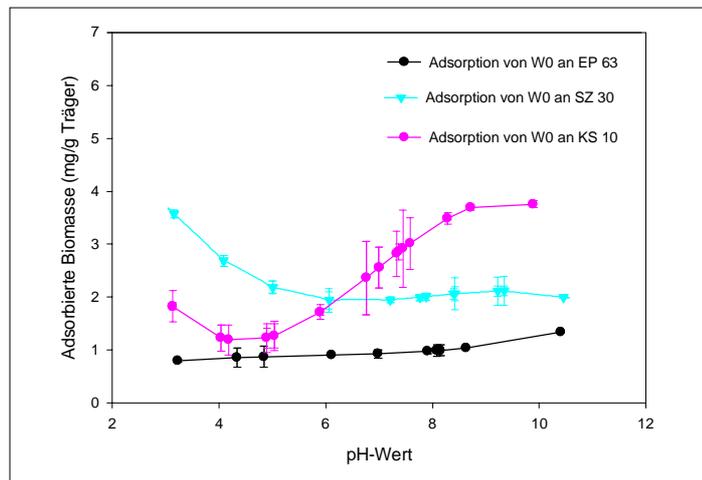


Abbildung 5.17: Adsorption von *Bacillus niacini* W0 an verschiedene Modellträger. Die Ladungsträgerdichte der Organismen ist vergleichsweise hoch und durch anionische und kationische Gruppen geprägt. EP 63: Polystyren unmodifiziert, KS10: Polystyren anionisch (modifiziert mit $-\text{SO}_3^-$), SZ 30: Polystyren kationisch (modifiziert mit Trimethylammoniumgruppen). Die Struktur der eingesetzten Modellträger, sowie die Methoden werden im Abschn. 6 (Tabelle 6.1) erläutert.

Diese Organismen zeigten im gesamten pH-Bereich mit einem ungeladenen Polystyrenträger eine geringe Adsorption. Die elektrostatische Abstoßung überwiegt hier also deutlich die attraktiven Kräfte. Wurden jedoch negativ geladene Trägermaterialien eingesetzt, so nahm die Menge der adsorptiv gebundenen Organismen oberhalb von pH 5 deutlich zu. Andererseits erhöhte sich unterhalb von pH 6 die Adsorption an positiv geladene Trägermaterialien. Diese Resultate lassen den Schluß zu, daß Organismen mit hoher Ladungsdichte in ihrer Zelloberfläche auch über Bereiche verfügen, die zu spezifischen, d.h. ionischen Wechselbeziehungen mit der Trägeroberfläche befähigt sind.

Die dargestellten Beispiele verdeutlichen, daß die elektrostatischen Eigenschaften der bakteriellen Oberfläche nicht nur in einem engen Wechselverhältnis mit den verwerteten Substraten stehen, sondern gleichzeitig auch erheblichen Einfluß auf das Adsorptionsverhalten der Zellen ausüben. Sie sind entsprechend bei der Optimierung von Biofilmsystemen besonders zu berücksichtigen. Wie gezeigt wurde, genügt dabei jedoch in vielen Fällen die Nettoladung allein nicht, sondern es sind vor allem die tatsächlichen Ladungsverteilungen zu beachten.

Neben der aufwendigen Mikrotitration besteht eine weitere Möglichkeit, Einblicke in die Ladungsverhältnisse an der Oberfläche von Mikroorganismen zu erlangen, in der Messung der Adsorptionskapazität für ionische Farbstoffe. Von verschiedenen Autoren wurden z.B. Kristallviolett für die Bestimmung der negativen Ladungszentren und Orange II für die Messung positiver Ladungen eingesetzt (Abbildung 5.18).

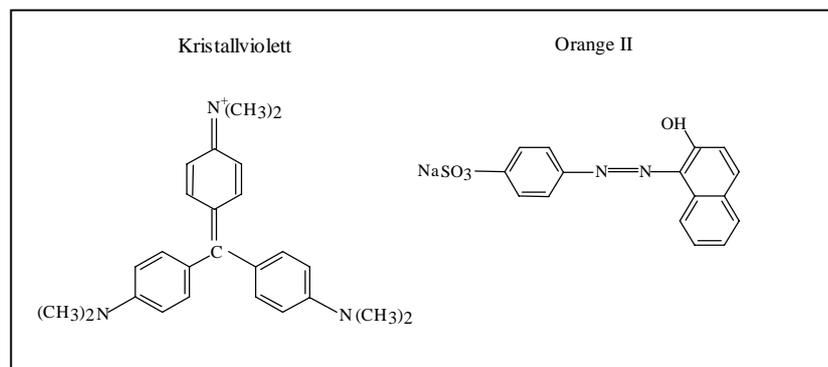


Abbildung 5.18: Strukturen von Kristallviolett und Orange II

Wie jedoch Tabelle 5.6 verdeutlicht, war die Aussagekraft dieser Methoden in unseren Untersuchungen vergleichsweise gering. Die Ergebnisse der Bestimmung der anionischen Ladungsträger wiesen nur geringe Differenzen auf. Sie scheinen jedoch hinsichtlich ihrer Aussage tendenziell mit denen der Zetapotentialmessung übereinzustimmen. Kationische Ladungen waren hingegen kaum nachweisbar. Die

verwendete Methode kann somit kaum als Maß für die tatsächliche Dichte kationischer Ladungen auf Bakterienoberflächen dienen. Die eingesetzten ionischen Farbstoffe scheinen im wesentlichen nur mit Ladungsträgern der äußeren Oberfläche in Wechselwirkung zu treten. Deshalb kann die Adsorption von Orange II günstigstenfalls einen Hinweis auf die Anordnung kationischer Ladungsträger im Bereich der äußeren Bakterienoberfläche liefern.

Auch andere bisweilen verwendete Methoden, wie Ionenaustauschchromatographie oder Chromatofocussierung haben sich in unseren Untersuchungen wenig bewährt. Der hohe Anteil unspezifischer Wechselwirkungen bei der Verwendung gepackter Säulen ließ kaum reproduzierbare Ergebnisse zu.

Eine gute Ergänzung der bereits beschriebenen Methoden war dagegen die isoelektrische Focussierung (IEF). Diese Form der Elektrophorese beruht auf der Trennung geladener Teilchen in einem pH-Gradienten entsprechend ihrem isoelektrischen Punkt (IEP). Der notwendige pH-Gradient wird dabei durch eine Anordnung titrierbarer amphoterer Peptide erzeugt, die unterschiedliche pKa-Werte besitzen und sich selbst im elektrischen Feld gemäß ihrer Ladung bewegen. Für die IEF gelten die gleichen elektrokinetischen Gesetzmäßigkeiten und Einschränkungen, wie für die Bestimmung des Zetapotentials. Auch hier muß aufgrund der Partikelgröße auf eine den Gradienten stabilisierende Matrix verzichtet werden. Zur Verminderung des elektroosmotischen Elektrolytstromes und zur Stabilisierung des pH-Gradienten wurde deshalb ein Gradient von 10-60% Glycerol verwendet. Eine ausführliche Beschreibung der von uns verwendeten Methode befindet sich im Anhang (Abschn. A.1.q, S. x). Von anderen Autoren wurde auch Ficoll zur Stabilisierung des Gradienten eingesetzt [5. 43]. Percoll ist hingegen nach den Angaben von Jaspers und Overmann [5. 43] mit den erforderlichen extremen pH-Werten der Elektrodenpuffer nicht kompatibel. Da die IEF Ladungsträger der bakteriellen Oberfläche in einer größeren Tiefe erfaßt, als dies bei der Messung der elektrophoretischen Mobilität möglich ist (Sherbert und Lakshmi geben eine Wirktiefe von ca. 6-7 nm gegenüber nur 1-3 nm bei der Zetapotentialmessung an [5. 82]), liefert diese Methode zusätzliche Informationen über die Oberflächenladung eines Bakteriums. Generell ist dabei festzustellen, daß der isoelektrische Punkt, welcher bei der IEF gemessen wurde, fast stets höher lag als der isoelektrophoretische Punkt, ermittelt durch Messung der elektrophoretischen Mobilität im Zetameter (vgl. Tabelle 5.6).

Auf Grund der Erfassung tieferer Regionen der Bakterienoberfläche werden Variationen in der Oberflächenstruktur einer Population in der IEF besser wiedergegeben als durch die elektrophoretische Mobilität. Ein Beispiel dafür wird in Abschn. 5.1.2.1.3 näher erläutert. Von einigen Autoren wurde die IEF auch zur Quantifizierung einzelner Gruppen von Ladungsträgern auf der bakteriellen Oberfläche eingesetzt. So berechneten Sherbert und

Lakshmi [5. 82] durch Maskierung definierter Gruppen den Anteil von Amino- und Carboxylgruppen auf der Oberfläche von E. coli aus der durch die Maskierung verursachten Verschiebung des IEP. Aufgrund des hohen Aufwandes und der meist nicht vollständigen Umsetzungen bei der Maskierung der ionisierbaren Gruppen hat dieses Verfahren jedoch kaum Verbreitung gefunden. Die bei der isoelektrischen Fokussierung von Partikeln erzielbare hohe Trennschärfe hat jedoch in jüngster Zeit ein neues Anwendungsgebiet erschlossen. Seit die Arbeiten von Amann [5. 86, 5. 106] und anderen Autoren durch den Einsatz von 16S-RNA spezifischen Sonden auf die erheblichen Grenzen bei der Kultivierung der tatsächlich vorhandenen Vielfalt einer bakteriellen Population aufmerksam gemacht haben, sind verschiedene Versuche unternommen worden, das Spektrum der kultivierbaren Organismen zu erweitern. Die IEF ist dabei als Methode für die Anreicherung und Vortrennung von Organismen, welche ansonsten in der Masse der dominanten koloniebildenden Arten untergehen, anwendbar [5. 43].

5.1.2.1.2. Wirkungen einzelner Bestandteile der bakteriellen Oberfläche

Die bakterielle Oberfläche kann heute durch physiko-chemische Methoden in ihren wesentlichsten Eigenschaften und als einheitliches Objekt beschrieben werden. Es wird jedoch im einzelnen immer wieder deutlich, daß die gegenwärtig mögliche Betrachtung der Zelle als physiko-chemische Einheit nicht alle Adsorptionsphänomene erklären kann. Eine Reihe von Untersuchungen zeigt, daß maßgeblich an der Adsorption beteiligte Strukturen der Zelloberfläche lokal begrenzt agieren und deshalb in ihrer spezifischen Wirkung auch selektiv betrachtet werden müssen; zumindest solange, bis genauere physiko-chemische Modelle für die Einbeziehung dieser lokalen Phänomene in das Adsorptionsverhalten der Zelle zur Verfügung stehen.

Zu den wichtigsten Oberflächenbestandteilen, die zu spezifischen Wechselwirkungen mit inerten Oberfläche befähigt sind, gehören Polysaccharide, Lipopolysaccharide und Proteine. Einer besonderen Betrachtung bedürfen auch die Zellanhänge, Flagellen, Fimbrien oder Fibrillen, die aufgrund ihrer Ausdehnung im Raum zu Wechselwirkungen befähigt sind, die erheblich vom Verhalten des Zellkörpers abweichen können.

5.1.2.1.2.1. Extrazelluläre Polysaccharide

Extrazelluläre Polysaccharide (EPS) werden von vielen Bakterienarten synthetisiert. Die Vielzahl der bisher untersuchten und beschriebenen mikrobiellen Polysaccharide zeigt eine große Variation in der Zusammensetzung dieser Substanzgruppe. Charakteristisch für alle Verbindungen scheint jedoch zu sein, daß es sich um Heteropolymere handelt, die

überwiegend aus Neutralzuckern bestehen. Daneben sind unterschiedliche Mengen von Uronsäuren und Acetat- oder Pyruvatsubstituenten in den Molekülen enthalten. Einige Bakterienarten produzieren gar ein ganzes Sortiment unterschiedlicher Verbindungen [5. 26]. Die Strukturen von EPS ausgewählter Organismen werden u.a. von Avanti et al. [5. 1], Grobbs et al. [5. 35], Lemoine et al. [5. 49] und Mc Cornick et al. [5. 61] beschrieben. Eine Übersicht über häufig auftretende Strukturelemente extrazellulärer Polysaccharide gibt Christensen [5. 17].

EPS können einerseits in Form von Kapseln und Schleimen mit der Oberfläche der Mikroorganismen mehr oder weniger fest assoziiert sein, oder frei in das umgebende Medium abgegeben werden. Die letztere Form ist vor allem bei der Modifizierung von Trägeroberflächen in Form des „conditioning film“ von Bedeutung und wird in Abschn. 5.1.2.2. näher betrachtet. Für die adsorptiven Eigenschaften der Bakterienzelle sind im wesentlichen jene Polysaccharide von Interesse, die mit der Bakterienoberfläche assoziiert bleiben. Diese können in Form von Kapseln oder Schleimen die gesamte Oberfläche bedecken oder auch lokal angeordnet sein. EPS, die die Bakterienoberfläche vollständig umschließen, beeinflussen durch ihre Eigenschaften in erster Linie die makroskopischen physiko-chemischen Parameter. Diese Eigenschaften werden durch die qualitative und quantitative Zusammensetzung der gesamten vorhandenen EPS bestimmt.

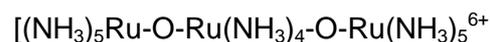
Für die Charakterisierung der EPS stehen mehrere unterschiedliche Methoden zur Verfügung. Dabei ist zu unterscheiden zwischen solchen, die auf der Abtrennung der Polymere und ihrer nachfolgenden Analyse beruhen (extraktive Methoden) und denen, die unter weitgehender Beibehaltung der Zellintegrität erfolgen können. Ein wesentlicher Vorteil der extraktiven Methoden besteht darin, daß die isolierten Verbindungen einer Vielzahl analytischer Methoden zugänglich sind. Problematisch ist jeweils die Unterscheidung zwischen oberflächengebundenen Polysacchariden und denen, die frei im Medium vorliegen. In unseren Untersuchungen bewährt hat sich dabei eine Extraktion in Anlehnung an die von Suci et al. [5. 88], sowie Cammarota und Sant'Anna [5. 14] beschriebenen Methoden. Die Abtrennung der Bakterien mit den oberflächengebundenen Polysacchariden von den EPS des Mediums und die Abtrennung der später gewaschenen, d.h. polysaccharidfreien Zellen erfolgte in unseren Arbeiten jedoch durch Filtration bzw. Filterzentrifugation. Durch diese Modifikation wurde die mechanische Beanspruchung während der Extraktion minimiert und damit der Verlust an Zelloberflächensacchariden gering gehalten. Die Methode wird im Anhang (Abschn. A.1. p, S. ix) ausführlich beschrieben.

Die isolierten Polysaccharide wurden mittels photometrischer Methoden weiter quantifiziert oder für detailliertere Untersuchungen mittels HPLC eingesetzt. Da die

oberflächengebundenen Polysaccharide meist einen hohen Anteil an Neutralzuckern aufweisen, genügte in vielen Fällen bereits die relativ einfache Bestimmung mit der klassischen Phenol-Schwefelsäure-Methode (vgl. Abschn. A.1.bb.13, S. xxiii im Anhang), sofern nur der Gesamtgehalt an Polysacchariden betrachtet werden sollte. Für eine weitere Differenzierung der Polysaccharide wurden in unseren Untersuchungen zusätzlich die Anteile von Hexosaminen und Uronsäuren ermittelt. Hexosamine wurden dabei nach einer modifizierten Elson-Morgan-Reaktion (vgl. Abschn. A.1.bb.11, S. xxii im Anhang) und Uronsäuren nach der Methode von Bitter und Muir [5. 6] (vgl. Abschn. A.1.bb.17, S. xxiv) bestimmt. Da üblicherweise auch Proteine in der Gesamtmenge der oberflächenassoziierten Substanzen enthalten sind, wurde bei der Charakterisierung von oberflächengebundenen EPS zusätzlich der Proteingehalt herangezogen (Lowry-Methode).

Eine detaillierte Analyse der Neutralzucker wurde mittels HPLC nach einer Hydrolyse der Polymeren und Derivatisierung mit p-Aminobenzoesäure-Ethylester durchgeführt (zu Details der Methode vgl. Abschn. A.1. bb.5, S. xix).

Für eine Quantifizierung unter nicht destruktiven Bedingungen kann die Bindung von spezifischen Farbstoffen herangezogen werden. Als „spezifisch“ adsorbierbare Farbstoffe wurden in der Literatur bisher vor allem Ruthenium Red und Alcian Blue beschrieben. Für Ruthenium Red hat sich die empirische Strukturformel von Fletcher et al. durchgesetzt, die u.a. bei Figueroa und Silverstein [5. 29] wie folgt wiedergegeben wird:



Die Adsorption von Ruthenium Red gilt allgemein als Reaktion des kationischen Farbstoffes mit sauren extrazellulären Polysacchariden und wurde bisher von verschiedenen Autoren für die Bestimmung des Polysaccharidgehaltes der Bakterienoberfläche verwendet [5. 29, 5. 40]. Mehrere Arbeiten weisen auch tatsächlich eine hohe Spezifität von Ruthenium Red für hochmolekulare EPS mit einer hohen Dichte an ionisierbaren Carboxylgruppen aus. Jedoch sind auch unspezifische Reaktionen mit anderen Komponenten der Zelloberfläche bekannt [5. 40]. Die Adsorptionsmessung mit Ruthenium Red stellt somit lediglich eine halbquantitative Methode für die Charakterisierung von Polysacchariden der Zelloberfläche dar, die stark empirischen Charakter trägt und deren Eignung in jedem Einzelfall zu überprüfen ist. Dennoch zeigte die Methode in unseren Untersuchungen eine gute Korrelation zu Ergebnissen, welche mit differentieller Filtration und photometrischer Bestimmung (Phenol-Schwefelsäure-Methode) erzielt wurden (Abbildung 5.19).

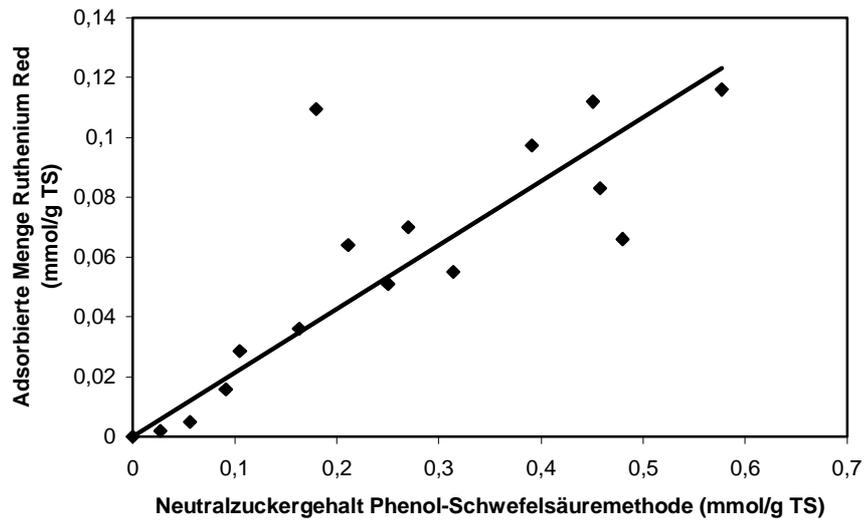


Abbildung 5.19: Bestimmung oberflächengebundener Polysaccharide. Korrelation von Phenol-Schwefelsäure-Methode und halbquantitativer Bestimmung durch Adsorption von Ruthenium Red.

Durch seine vergleichsweise hohe Spezifität für saure Polysaccharide erlaubt die Ruthenium Red Methode eine schnelle und relativ zuverlässige Prognose über den Einfluß der oberflächengebundenen Glycoside auf das Adsorptionsverhalten an hydrophoben Oberflächen. Wie Abbildung 5.20 verdeutlicht, besteht eine signifikante wenn auch schwache Korrelation zwischen dem Gehalt an (durch Ruthenium Red erfaßbaren) Oberflächenpolysacchariden und der Adsorption der entsprechenden Organismen an Hexadekan.

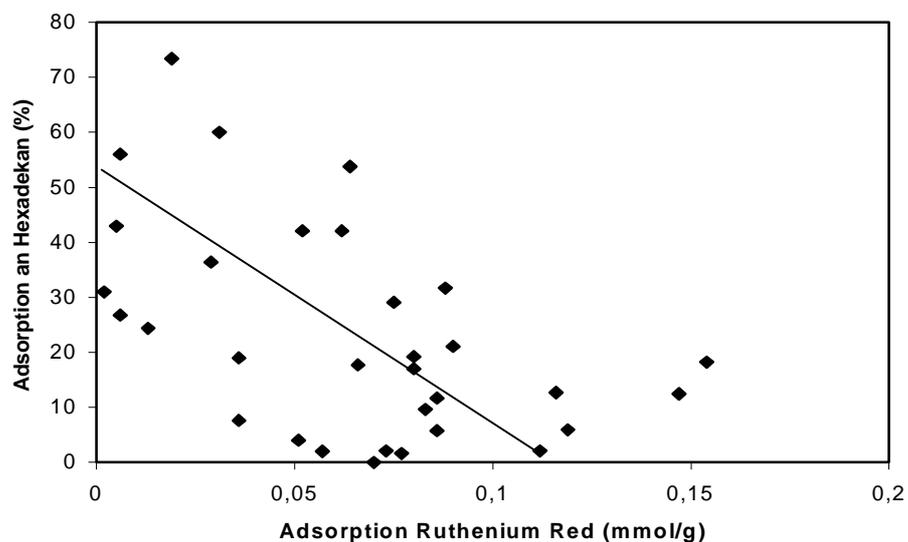


Abbildung 5.20: Korrelation zwischen der Adsorptionskapazität von Mikroorganismen für Ruthenium Red und der Adsorption der Organismen an Hexadekan.

Sind neben elektrostatischen, wie beim Hexadekan ausschließlich hydrophobe Wechselwirkungen zu berücksichtigen, so bedingen hohe Gehalte saurer Glycoside erwartungsgemäß eine Verringerung der Adsorption an die organische Phase infolge der erhöhten elektrostatischen Abstoßung (vgl. theoretische Betrachtungen in Abschn. 5.1.1), während die Lifshitz van der Waals Wechselwirkung weitgehend unbeeinflusst bleibt. Für Oberflächen mit zusätzlichen Lewis-Zentren sind jedoch auch die Lewis-Säure-Base-Eigenschaften der Polysaccharide zu berücksichtigen.

Entsprechend wurde, wie erwartet, kein Zusammenhang zwischen dem Gehalt an sauren Polysacchariden und der thermodynamisch bestimmten Hydrophobizität der Organismen, die durch Kontaktwinkelmessung bestimmt wurde (vgl. Tabelle 5.6, Abbildung 5.21) festgestellt.

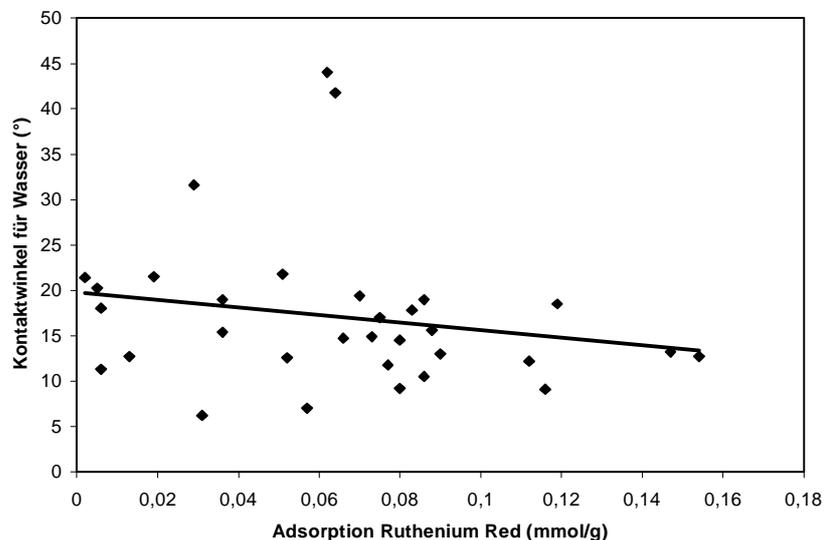


Abbildung 5.21: Korrelation zwischen der Adsorptionskapazität von Mikroorganismen für Ruthenium Red und der Hydrophobizität bestimmt durch Kontaktwinkelmessung.

Alcian Blue zeichnet sich wie Ruthenium Red durch seine kationische Struktur aus. Im Gegensatz zu Ruthenium Red zeigt Alcian Blue jedoch eine wesentlich geringere Spezifität und geht feste Bindungen mit Carboxylgruppen, Sulfatgruppen und wahrscheinlich auch mit Phosphatgruppen ein. Die Adsorption von Alcian Blue gibt somit nur einen groben Überblick über die Menge an extraplastidären Substanzen auf der Oberfläche eines Bakteriums. Entsprechend war in unseren Untersuchungen die Korrelation der Resultate einer Adsorptionsmessung mit Alcian Blue und der mit Ruthenium Red nur gering (Tabelle 5.6). Meist wurden mit Alcian Blue die höheren Werte festgestellt, was die größere Wirkungsbreite unterstreicht.

Oberflächengebundene Polysaccharide können sowohl in Form von Kapseln oder Schleimen über die gesamte Zelloberfläche verteilt vorliegen und wirken dann vor allem durch ihren Einfluß auf die makroskopischen physiko-chemischen Eigenschaften der Organismen. In vielen Fällen sind sie jedoch asymmetrisch angeordnet und können dann, eventuell im Zusammenwirken mit anderen Strukturen, eine funktionale Polarität der Zelloberflächen bewirken. Dabei sind auch hochspezifische Wirkzentren, z.B. für die Anlagerung pathogener Organismen an tierische und pflanzliche Zelloberflächen bekannt [5. 22, 5. 25]. Die Beschreibung solcher spezifischer Wirkmechanismen setzt die Betrachtung der Zelloberfläche in mikroskopischen Dimensionen voraus. Für die Auflösung der bakteriellen Zelloberfläche in seine strukturellen Einzelheiten wurden in unseren Untersuchungen vor allem die Licht- und die Transmissionselektronenmikroskopie verwendet. Dazu war es erforderlich, die auf der Bakterienoberfläche angeordneten Polysaccharide für die jeweilige mikroskopische Methode sichtbar zu machen. Für die Elektronenmikroskopie stehen dabei eine Reihe etablierter Methoden zur Verfügung. Weit verbreitet ist die Färbung mit Ruthenium Red, die auch bei unseren Untersuchungen mit guten Ergebnissen eingesetzt wurde. Die verwendete Methode ist im Anhang (Abschn. A.1.x, S. xv) dargestellt. Auch Alcian Blue ist prinzipiell für die Sichtbarmachung von Oberflächenglycosiden geeignet. Die Methode besitzt aber, wie oben dargelegt, nur eine geringe Spezifität und ist darüber hinaus nach den Angaben von Handley [5. 40] wenig reproduzierbar und neigt zur Bildung von Artefakten. Von verschiedenen Autoren wurden weiterhin kationisches Ferritin, kolloidales Eisen oder Thoriumhydroxid verwendet. Einen Überblick über Einsatzmöglichkeiten und Leistungen verschiedener Methoden gibt Handley [5. 40].

Eine auf Grund ihrer hohen Spezifität sehr elegante Methode ist die Verwendung von Lectinen. Lectine sind nach der allgemein anerkannten Definition von Goldstein et al. [5. 33] „zuckerbindende Proteine oder Glucoproteine die keine Antikörperstruktur aufweisen und mit ganzen Zellen zur Agglutination bzw. mit Glucokonjugaten zur Präzipitation führen“. Gegenwärtig ist eine Vielzahl von Lectinen mit einer Spezifität für ganz unterschiedliche Saccharidstrukturen bekannt. Einen Überblick über bisher beschriebene Lectine und ihre Spezifität gibt Doyle [5. 22]. Da Lectine selbst zwar hochspezifisch für verschiedene Polysaccharide sind aber keine elektronenabsorbierenden Eigenschaften besitzen, müssen sie vor dem Einsatz mit geeigneten Markern konjugiert werden. Dazu wurden von verschiedenen Autoren u.a. Meeretichperoxidase und Diaminobenzidin oder Ferritin eingesetzt. Die nach allgemeiner Einschätzung beste Methode ist die adsorptive Kopplung mit kolloidalen Goldpartikeln [5. 22]. Diese Konjugate können durch einfache Adsorption des Lectins in einem Sol von kolloidalem Gold erzeugt werden und zeigen nach unseren Erfahrungen eine sehr gute

Selektivität und Sensitivität. Die von uns verwendete Methode wird im Anhang (Abschn. u, S. xiii) beschrieben.

Werden Lectine mit fluoreszierenden Markern gekoppelt, so eignen sie sich auch für den Einsatz in der Lichtmikroskopie. Für die Auswertung der Ergebnisse kommen in diesem Fall die Epifluoreszenz- oder die Confokale Laserscan-Mikroskopie in Betracht. Die in unseren Untersuchungen verwendeten Lectine, sowie deren Spezifität sind in Tabelle 5.3 zusammengestellt. Die verwendeten Lectine wurden mit Fluorescein oder Texas Red konjugiert.

Tabelle 5.3: Spezifität ausgewählter Lectine für verschiedene Strukturkomponenten von Polysacchariden nach [5. 22]

Lectin	Spezifität
Concanavalin A	terminale α -D-Mannose und α -D-Glucose
Weizenkeimlectin (<i>Triticum vulgare</i>)	β -D-GlcNAc-(1,4)- β -D-GlcNAc-(1,4)-GlcNAc
Kokosnußlectin (<i>Arachis hypogaea</i>)	Gal- β -(1,3)-GalN-Ac
Sojabohnenlectin (<i>Glycine max</i>)	Gal-N-Ac- α (oder β)-1,3-Gal

Für den Prozeß der primären Adsorption besitzen oberflächengebundene Polysaccharide eine herausragende Bedeutung. Nach erfolgter initialer Anheftung setzt üblicherweise eine intensive Synthese extrazellulärer Substanzen und vor allem von Polysacchariden ein, die zur irreversiblen Anheftung der Zellen und letztendlich zur Ausbildung des „reifen“ Biofilmes führt. Die sich ausbildende Biofilmmatrix besteht zu wesentlichen Teilen aus Polysacchariden. Die Beteiligung von Polysacchariden bei der Ausbildung des primären Biofilmes ist von vielen Autoren untersucht und ausführlich beschrieben worden [5. 17, 5. 14, 5. 30, 5. 47, 5. 96]. Inwieweit Polysaccharide auch an der initialen Adhäsion der Organismen ursächlich beteiligt sind, wird unterschiedlich diskutiert. Für eine Reihe von Organismen wurde die Produktion polarer adhesiver Strukturen, sogenannter Holdfasts, demonstriert, die eine Zellasymmetrie bewirken und zu einer orientierten Anlagerung an inerten Oberflächen führen. So ist für *Thiotrix spp.*, *Seliberia stellata* und eine Reihe von Organismen der Gattungen *Caulobacter* und *Asticcacaulis* bekannt, daß sie sich an Oberflächen und auch aneinander anlagern unter Beteiligung von polar angeordneten Fimbrien und Holdfast-EPS [5. 41, 5. 47, 5. 71, 5. 107]. Besonders intensiv untersucht wurde der Adsorptionsmechanismus für marine Tiefseeorganismen der Gattung *Hyphomonas* [5. 45, 5. 72, 5. 73]. Dabei kamen Langille und Weiner [5. 45], sowie Quintero et al. [5. 72] übereinstimmend zu der Aussage, daß temporär sowohl polar angeordnete Polysaccharide wie auch Fimbrien gebildet werden, die an der Adsorption

der Organismen mitwirken. Hinweise für eine direkte Beteiligung von Polysacchariden an der initialen Adhäsion werden jedoch auch in weiteren Arbeiten beschrieben [5. 14, 5. 73]. Ein in unseren Untersuchungen aus einer Modellanlage zur Reinigung von Deponiesickerwasser isolierter *Bacillus* Stamm (*Bacillus niacini* W0, DSM 96-1012) synthetisierte unter semianaeroben Bedingungen gleichfalls ein Polysaccharid, welches offensichtlich bei der Adsorption der Organismen an inneren Oberflächen mitwirkt. Unter aeroben Bedingungen verfügte *B. niacini* W0 über keine nachweisbaren EPS-Polysaccharide. Bei Verringerung der Sauerstoffkonzentration des Mediums setzte jedoch innerhalb von ca. 30 min die Synthese von unregelmäßig auf der bakteriellen Oberfläche angeordneten Polysaccharidclustern ein, die sowohl im transmissionselektronenmikroskopischen Bild, wie auch im Epifluoreszenzmikroskop gut zu erkennen (Abbildung 5.22). Durch das Material der EPS-Cluster wurden sowohl Weizenkeimlectin wie auch Concanavalin A, jedoch nicht Kokosnußlectin oder Sojalectin gebunden. Das Bindungsverhalten der Lectine stimmt damit weitgehend mit der ermittelten Zusammensetzung der extrahierten und angereicherten Oberflächenpolymeren überein. Wie das HPLC-Chromatogramm der isolierten Polysaccharide ausweist, enthielten die isolierten EPS neben photometrisch meßbaren Proteinen im wesentlichen Derivate der Glucose, während z.B. Acetyl-Galactosamin nicht nachweisbar war (Tabelle 5.4).

Tabelle 5.4: Zusammensetzung des isolierten Polymers von der Zelloberfläche von *Bacillus niacini* W0

Komponenten	Anteil an der Zusammensetzung der EPS
Protein	44,8%
Neutralzucker	21,9%
Hexosamine (als Glucosamin)	24,7%
Uronsäuren (als Glucuronsäure)	8,6%
Verteilung der monomeren Bestandteile der Polysaccharidkomponente:	
Glucose	20,7%
Galaktose	4,7%
Mannose	1,5%
Fucose	3,65%
Glucosamin	48%
Galaktosamin	6,9%
N-Acetylglucosamin	10,9%
Glucuronsäure	1,0%
Galcturonsäure	2,0%

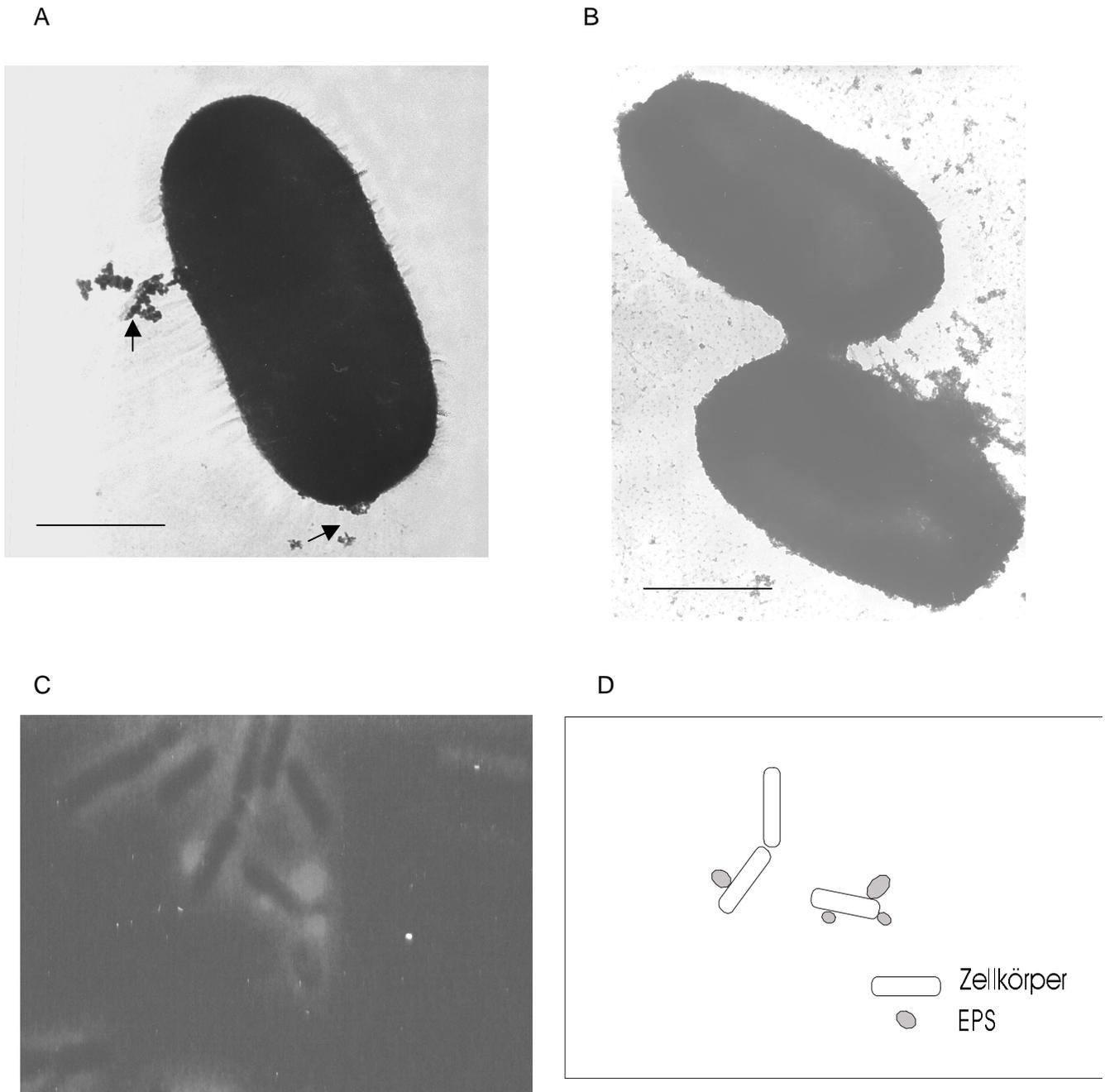


Abbildung 5.22: Anordnung lokal synthetisierter Polysaccharide auf der Oberfläche von *Bacillus niacini* W0.

A: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme nach Markierung mit WGA-Gold-Konjugat. EPS durch Feil markiert. Der Balken entspricht 1µm

B: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme nach Färbung mit Ruthenium Red. Der Balken entspricht 1µm

C: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Färbung mit WGA-Texas-Red Konjugat

D: Schematische Darstellung der Anordnung der Polysaccharidcluster auf der Bakterienoberfläche gemäß Bild C.

Aufgrund der asymmetrischen Anordnung der Oberflächenpolysaccharide zeigte *B. niacini* W0 eine gute Adsorption sowohl an hydrophoben, wie auch an hydrophilen Oberflächen. Insbesondere die Anheftung an hydrophilen Substraten, sowie auch die Aggregation der einzelnen Organismen untereinander wurde dabei überwiegend von den Polysaccharidclustern vermittelt. Die Adsorption erfolgte in einer charakteristischen Abfolge, die in Abschn. 5.1.2.1.3 näher erläutert wird. Die Anheftung an hydrophobe Oberflächen fand dagegen überwiegend an den polysaccharidfreien Zonen der Bakterienoberfläche statt.

Die Bedeutung der Polysaccharide von *B. niacini* für die Adsorption an innerte Oberflächen wird noch deutlicher, wenn das Adsorptionsverhalten von semianaerob wachsenden, also saccharidhaltigen Bakterien mit dem von weitgehend saccharidfreien Organismen verglichen wird. Tabelle 5.5 zeigt das Adsorptionsverhalten der Organismen an ausgewählten Modellträgern mit unterschiedlicher Oberflächenstruktur (zur Struktur der Träger vgl. Tabelle 6.1). Wie die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, stieg die Menge der adsorbierten Biomasse durch die Synthese der Holdfast-EPS bei allen untersuchten Trägern signifikant an. Während jedoch die Änderung bei Verwendung des anionischen Trägers KS10 nur gering war, erhöhte sich der Anteil gebundener Organismen bei unmodifizierten Trägern (EP63) oder kationischen Materialien z.T. bis auf das dreifache.

Tabelle 5.5: Adsorption von *B.niacini* an Polystyrolpartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenstruktur. Die Struktur der verwendeten Modelträger ist in Abschn. 6 (Tabelle 6.1) dargestellt.

Trägermaterial	Adsorbierte Zellen (mg/g Träger)	
	saccharidhaltige Zellen	saccharidarme Zellen
KS 10	2,6	1,7
EP 63	2,0	0,7
AD 41	2,9	0,8
SZ 30	3,1	1,7
SN 36	3,9	2,3
SL 30	3,1	0,9

Dieses Verhalten stimmt sehr gut mit den in Abschn. 5.1.2.1.1 dargestellten makroskopischen physiko-chemischen Oberflächeneigenschaften der polysaccharidfreien Zellen überein (vgl. dazu insbesondere Abbildung 5.14 und Abbildung 5.17, sowie

Tabelle 5.6) und verdeutlicht das enge Wechselspiel zwischen spezifischen und makroskopischen Wirkmechanismen bei der mikrobiellen Adsorption. Die auf der Bakterienoberfläche in hoher Dichte vorhandenen negativen Ladungen behindern (u.U. im Zusammenwirken mit den Carboxylgruppen der Polysaccharide) offensichtlich die Anlagerung der Organismen an negativ geladene Oberflächen, während für kationische Ladungsträger attraktive Kräfte eine Erhöhung der Adsorption bewirken. Die lokale Synthese von Holdfast-EPS zur Vermittlung der adsorptiven Bindung kann in Übereinstimmung mit den thermodynamischen Erwartungen zwar die adsorptiven Eigenschaften der Zellen insgesamt verbessern, jedoch bleibt auf Grund der geringen Bedeckung der Zelloberfläche die Selektivität hinsichtlich der Adsorption an verschiedenen Trägermaterialien erhalten.

Zusätzlich erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang, daß *B. niacini* im Gegensatz zu den meisten anderen bisher beschriebenen Organismen mit asymmetrischen Adsorptionsmechanismen [5. 45, 5. 47, 5. 73] offenbar keine Zellstrukturen, wie Fimbrien oder Flagellen ausbildet, die eine Adsorption der Zellen vermitteln können. Die Synthese von Holdfast-EPS ist für *B. niacini* W0 offensichtlich eine mögliche Alternative zu den bisher beschriebenen Mechanismen zur Verbesserung der zellulären Adsorptionseigenschaften für hydrophile Oberflächen.

5.1.2.1.2.2 Proteine

Neben den Polysacchariden gehören Proteine zu den wichtigsten Bestandteilen der Zelloberfläche. Sie sind als Membranproteine, sowie als Grundbausteine von Fimbrien und Flagellen direkt am Aufbau der Zellstruktur beteiligt. Des Weiteren bilden sie einen wichtigen Bestandteil der EPS. Als charakteristische Komponenten der Zelloberfläche prägen Proteine in erheblichem Maße die makroskopischen physiko-chemischen Eigenschaften der Bakterienzelle. So ist bekannt, daß die hydrophoben Seitenketten der Proteine erheblich die hydrophoben Eigenschaften der Organismen beeinflussen. Proteine sind jedoch als sogenannte Adhäsine auch wesentlich an den spezifischen, d. h. von stereochemischen Eigenschaften der Partner geprägten Anheftungsmechanismen der Zellen beteiligt [5. 28]. Besonders gut untersucht sind diese spezifischen Adhäsionsmechanismen bei den Organismen der oralen Flora des Menschen. Für eine Gruppe oraler Streptokokken, den sogenannten mutans Stämmen sind z.B. mehrere Adhäsine bekannt, die spezifisch die Anheftung der entsprechenden Organismen an die Wirtsoberfläche oder auch die Adhäsion weiterer Organismen an vorhandene mikrobielle Beläge vermitteln [5. 25].

Tabelle 5.6: Charakterisierung der Oberflächenstruktur, sowie des adsorptiven Verhaltens der wichtigsten, in dieser Arbeit verwendeten Organismen

	Kontaktwinkel	Adsorption					IEP	Adsorption an Modellträger mittlerer Polarität und unterschiedlicher Ladung* [mg/g Trägermaterial]					
		Hexadekan (%)	Orange II (µmol/g)	Kristallviolett (mmol/g)	Alcian-blue (mmol/g)	Ruthenium red (mmol/g)		KS10	EP63	AD41	SZ30	SN36	SL30
<i>Bacillus niacini</i> W0	21,8°	4	<1,0	0,72	0,250	0,051	3,67	1,67	0,71	0,79	1,70	2,3	0,87
<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> F10	15,4°	7,6	<1,0	0,48	0,163	0,036	3,74	0,37	0,47	0,84	1,11	1,58	0,86
<i>Alcaligenes spec.</i> D10	14,75°	17,7	18	0,64	0,081	0,066	3,70	0,75	1,55	2,70	2,05	1,40	2,59
<i>Pseudomonas spec.</i> BT	12,7°	18,2	<1,0	0,55	0,273	0,154	3,14	1,51	1,59	2,74	2,75	2,63	3,08
<i>Stapylococcus spec.</i> W1	9,2°	19,2	<10	0,35	0,180	0,080	3,61	3,8	1,57	2,91	2,2	2,6	2,69
<i>Artrobacter spec.</i> W2	20,25°	42,9	16,5	0,51	0,056	0,005	3,52	3,37	0,35	0,31	0,9	0,94	0,49
S11	41,8°	53,8	8,0	0,26	0,011	0,064	3,79	0,87	1,67	1,32	0,79	1,18	1,12
S13	9,1°	12,7	<1,0	0,24	0,577	0,116	3,58	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
S21	19,4°	<1	<1,0	0,175	0,176	0,07	3,31	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
S22	17,8°	9,6	5,2	<0,1	0,215	0,083	n.b.	Aggr.	2,24	1,06	1,67	1,25	2,91

	Kontakt- winkel	Adsorption					IEP	Adsorption an Modellträger mittlerer Polarität und unterschiedlicher Ladung*					
		Hexa- dekan (%)	Orange II ($\mu\text{mol/g}$)	Kristall- violett (mmol/g)	Alcian- blue (mmol/g)	Ruthenium red (mmol/g)		KS10	EP63	AD41	SZ30	SN36	SL30
<i>Acinetobacter spec. PheA1</i>	7,0°	2,0	<1,0	0,89	0,046	0,057	3,81	0,88	0,22	0,55	0,20	0,51	0,63
<i>Phe B2</i>	21,4°	31	<1,0	<0,1	0,027	0,002	3,36	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Pseudomonas acidovorans Ca50</i>	12,6°	42,1	8,8	0,51	0,031	0,052	5,7	1,04	0,71	1,70	1,22	1,44	1,66
<i>Pseudonocardia sulfidoxydans K1</i>	44,0°	42,1	<1,0	0,13	0,071	0,062	<3,0	0,15	0,3	n.b.	0,15	n.b.	n.b.
<i>Pseudomonas fluorescens PD 64</i>	12,2	2,1	<1,0	0,19	0,94	0,112	3,94	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
<i>Arthrobacter sulfureus AS1</i>	19,0°	5,8	<1,0	0,23	n.b.	0,086	3,35	1,4	1,7	1,4	1,2	1,7	1,1
<i>Aureobacterium liquifaciens AL1</i>	6,2°	60,0	<1,0	<0,1	n.b.	0,031	3,21	2,71	3,4	1,4	3,6	3,6	2,7
<i>Rhodococcus spec. RS1</i>	21,5°	73,4	<1,0	<0,1	n.b.	0,019	3,85	0,2	1,7	2,4	1,9	2,3	2,26
LF11a	31,6°	36,4	n.b.	n.b.	n.b.	0,029	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LF12	14,9°	2,1	n.b.	n.b.	n.b.	0,073	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LF12a	18,0°	9,9	n.b.	n.b.	n.b.	0,006	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LA11	11,3°	26,8	n.b.	n.b.	n.b.	0,006	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LA14	11,8°	1,6	n.b.	n.b.	n.b.	0,077	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
LA22	12,7°	24,4	n.b.	n.b.	n.b.	0,013	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

	Kontaktwinkel	Adsorption					IEP	Adsorption an Modellträger mittlerer Polarität und unterschiedlicher Ladung*					
		Hexadekan (%)	Orange II (µmol/g)	Kristallviolett (mmol/g)	Alcianblau (mmol/g)	Ruthenium red (mmol/g)		KS10	EP63	AD41	SZ30	SN36	SL30
SCH1	13.0°	21,1	n.b.	n.b.	n.b.	0,090	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
SCH2	14.5°	17,0	n.b.	n.b.	n.b.	0,080	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
SCH3	17.0°	29,1	n.b.	n.b.	n.b.	0,075	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
SCH4	15.6°	31,7	n.b.	n.b.	n.b.	0,088	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
SCH5	10.5°	11,7	n.b.	n.b.	n.b.	0,086	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
SCH6	13.2°	12,5	n.b.	n.b.	n.b.	0,147	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
SCH7	19.0°	19,0	n.b.	n.b.	n.b.	0,036	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
SCH8	18.5°	5,9	n.b.	n.b.	n.b.	0,119	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.

*Zur Charakterisierung der verwendeten Träger siehe Tabelle 6.1 in Abschnitt 6.

n.b. nicht bestimmt

Aggr. die Zellen aggregieren während des Versuches

	Kontaktwinkel	Adsorption Orange II (µmol/l)	Adsorption Kristallviolett (mmol/l)	Adsorption Alcianblau (mmol/g)	Adsorption Ruthenium red (mmol/g)	IEP	Adsorption an Modellträger unterschiedlicher Polarität und unterschiedlicher Oberflächenladung				
							KS10	EP63	SZ30	OC 1060	Sinterglas
<i>Pseudonocardia spec. K1</i>		<1,0	0,13	0,071	0,062	<3,0	0,15	0,3	0,15	0,60	0,2
<i>Arthrobacter sulfureus AS1</i>	19,0°	<1,0	0,23	n.b.	0,086	3,35	1,4	1,7	1,2	1,6	1,8
<i>Aureobacterium liquifaciens AL1</i>	6,2°	<1,0	<0,1	n.b.	0,031	3,21	2,71	3,4	3,6	1,0	3,1
<i>Rhodococcus spec. RS1</i>	21,5°	<1,0	<0,1	n.b.	0,019	3,85	0,2	1,7	1,9	2,0	0,6

Durch diese spezifischen Wechselwirkungen von Bakterienstämmen auch unterschiedlicher Arten entsteht eine Kooperativität bei der Besiedelung von inneren Oberflächen, die als Koadhäsion bezeichnet wird.

Die proteinogenen Adhäsine der EPS sind jedoch nicht nur zu einer spezifischen Adhäsion, wie z.B. an Zahnoberflächen befähigt, sondern sie können auch enzymatische Aktivität entwickeln und auf diese Weise zur Schaffung einer optimalen Struktur der Wirtsoberflächen beitragen. So sind für die oralen mutans Streptokokken mehrere Transferasen (u.a. Glycosyltransferase, Fructosyltransferasen) bekannt, die im Zusammenwirken mit anderen extrazellulären Enzymen aus Saccharose polymere Glycane synthetisieren, die dann wiederum als Matrix für die Ausbildung von Biofilmen oder als Adhäsine für weitere Organismen zur Verfügung stehen.

Ein weiteres Beispiel für die spezifischen adhäsiven Eigenschaften proteinogener Bestandteile der Bakterienoberfläche sind die sogenannten Cellulosome, die adhäsiv wirkenden Enzymkomplexe der Zellulose abbauenden Bakterienarten. Die Proteinstrukturen der Cellulosome dienen einerseits der Anheftung der Organismen an die Oberfläche der Zellulosepolymeren und realisieren gleichzeitig die extrazelluläre Spaltung der Zuckerpolymeren in Monomere, die dann von der Zelle aufgenommen und metabolisiert werden können [5. 3].

Adhäsine kommen nicht nur als Bestandteil der EPS vor, sondern sie können auch auf charakteristischen Strukturen der Bakterienoberfläche, wie Fimbrien oder Flagellen angeordnet sein. Ein Beispiel dafür ist das FimH Protein aus *E. coli*, welches die Anheftung an Hefezellen vermittelt [5. 78].

5.1.2.1.2.3. Lipopolysaccharide

Lipopolysaccharide gehören zu den strukturbildenden Bestandteilen in den äußeren Bereichen der Zelloberfläche Gram negativer Bakterien und bestehen aus einer Lipidkomponente und einem sehr stark variierenden Polysaccharidanteil. Elektronenmikroskopische Untersuchungen verschiedener Autoren haben gezeigt, daß die Polysaccharidkette (O-Antigen) an der äußeren Oberflächen der Bakterienzellwand angeordnet und außerordentlich flexibel ist. Sie kann bis auf einen Abstand von 20 nm zur Lipidkomponente gedehnt werden. Die Länge des O-Antigens ist dabei sehr variabel und beeinflusst aufgrund seiner Anordnung wesentlich das physiko-chemische Verhalten der Bakterienoberfläche. Nach Untersuchungen von de Maagd et al. [5. 21] zeigen Organismen mit kurzer oder fehlender Saccharidkomponente eine deutliche Zunahme der Oberflächenhydrophobizität. Auch verschiedene andere Untersuchungen weisen

darauf hin, daß die Struktur der Lipopolysaccharide eng mit der Hydrophobizität der Organismen gekoppelt ist [5. 28].

Neben den makroskopischen Wirkungen werden auch komplexbildende Eigenschaften der Lipopolysaccharide beschrieben. So fanden Gehrke et al. [5. 30], daß Lipopolysaccharide aus *Thiobacillus ferrooxidans* Wechselwirkungen mit Fe(III)-Ionen eingehen. Die dabei gebildeten Fe(III)-Saccharid-Komplexe vermitteln die Adhäsion der Organismen z.B. mit Pyritoberflächen und tragen damit zur Mobilisierung des Eisens bei.

5.1.2.1.2.4 Spezielle Oberflächenstrukturen

Spezielle Oberflächenstrukturen, d.h. Fimbrien, Fibrillen oder Flagellen sind zwar überwiegend aus den bereits oben diskutierten Makromolekülen, insbesondere aus Proteinen aufgebaut. Sie stellen aber wegen ihrer räumlichen Struktur eine Besonderheit der Zelloberfläche dar.

Aufgrund ihrer Anordnung auf der äußeren Zelloberfläche beeinflussen Fimbrien und Fibrillen die makroskopischen physiko-chemischen Eigenschaften der Zellen. Da die strukturgebenden Proteine meist große Anteile hydrophober Aminosäuren aufweisen, wurde in den meisten untersuchten Fällen eine direkte Korrelation zwischen der Menge der vorhandenen Fibrillen und der Zellhydrophobizität beobachtet [5. 85, 5. 94].

Fimbrien sind darüber hinaus zumindest bei einigen Organismen direkt an der irreversiblen Anheftung der Zellen beteiligt. Aufgrund ihrer Ausdehnung im Raum können sie nach einer Annäherung der Zellen in den energetischen Bereich des sekundären Minimums (vgl. Abschn. 5.1.1) die Energiebarriere zwischen den Organismen und der Trägeroberfläche durchdringen und eine feste Verbindung zur Oberfläche des Substrats herstellen. Die Beteiligung von Fimbrien an der primären Adhäsion wurde u.a. für *Thiotrix nivea* [5. 47] und verschiedene *Hyphomonas* Stämme [5. 45, 5. 72, 5. 73] beschrieben. Dabei konnten sowohl Langille und Weiner [5. 45], wie auch Quintero et al. [5. 72] übereinstimmend zeigen, daß die an der Adhäsion beteiligten Fimbrien an der Bakterienoberfläche polar angeordnet sind und entsprechend zu einer polaren Anordnung der Organismen bei der Besiedlung von Oberflächen führen. Die untersuchten *Hyphomonas* Stämme unterlagen dabei einem regelmäßigen Wechsel von Schwärmzellen, die mit einem Flagellum ausgestattet waren und den adhäsiven Zellen mit polar angeordneten Fimbrien. Zur Anlagerung an inneren Oberflächen waren jeweils nur die adhäsiven Zellen befähigt. Bei verschiedenen *Pseudomonas*- Arten wurde auch die Beteiligung des Flagellums an der primären Adhäsion demonstriert. So beschreiben Lawrence et al. [5. 48], sowie Wincek und Fletcher [5. 108] für *Pseudomonas fluorescens* unterschiedliche Adsorptionsmechanismen für hydrophile und hydrophobe Oberflächen.

Während die Adsorption an hydrophoben Oberflächen durch den Zellkörper erfolgte, lagerte sich an hydrophilen Oberflächen zunächst das Flagellum an. Eine irreversible Anheftung des Zellkörpers erfolgte erst in einem zweiten Schritt.

Wie die dargestellten Beispiele zeigen, können spezifische Strukturen der Zelloberfläche durch ihre polare Anordnung die Möglichkeiten einer Bakterienzelle, Wechselwirkungen mit inneren Oberflächen einzugehen, wesentlich erhöhen. Bei der Optimierung von Träger-Biofilm-Systemen spielen diese Strukturelemente deshalb eine nicht zu vernachlässigende Rolle.

5.1.2.1.3 Einflüsse von Umweltbedingungen und des physiologischen Zustandes der Organismen auf die Oberflächenstruktur

Wie die Resultate zahlreicher Untersuchungen verschiedener Autoren gezeigt haben, können die Quantität und die Zusammensetzung der bakteriellen Zelloberflächenpolymere durch den physiologischen Status der Organismen beeinflusst werden. Es war demzufolge zu erwarten, daß sich durch äußere Einflüsse auch die adsorptiven Eigenschaften der Organismen verändern.

Als Faktoren, die einen Einfluß auf die Struktur der Zelloberfläche ausüben, wurden von verschiedenen Autoren u.a. die Art und die Konzentration der Kohlenstoffquelle, sowie das Verhältnis von Kohlenstoff zu Stickstoff im Nährmedium beschrieben [5. 63, 5. 80]. So zeigten Wrangstadh et al. [5. 110] für ein EPS-produzierendes Bakterium, *Pseudomonas spec. S9*, daß diese Organismen zwei unterschiedliche Polymere in Abhängigkeit von der C-Versorgung produzieren. Bei ausreichendem Kohlenstoffangebot war das gebildete Polymer eng mit der Bakterienoberfläche assoziiert. Bei Kohlenstoffmangel wurde jedoch ein zweites Polymer nachgewiesen, welches offensichtlich nur lose mit der Zelloberfläche verbunden war. Während die Polymere der ersten Gruppe die Adhäsion der Organismen an Oberflächen vermittelten, bewirkte die Bildung der zweiten Gruppe eine Ablösung der adsorbierten Zellen von ihrem Substratum.

Eng mit dem Substratangebot gekoppelt sind auch Wachstum und Zellvermehrung. Entsprechend wurde für eine Reihe von Organismen ein Einfluß des Wachstumsstadiums der Zellen (bzw. der Wachstumsraten bei kontinuierlichen Kulturen) auf die physiko-chemischen Eigenschaften der Bakterien beschrieben. So fanden Grasso et al. [5. 34] für den von ihnen untersuchten *Pseudomonas aeruginosa* Stamm eine signifikante Abnahme des Elektronendonatorpotentials (γ^{\ominus}), sowie eine Zunahme des Zetapotentials beim Übergang der Organismen von der logarithmischen Wachstumsphase in die stationäre Phase. Diese Änderungen in den physiko-chemischen Eigenschaften führten gleichzeitig zu einer signifikanten Zunahme der Adhäsion an Dolomit. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Nelson et al. [5. 68] für *Pseudomonas* und van Haecht et al. [5. 97] für

Hefezellen. Auch eigene Untersuchungen mit verschiedenen Organismen zeigen einen Einfluß des aktuellen Substrates und des Wachstumsstadiums auf die makroskopischen physiko-chemischen Parameter. Ein repräsentatives Beispiel ist in Abbildung 5.23 dargestellt.

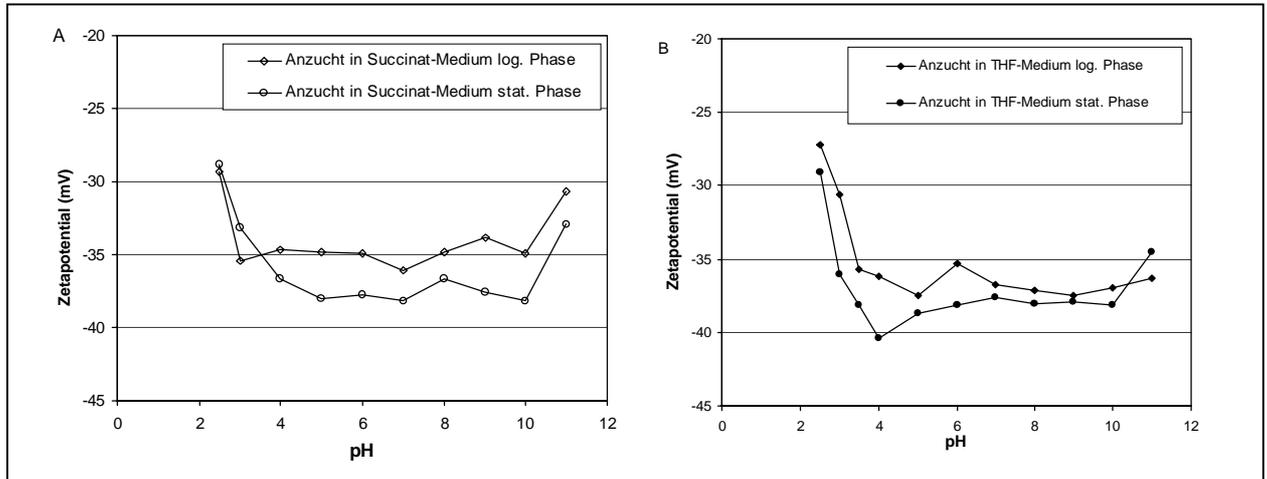


Abbildung 5.23: Einfluß von Wachstumsstadium und verschiedenen Substraten auf das Zetapotentialprofil von *Pseudonocardia sulfidoxydans* K1 [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$

Gemessen an den Unterschieden zwischen verschiedenen Stämmen (vgl. Abschn. 5.1.2.1.1) waren die Variationen, die sowohl in unseren Untersuchungen wie auch von verschiedenen anderen Autoren [5. 34, 5. 38] festgestellt wurden aber in den meisten Fällen eher untergeordnet. Stärkere Einflüsse der Kultivierungsbedingungen auf die Oberflächeneigenschaften der Zellen, wie sie beispielsweise für Cholesterol abbauende Organismen (Publikation in Vorb.) oder für *Bacillus niacini* W0 (einem Denitrifizierer) beobachtet wurden, scheinen eher Ausnahmen zu sein.

Selbst wenn Organismen über mehrere Monate in einem komplexen Nährmedium, wie Standard-Nährbouillon angezogen wurden, veränderten sich ihre Oberflächeneigenschaften meist nur wenig (Abbildung 5.24). Dennoch weist vor allem die Verschiebung des isoelektrophoretischen Punktes in Abbildung 5.24 auf Veränderungen in der Struktur der bakteriellen Oberfläche hin. Diese Veränderungen werden deutlicher, wenn weitere analytische Methoden zur Bewertung der Oberflächenstruktur herangezogen werden. Insbesondere bei der isoelektrischen Focussierung (Abbildung 5.25) zeigte sich, daß die Kultivierung der Zellen in einem komplexen Medium wie der Nährbouillon, eine Zunahme der Variabilität der Oberflächenladungseigenschaften nach sich zog. Der Versuch einer eindeutigen Zuordnung dieser Veränderungen zu bestimmten Komponenten der bakteriellen Oberfläche war für diese Organismen bisher jedoch leider nicht erfolgreich.

Auch für die von Grasso et al. [5. 34] bzw. Habash et al. [5. 38] dargestellten Substrateinflüsse sind keine Informationen über den molekularen Ursprung der physikochemischen Änderungen verfügbar.

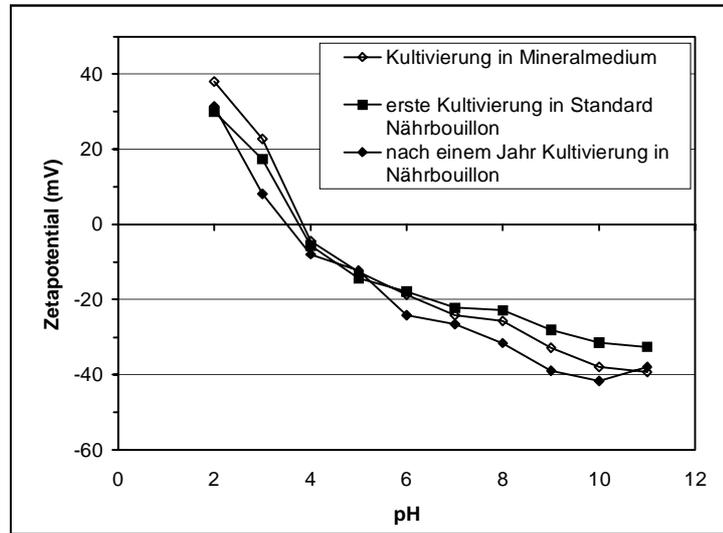


Abbildung 5.24: Einfluß der Kultivierung mit unterschiedlichen Substraten auf die Zetapotentialkurve von *Pseudomonas acidovorans* Ca50 in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivierung.

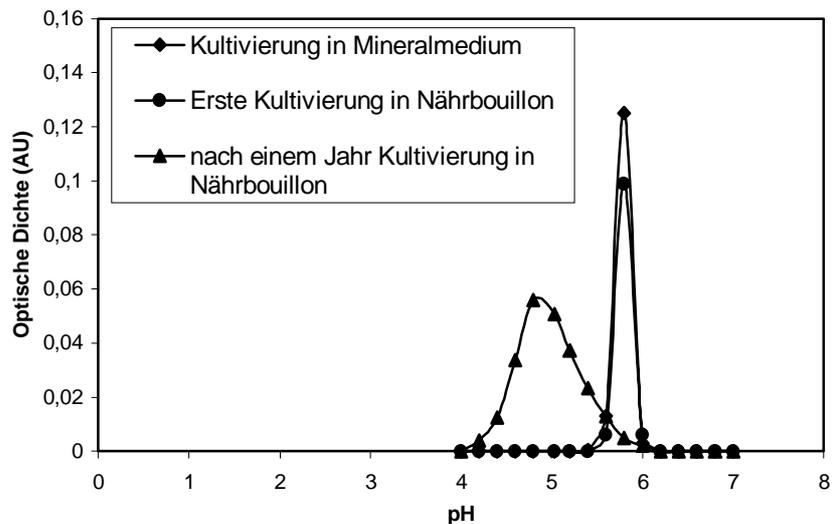


Abbildung 5.25: Verteilung der Organismen von *Pseudomonas acidovorans* Ca50 im pH-Gradienten der Isoelektrischen Focussierung. Die Anzucht der in Mineralmedium (1,4-Chlornitrobenzol) gewachsenen Bakterien in Nährbouillon führte über einen längeren Zeitraum zu einer deutlichen Zunahme der Variabilität hinsichtlich des isoelektrischen Punktes der Organismen.

Bei vielen der bisher näher charakterisierten Organismen war die Änderung der Oberflächeneigenschaften durch die Einwirkung von Umweltfaktoren mit der Bildung extrazellulärer Oberflächenpolysaccharide verbunden [5. 28]. Dies trifft auch für die von uns untersuchten Änderungen der Oberflächeneigenschaften von *Bacillus niacini* W0 zu.

Auslösender Faktor für die Synthese oberflächengebundener Polysaccharide war in diesem Fall jedoch nicht, wie häufig beobachtet, der Mangel an C-Substraten, sondern eine Verminderung der Konzentration an molekularem Sauerstoff. Wie bereits früher gezeigt [5. 55], kann *B. niacini* W0 unter anoxischen Bedingungen Nitrat als terminalen Wasserstoffakzeptor verwenden. Oberflächengebundene Glycoside wurden unter den von uns verwendeten Versuchsbedingungen nur unter diesen denitrifizierenden Bedingungen synthetisiert [Abbildung 5.26]. Die Synthese der Oberflächenpolysaccharide durch die unter aeroben Bedingungen weitgehend glycosidfreien Organismen setzte ca. 30 min nach dem Übergang von aeroben zu denitrifizierenden Bedingungen ein (Abbildung 5.26) und führte innerhalb kurzer Zeit zu einer Aggregation der unter aeroben Verhältnissen meist singulären Organismen. Die Synthese der Glycoside konnte durch Bestimmung des Neutralzuckergehaltes, aber auch durch fluoreszenzmarkierte Lectine (Concanavalin A bzw. Weizenkeimagglutinin) verfolgt werden. Die Zusammensetzung der extrahierten Polymere wurde bereits in Abschn. 5.1.2.1.2.1 beschrieben. Im Gegensatz zu den Ergebnissen von Wrangstadh et al. [5. 110] bei *Pseudomonas*, konnte die Polymersynthese bei *Bacillus niacini* W0 nicht durch den Mangel an C-Quellen initiiert werden, weil unter diesen Bedingungen relativ schnell eine Sporenbildung einsetzte. Möglicherweise bietet die Befähigung zur Sporenbildung eine bessere Strategie zur Überdauerung nährstoffarmer Phasen, als die der Pseudomonaden, die die Bildung von Biofilmen als Möglichkeit zur Nutzung geringer Substratkonzentrationen verfolgen. Auch strikt anaerobe Bedingungen führten nicht zu einer Bildung von Polysacchariden.

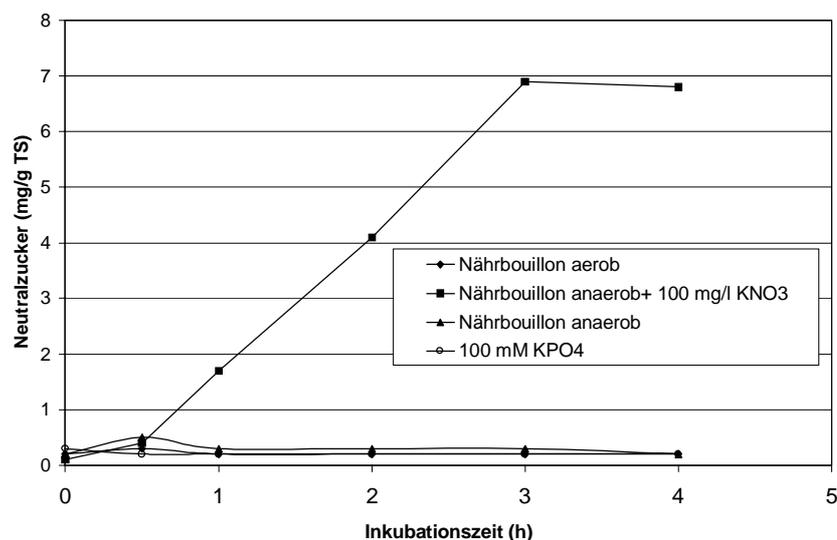


Abbildung 5.26: Gehalte an Oberflächenglycosiden von *Bacillus niacini* W0 bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. Die Zellen wurden in Standard I Nährbouillon bis zur mittleren log. Phase angezogen, abzentrifugiert und zum Zeitpunkt t0 in die angegebenen unterschiedlichen Kulturmedien überführt.

Abbildung 5.27 zeigt die zeitliche Abfolge von Polysaccharidsynthese und der Aggregation der Zellen von *B. niacini* W0. Unter aeroben Bedingungen waren fast ausschließlich einzelne Bakterien zu erkennen, die sich bisweilen zu Dimeren zusammenfanden. Etwa 30 min. nach dem Übergang zu denitrifizierenden Bedingungen (Abbildung 5.27a) begann die Synthese von EPS und die Zellen begannen sich unter Vermittlung der polar angeordneten Polymere zusammenzulagern. Bereits nach einer Stunde waren die meisten Zellen in lockeren Aggregaten angeordnet (Abbildung 5.27b). Gleichzeitig wurde zusätzliche EPS synthetisiert. Nach ca. 3 h befand sich schließlich die überwiegende Zahl der Organismen in dichten Aggregaten (Abbildung 5.27c). In gleicher Weise erfolgte auch die Anlagerung an innere polare Oberflächen.

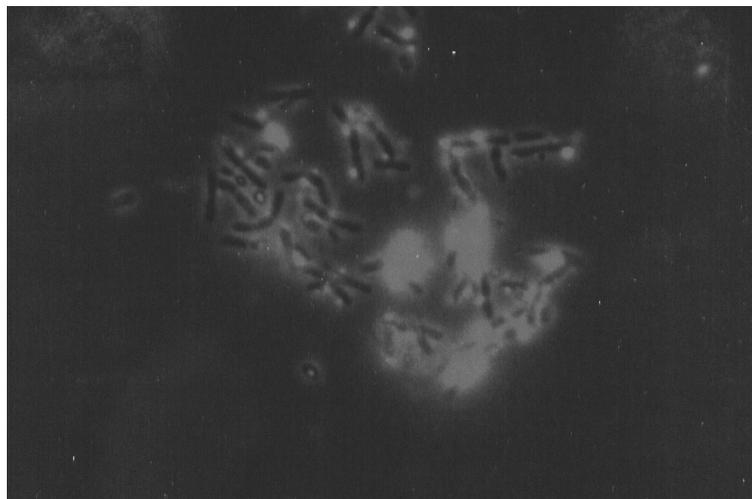
Die Synthese eines extrazellulären adhäsiven Polysaccharides, welches in Form einer Holdfast polar auf der Bakterienoberfläche angeordnet wird, erwies sich für *B. niacini* W0 als eine sehr effektive Strategie für die Etablierung dieses nicht sehr effektiven Denitrifizierers in einem denitrifizierenden Konsortium (vgl. Abschn. 7.6.1.2). In den Aggregaten können anoxische Bedingungen, die für *B. niacini* W0 eine wesentliche Voraussetzung dafür sind, daß eine effektive Denitrifikation ohne die Bildung des für den Organismus toxischen Zwischenproduktes Nitrit stattfinden kann [5. 56], wesentlich leichter aufrecht erhalten werden, als in dem die Zellen umgebenden Medium. Die Auswirkungen dieser Strategie bei der Etablierung denitrifizierender Populationen wird in Abschnitt 7.7.1.2 näher dargestellt.

Die Synthese extrazellulärer Verbindungen ist jedoch nicht nur eine Strategie von Bakterien, um geeignete Verwertungsbedingungen für bestimmte Substrate zu schaffen, sondern sie scheint auch als Streßantwort bei verschiedenen anderen extremen Umweltbedingungen eine Rolle zu spielen. So beschreiben LaPaglia und Hartzell [5. 46] die Produktion von EPS als Reaktion auf unphysiologische Temperaturen und Sauerstoffgehalte, extreme pH-Werte, toxische Metallkonzentrationen, sowie auf die Wirkungen von Xenobiotika und antibiotischer Substanzen. In unseren Untersuchungen wurden auch verschiedene Peroxoverbindungen als Auslöser für die Bildung von EPS identifiziert [5. 58]. Ein charakteristisches Beispiel einer solchen EPS-Synthese wird in Abschn. 7.3.2 dargestellt.

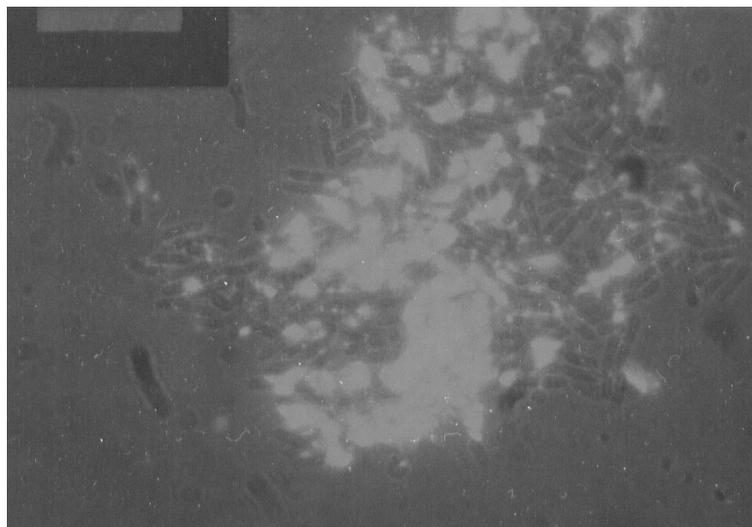
Neben Änderungen des physiologischen Zustandes der Bakterien, die in erster Linie durch die Umweltbedingungen bestimmt werden, sind für einige marine Arten auch charakteristische Lebenszyklen bekannt, die unter gleichbleibenden Umweltbedingungen ablaufen.



A



B



C

Abbildung 5.27: Bildung extrazellulärer Polysaccharide durch *Bacillus niacini* unter denitrifizierenden Bedingungen. A: 30 min nach Beginn der anoxischen Inkubation, B: nach 1 h, C: nach 3 h. Fluoreszenzfärbung mit WGA-Texas-Red-Konjugat

So durchlaufen beispielsweise Hyphomonas-Arten einen biphasigen Lebenszyklus mit einem Schwärm- und einem adhäsiven Stadium in welchem die Anheftung an innerte Oberflächen erfolgt [5. 45, 5. 72, 5. 73] (vgl. auch Abschn. 5.1.2.1.2.4).

Umgebungsbedingte Änderungen der Bakterienoberfläche können auch durch die Adsorption von Verbindungen aus dem Medium verursacht werden. So können Metallionen in großer Anzahl von den Carboxylgruppen der Oberflächenpolymere komplex gebunden werden und dabei die Struktur der Bakterienoberfläche verändern [5. 2]. Wie Gehrke et al. [5. 30] für *Thiobacillus ferrooxidans* zeigen konnten, ist die Synthese spezifischer Glykoside für die Anreicherung von Fe(III)-Ionen z.B. eine effektive Strategie für die Anheftung der entsprechenden Organismen an eisenhaltige Materialien und für die Mobilisierung der von den Organismen verwerteten Eisen-Ionen. Auch bei der pathogenen Besiedelung der Mundhöhle spielt die Adsorption von Verbindungen des Mediums eine wichtige Rolle. In diesem Fall werden verschiedene Proteine entweder spezifisch oder auch unspezifisch durch ionische Wechselwirkungen an der Oberfläche der entsprechenden Bakterien angelagert und verändern dabei die physiko-chemischen und adhäsiven Eigenschaften der beteiligten Organismen [5. 36].

Zu den Umweltfaktoren, die zumindest für einige Organismen einen deutlichen Einfluß auf die Adsorptionsfähigkeit besitzen, gehört auch die Temperatur. Arbeiten von Toren et al. [5. 90] mit *Oculina patagonica*, sowie Kelley et al. mit *Bdellovibrio bacteriovorus* [5. 44] zeigen übereinstimmend eine positive Korrelation zwischen der Temperatur des Mediums und der Intensität der Besiedelung von verschiedenen innerten Oberflächen. Genauere Angaben über die dabei ablaufenden Prozesse sind bisher nicht bekannt. Jedoch weisen die Arbeiten von Toren et al. [5. 90] darauf hin, daß unter dem Einfluß erhöhter Temperatur ein vermutlich proteinogenes Adhäsins synthetisiert wird.

Letztendlich ist zu berücksichtigen, daß Änderungen des die Zellen umgebenden Mediums immer auch Änderungen des physiko-chemischen Zustandes der auf der Oberfläche der Bakterien angeordneten Strukturen, z.B. durch Veränderung des Dissoziationsgrades oder molekulare Umlagerungen nach sich ziehen. Damit ist der Adhäsionsprozeß in hohem Maße von solchen Parametern, wie der Ionenstärke des Mediums oder dem aktuellen pH-Wert abhängig [5. 44, 5. 62].

5.1.2.2 Eigenschaften der Trägermaterialien und ihre Wirkung auf die bakterielle Adhäsion

Die technische Nutzung von Biofilmen setzt voraus, daß die Mikroorganismen auf geeigneten Trägern möglichst gezielt immobilisiert werden. Dabei ist der Träger einer der beiden wechselwirkenden Partner im Prozeß der primären Adhäsion. Entsprechend

gelten für das Trägermaterial zunächst die selben physiko-chemischen Gesetzmäßigkeiten, wie sie für die Mikroorganismen in 5.1.2.1.1. beschrieben wurden. Dabei spielen wie bei der bakteriellen Oberfläche die Hydrophobizität und die elektrostatischen Eigenschaften eine wichtige Rolle.

Soweit mit dem Trägermaterial eine glatte Oberfläche erzeugt werden kann, erfolgte die Bestimmung der Hydrophobizität bzw. der freien Oberflächenenergie mittels Kontaktwinkelmessung analog zu Abschn. 5.1.2.1.1 bzw. Abschn. A.1. r (S. xi im Anhang). Für Träger, die sich nicht als feste Oberfläche darstellen lassen, weil sie beispielsweise in Pulverform eingesetzt werden, ist die Kontaktwinkelmethode jedoch nicht geeignet. Für diese Materialien kann die Oberflächenspannung aus der kapillare Benetzungsgeschwindigkeit in einer Schicht der verwendeten Partikel bestimmt werden. Die Berechnung der Oberflächenspannung erfolgte dann nach der Gleichung von Washburn (Gleichung 5.8).

$$h^2 = \frac{tR\gamma_L\theta}{2\eta} \quad (\text{Gleichung 5.8})$$

- h: Höhe der kapillaren Benetzung in der Zeit t
- R: durchschnittliche Porenradius der Partikel
- γ_L : Oberflächenspannung der Flüssigkeit
- η : Viskosität der Flüssigkeit

Die Nettoladung der eingesetzten Träger wurde durch das Zetapotential analog zu Abschn. 5.1.2.1.1 bzw. Abschn. A.1. aa im Anhang beschrieben.

Für eine Reihe häufig verwendeter technischen Materialien wurden die Oberflächenspannungen, sowie die Nettoladungseigenschaften bereits von verschiedenen Autoren ermittelt und zusammengestellt. Einen umfangreichen Überblick geben z.B. Giese und van Oss [5. 31]. Bei van Pelt et al. [5. 104] sind zusätzlich wichtige Informationen zu den physio-chemischen Eigenschaften verschiedener polymerer Kunststoffe verfügbar.

Da sich die Adhäsion in natürlichen oder auch in technischen Systemen üblicherweise nicht unter optimierten physiko-chemischen Rahmenbedingungen vollzieht, sind bei ihrer Betrachtung einige weitere Parameter zu berücksichtigen. Dies sind z.B. abrasive Kräfte, wie die Scherkraft, die der Flüssigkeitsstrom auf die an der Oberfläche angelagerten Organismen ausübt [5. 32]. Besonders starke Scherkräfte werden erzeugt, wenn der entstandene Biofilm die Grenzfläche zwischen Wasser und Luft passiert. Busscher und van der Mei geben hierfür ca. 10^{-7} N für einen Partikel von einem μm Durchmesser an

[5. 10]. Hinzu kommen Kontakte von Partikeln untereinander oder von Biofilmpartikeln mit partikulären Verunreinigungen, die gleichfalls Scherkräfte auf die Organismen ausüben. Diese abrassiven Kräfte wirken der Adhäsion entgegen. Deshalb wird die Anlagerung von Organismen an Oberflächen unter nativen Bedingungen auch durch die Oberflächenrauigkeit bzw. die Porosität des Trägers beeinflusst [5. 42].

Auf einer glatten Oberfläche werden die Bindungen zwischen der Trägeroberfläche und dem Bakterium jeweils dann gelöst, wenn die Summe der abrassiven Kräfte die Adhäsionskraft übersteigt. Dieser Punkt wird als kritische freie Energie der Adhäsion bezeichnet [5. 28]. Die gleichen Kräfteverhältnisse gelten selbstverständlich auch für rauhe oder poröse Materialien. Jedoch sind die in Vertiefungen oder Poren angreifenden Scherkräfte ungleich geringer, als die an einer freien Oberfläche. Deshalb können sich in diesen Bereichen auch Organismen ansiedeln, deren Bindungsstärke andernfalls nicht ausreichen würde, um eine dauerhafte Bindung mit der Partikeloberfläche einzugehen.

Oberflächen in aquatischen Systemen existieren jeweils nur sehr kurze Zeit in ihrem theoretischen physiko-chemischen Zustand. Durch Eintrag, mikrobielle Zersetzung und gezielte Synthese der Organismen selbst existiert in wäßrigen Medien eine Vielzahl von organischen Substanzen, die den gleichen Gesetzen der Adsorption unterliegen, wie die zu adsorbierenden Mikroorganismen, aber auf Grund ihrer geringeren Größe eine höhere Mobilität besitzen. Diese Verbindungen lagern sich innerhalb kürzester Zeit an den eingebrachten Oberflächen an und verändern damit deren physiko-chemische Eigenschaften. Nach Untersuchungen von van Oss [5. 103] sind insbesondere extrem stark hydrophobe Oberflächen in wäßrigen Medium praktisch nicht existenzfähig. Van Oss gibt die maximal erreichbare Gibbssche Energie eines Partikels mit ca. -85 mJ/m^2 an. Das eigentliche Substratum für die Adhäsion von Mikroorganismen bildet in den meisten Fällen der durch Anlagerung gelöster Substanzen entstandene „conditioning film“. Bei den angelagerten Verbindungen handelt es sich meist um Polysaccharide, Lipopolysaccharide, Huminstoffe und Proteine [5. 50]. Der Einfluß, den der conditioning film auf das Adsorptionsverhalten der Trägermaterialien ausübt, kann im Einzelfall sehr unterschiedlich sein. Schneider et al. [5. 79] fanden bei ihren umfangreichen Untersuchungen nur geringe Wirkungen auf die physiko-chemischen Eigenschaften der Materialien. Jedoch berichten sowohl Schneider et al. selbst [5. 79], wie auch verschiedene andere Autoren [5. 9, 5. 10, 5. 88] von signifikanten Änderungen der adsorptiven Eigenschaften der Materialien durch die Wirkung des conditioning film. Allerdings bestand in den untersuchten Systemen keine Korrelation zwischen den adsorptiven und den Änderungen physiko-chemischer Eigenschaften der Materialien [5. 79].

Vor allem aus Untersuchungen an pathogenen Organismen ist bekannt, daß verschiedene Bakterienarten die adhäsiven Eigenschaften der Oberfläche des Substrats durch die Synthese hochspezifischer Polysaccharide gezielt verändern können. So geben die als mutans Streptokokken bekannt gewordenen Bakterien verschiedene Glycan-synthetisierende Enzyme in das Medium ab, die sich z.B. an Zahnoberflächen anreichern und dort als Exoenzyme aus vorhandenen Mono- oder Disacchariden spezifische Glycane synthetisieren, die dann als Adhäsine die Adsorption der Bakterien vermitteln [5. 25]. In ähnlicher Weise verändern einige *Thiobacillus*-Arten die Oberflächen von Metallen oder Mineralen. Von den Organismen gebildete Polysaccharide lagern sich auf der Oberfläche der Materialien an und gehen dort mit verschiedenen Ionen der Oberfläche Wechselwirkungen ein. Dabei wird das Oberflächenpotential der Materialien signifikant verändert [5. 30].

Wie die dargestellten Abhängigkeiten verdeutlichen, ist für das Adsorptionsverhalten eines Trägermaterials stets die Oberflächenstruktur unter den nativen Bedingungen maßgebend, unter denen die Adhäsion stattfindet. Dies gilt sowohl für die Wirkungen des conditioning film, wie auch für alle anderen Einflüsse des umgebenden Mediums auf die physiko-chemischen Charakteristika der Trägeroberfläche (z.B. Dissoziationsgrad von Ladungsträgern, Potentialänderungen u.a.).

5.2. Entwicklung und Struktur des nativen Biofilmes

Nach der irreversiblen Anheftung an die Oberfläche beginnen die Organismen zu wachsen und sich zu vermehren. Damit kommen für die weitere Entwicklung des Biofilmes mehreren neue Einflußfaktoren hinzu.

Unmittelbar nach der Anheftung beginnen die Erstbesiedler nicht nur sich zu vermehren, sondern sie produzieren auch in verstärktem Maße extraplastidäre Substanzen, die der bisherigen Trägeroberfläche völlig neue Eigenschaften verleihen können [5. 17, 5. 96]. Für einige Organismen konnte gezeigt werden, daß diese Synthese extraplastidärer Substanzen einhergeht mit der Expression bestimmter Gene [5. 51, 5. 96]. So zeigten Davies und Geesey [5. 19], daß durch die Adhäsion an einer Oberfläche die Expression des algC Gens induziert wird. AlgC codiert für ein bifunktionales Enzym, das u.a. an der Synthese von Alginat und der Glycosidkomponente in Lipopolysacchariden beteiligt ist. Die entstehende EPS-Matrix bildet die Oberfläche für die Anlagerung weiterer Organismen. In einigen Fällen werden die Voraussetzungen für die Anheftung bestimmter Spezialisten erst durch die Synthese von Polysacchariden geschaffen. Solche kooperativen Phänomene sind z.B. für die Besiedelung der Mundhöhle bekannt [5. 25].

Aber auch die gegenteiligen Wirkungen der EPS sind beschrieben worden. So fanden Pratt-Terpstra et al. [5. 70], daß die Polysaccharide, die von *Streptococcus mitis* Stämmen nach der Anlagerung an eine Oberfläche synthetisiert werden, die Adhäsion von *Streptococcus mutans* verhindern oder deutlich verringern. Die Bildung von Glycosiden dient hier also als Defensivstrategie zur Unterdrückung der Ansiedlung von potentiellen Konkurrenten.

Durch die verschiedenen Wechselwirkungen mit den sich nachfolgend ansiedelnden Organismen beeinflussen bereits die Erstbesiedler nachhaltig den Aufbau und die Zusammensetzung des entstehenden Biofilmes. Da die Erstbesiedlung jedoch im unmittelbarem Kontakt und unter der Einwirkung der Trägeroberfläche erfolgt, wird die Entstehung des Biofilmes damit indirekt auch durch die Struktur des Trägers geprägt (vgl. dazu auch Abschn. 5.2.1).

Wesentlichen Einfluß auf die Ausbildung des reifen Biofilmes wird allgemein dem umgebenden Medium zugeschrieben [5. 27]. Dabei spielen insbesondere die Art der Nährstoffe und der Umfang der Nährstoffversorgung eine herausragende Rolle [5. 13]. Aber auch weitere Faktoren, wie pH-Wert, Ionenstärke oder die Anwesenheit toxischer Verbindungen können die Struktur des Biofilmes beeinflussen.

Mit steigender Biofilmdicke gewinnen neben der Art der Organismen und ihrer Abbauleistung in wachsendem Maße Transportprozesse an Bedeutung. Der Transport von Substraten und Stoffwechselprodukten erfolgt dabei zunehmend durch Diffusion und wird maßgeblich durch den Diffusionswiderstand der Biofilmmatrix bestimmt. Allerdings zeigen die Untersuchungen von De Beer et al. [5. 20], sowie Rasmussen und Lewandowski [5. 74], daß auch ein konvektiver Transport im Biofilm stattfindet.

Die Ausbildung des Biofilmes kann gleichfalls mit verschiedenen Änderungen in der Morphologie und Physiologie der Organismen verbunden sein [5. 18, 5. 100]. Allerdings sind die Resultate verschiedener Autoren sehr unterschiedlich. In Auswertung einer Reihe von verschiedenen Studien kamen van Loosdrecht et al. [5. 100] zu dem Schluß, daß kein einheitlicher Trend zu erkennen ist. Die Auswirkungen der Immobilisierung in Biofilmen auf die Mikroorganismen sind offensichtlich stark von den jeweiligen Umweltbedingungen und den Eigenschaften des verwendeten Substrats abhängig.

Der in technischen Prozessen eingesetzte reife Biofilm ist nach vorliegendem Erkenntnisstand kein uniformes Gebilde aus gleichmäßig in einer Matrix eingelagerten Organismen, sondern vielmehr eine hoch organisierte Struktur aus Mikrokonsortien spezialisierter und interagierender Organismen, einer wahrscheinlich wohlstrukturierten

Biofilmmatrix und wassergefüllten Zwischenräumen [5. 15]. Eine modellhafte Zusammenfassung des aktuellen Bildes vom Biofilm geben u.a. Busscher und van der Mei [5. 10].

5.2.1 Einfluß des Trägers auf Zusammensetzung und Struktur der Biofilme

Der Einfluß der Trägermaterialien auf die Biofilmbildung wird meist vor allem in Bezug auf die primäre Adhäsion der Organismen diskutiert. Da der Träger bei der Entwicklung des reifen Biofilmes sehr schnell vollständig von der Biofilmmatrix eingeschlossen wird, wird ihm für die weitere Biofilmentwicklung allgemein nur eine untergeordnete Rolle eingeräumt [5. 27]. Allerdings kommen van der Mei et. al. in Auswertung verschiedener Untersuchungen zu dem Schluß, daß die unmittelbare Kontaktzone zwischen Substratum und dem sich ausbildenden Biofilm erhebliche Bedeutung für die Festigkeit des sich entwickelnden Biofilmes besitzt [5. 7, 5. 10]. Insbesondere dann, wenn zwischen der Trägeroberfläche und dem Biofilmkonsortium ein conditioning film angeordnet ist, kann die Festigkeit der Bindung in diesem Bereich über die Scherfestigkeit und damit über das Ausmaß der Abtrennung von Biofilmbestandteilen entscheiden.

Untersuchungen von Dalton et al. [5. 18] haben weiterhin gezeigt, daß unter dem Einfluß verschiedener Trägermaterialien unterschiedliche morphologische Änderungen der Organismen resultieren können. Während die Besiedelung hydrophober Oberflächen zu dichte Kolonien von einzelnen und paarigen Bakterien führte, die einen weitgehend geschlossenen Biofilm formten, kam es bei der Besiedelung hydrophiler Oberflächen zur Ausbildung langer Ketten und einer geringen Oberflächenbedeckung. Nach unseren Erfahrungen können solche Unterschiede dann auch Einfluß auf die Struktur des reifen Biofilmes, insbesondere in Bezug auf die Struktur von Zellclustern und Zwischenräumen nehmen. Verschiedene eigene Untersuchungen an Trägermaterialien mit definierten Oberflächenstrukturen (vgl. Abschn. 6) und unter Verwendung der Raster-Elektronenmikroskopie, sowie der Epifluoreszenz- und Laserscanmikroskopie zeigen, daß über die Wahl des Trägers durchaus Einfluß genommen werden kann, nicht nur auf die Zusammensetzung und Morphologie des primären Biofilmes, sondern auch auf seine räumliche Struktur. Dies gilt zumindest für stark spezialisierte Biofilmpopulationen und Biofilme mit geringer Dicke, wie sie üblicherweise für den Abbau persistenter Verbindungen verwendet werden. Abbildung 5.29 zeigt die Entwicklung der Biofilme auf 3 verschiedenen Polystyrenträgern mit unterschiedlichen elektrostatischen Eigenschaften. An unmodifizierten Polystyrenträgern wurden die Wechselwirkungen zwischen den Organismen und der Trägeroberfläche überwiegend durch Lifshitz- van der Waals und elektrostatische

Wechselwirkungen geprägt ($\gamma_{\text{iwi}}^{\text{LW}}$: ca. -42 mJ/m^2 , ξ -Potential in 1 mM NaCl: $-25,5 \text{ mV}$). Das kationische Trägermaterial wies ein ξ -Potential von $+28,7 \text{ mV}$, das anionische von $-32,9 \text{ mV}$ auf (zu den Eigenschaften der Materialien vgl. auch Tabelle 6.1 in Abschn. 6). Die dargestellte Abbildung zeigt den Bewuchs der Träger nach einer Woche in einem Modellreaktor mit 3,4,-Dimethylphenol als Substrat unter identischen Umweltbedingungen und einer Belebtschlamm suspension als Animpfmateri al. Auf den 3 Trägermaterialien hat in dieser Zeit eine Besiedelung des Substrats begonnen. Auffallend sind zunächst die Unterschiede in der Dichte der Besiedelung, die mit abnehmender polarer Repulsion erheblich zunahm. Dieser Vorteil oberflächenpositivierter Materialien ist seit langem bekannt und wird vor allem in der Zellkultur, aber auch für einige Trägermaterialien in der Umwelttechnik verwendet [5. 24, 5. 37]. Wesentlich sind jedoch vor allem die Unterschiede in der Struktur der sich bildenden Biofilme. Auf dem unmodifizierten moderat hydrophoben Material zeigte sich eine Besiedelung in Clustern und kettenförmigen Anordnungen. Die Bildung von EPS war gering. Ein Wachstum des Biofilmes in den Raum fand jedoch kaum statt. Auf den modifizierten Materialien war die Matrix extrazellulärer Substanzen hingegen weitaus stärker ausgeprägt. Dabei fand auf dem anionischen Träger zunächst keinerlei Wachstum in den Raum statt. Im Gegensatz dazu zeigte sich auf dem kationischen Substrat eine erhebliche Entwicklung räumlicher Strukturen.

Diese Entwicklung der Biofilme entspricht gut den theoretischen Annahmen anhand der physiko-chemischen Eigenschaften der Träger. Wenn die DLVO Theorie zugrunde gelegt wird, so befindet sich im Abstand von ca. 10-20 nm von der Trägeroberfläche eine Energiebarriere die das primäre vom sekundären Minimum trennt. Die Höhe dieser Energiebarriere wird wesentlich durch die elektrostatischen Eigenschaften des Trägers bestimmt und ist bei positiver Nettoladung nicht vorhanden, während sie mit zunehmender Negativierung der Trägeroberfläche ansteigt. Entsprechend ist der Aufenthalt in diesem Bereich für die meist negativ geladenen Bakterien thermodynamisch nicht favorisiert. Ein Wachstum in diesen Raum hinein fand demzufolge erwartungsgemäß auch im Experiment kaum statt.

Gleichzeitig weist die starke Synthese von Polysacchariden (vgl. Abbildung 5.28) sowohl bei kationischen, wie auch bei anionischen Trägern darauf hin, daß vorhandene Ladungen bei nicht spezifischen Bindungen für viele Organismen eher nachteilig für die Adsorption an einer Oberfläche sind. Die EPS können unter diesen Bedingungen zur Festigung der adsorptiven Bindungen beitragen, indem die repulsiven Wirkungen elektrostatischer Kräfte abgeschwächt bzw. überbrückt werden. Das Verhalten der Organismen während der Biofilmbildung stimmt gut mit den Ergebnissen der Modellversuche zur primären Adsorption in Abschn. 5.1.2.1.1 überein und verdeutlicht,

daß elektrostatische Wechselwirkungen nicht nur die primäre Adsorption, sondern auch die weitere Ausprägung des Biofilms beeinflussen können.

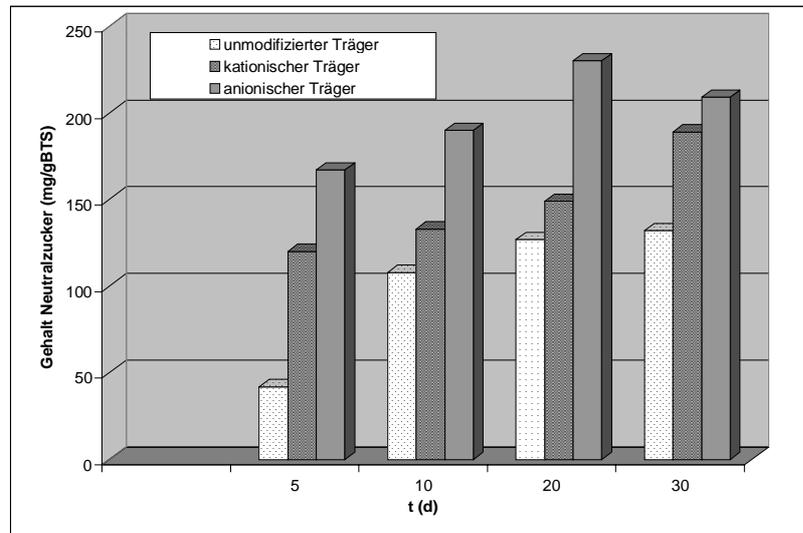
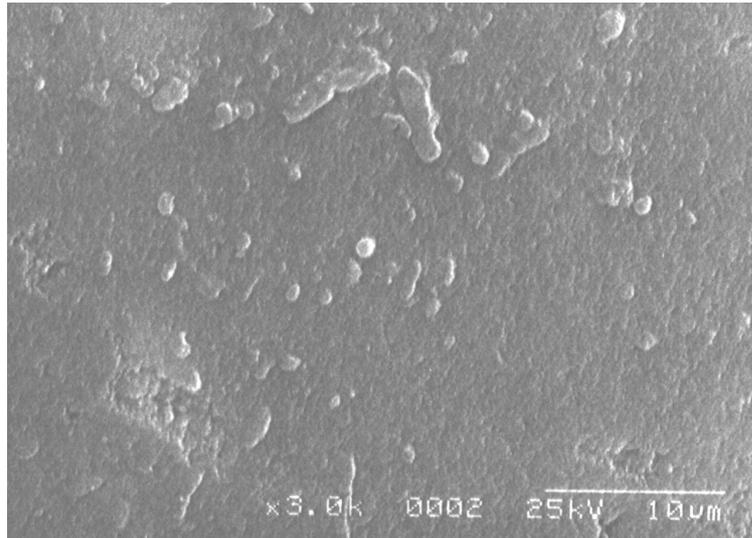


Abbildung 5.28: Polysaccharidgehalte in der Biofilmmatrix von Biofilmkonsortien auf unterschiedlichen Trägermaterialien. Die Angaben beziehen sich auf die meßbaren Neutralzucker nach Extraktion (Bestimmung mittels Phenol-Schwefelsäure-Methode). Die Biomassegehalte wurden aus dem Anteil an Lipidphosphaten berechnet.

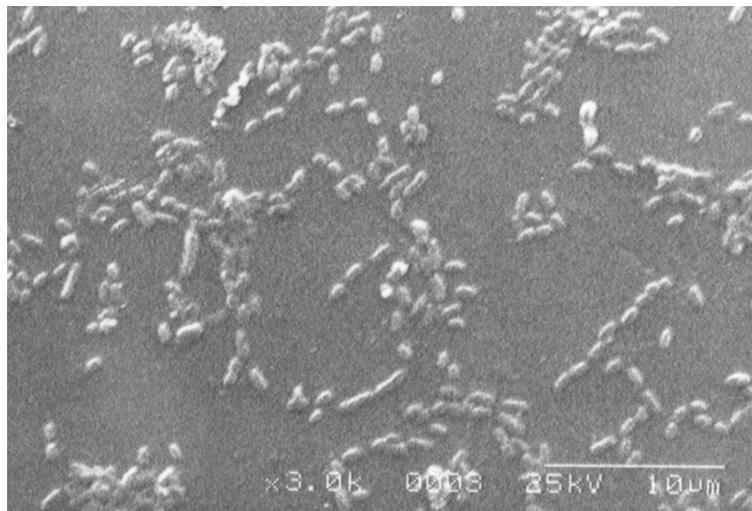
Zusätzliche Untersuchung der Biofilmentwicklung mittels Fluoreszenzmikroskopie und die Analyse der extrazellulären Polysaccharide ergaben, daß die Unterschiede in der räumlichen Struktur der Biofilme auch während der weiteren Entwicklung der Biofilme erhalten blieb. Während auf den negativ geladenen Trägern ein relativ dichter und geschlossener Biofilm entstand und sich über mehrere Schichten fortsetzte, blieb jener auf dem kationischen Material wesentlich lockerer strukturiert.

Bei sehr dicken Biofilmen, wie sie üblicherweise bei leicht abbaubaren Substraten z.B. in der kommunalen Abwasserbehandlung vorliegen, sind solche Unterschiede jedoch sicher auf die unteren Bereiche des Biofilmes beschränkt. Untersuchungen anderer Autoren an solchen Systemen zeigen kaum nachweisbare Effekte der Träger auf den reifen Biofilm [5. 27].

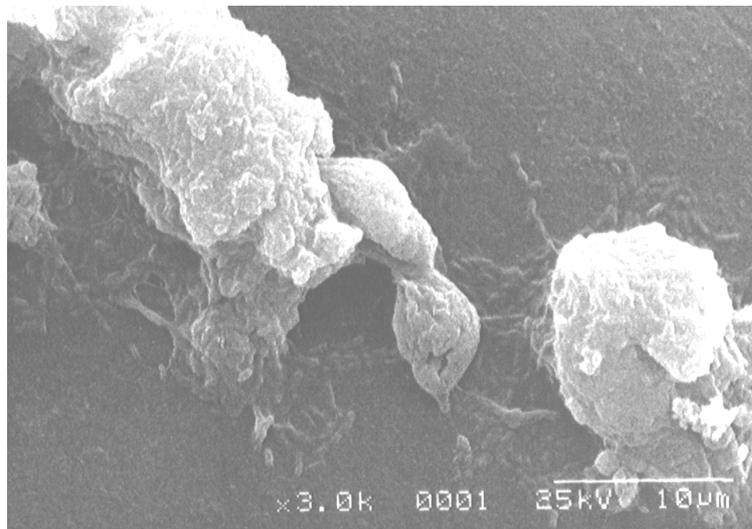
Wie in den folgenden Abschnitten gezeigt wird, kann der Einfluß des Trägers jedoch für die Etablierung von Spezialisten bei begrenztem Substratangebot oder aber auch für die gleichzeitige Etablierung verschiedener Abbaumechanismen von Bedeutung sein. Weiterhin zeigen Untersuchungen verschiedener Autoren, daß zumindest in Einzelfällen auch die artliche Zusammensetzung der Biofilme beeinflußt werden kann [5. 54, 5. 111] (vgl. auch Abschn. 6).



kationische
Polystyren



unmodifiziertes
Polystyren



anionische
Polystyren

Abbildung 5.29: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmentwicklung auf Trägermaterialien mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen

5.2.2. Wirkung von Umweltfaktoren auf Zusammensetzung und Struktur von Biofilmen

Nach Untersuchungen von verschiedenen Autoren wird die Struktur des Biofilmes wesentlich durch die Einwirkung des Mediums geprägt [5. 27]. Eine besondere Rolle kommt dabei dem Substrat zu. Bei technischen Verfahren für die Eliminierung von Umweltschadstoffen ist das Substratspektrum jedoch in weiten Bereichen festgelegt und stellt üblicherweise eine feste Einflußgröße dar.

Das Substratangebot nimmt natürlicherweise Einfluß auf die artliche Zusammensetzung der mikrobiellen Konsortien [5. 59, 5. 64, 5. 109] und beeinflusst damit gleichzeitig auch die Struktur des Biofilmes. Nach übereinstimmenden Untersuchungen von Wolfaart et al. [5. 109] sowie Möller et al. [5. 64] bilden sich vor allem beim Abbau von persistenten und toxischen Verbindungen ausgeprägte Cluster mikrobieller Konsortien, während Biofilme beim Abbau leichter verwertbarer Substanzen eine mehr uniforme Struktur zeigen. Darüber hinaus synthetisieren Biofilmpopulationen unter der Wirkung toxischer Verbindungen verstärkt extraplastidäre Substanzen, insbesondere Polysaccharide. Abbildung 5.30 zeigt beispielhaft die Änderung des Polysaccharidgehaltes von Organismen in Belebtschlammflocken nach dem Zusatz von Wasserstoffperoxid.

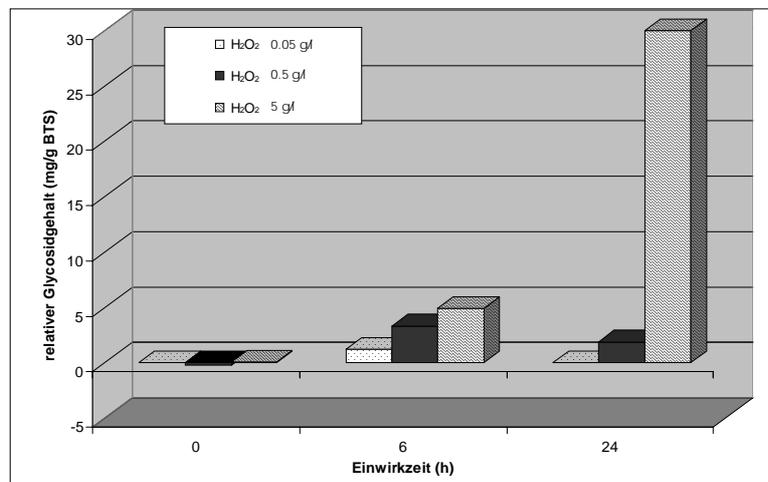


Abbildung 5.30: Änderungen des Gehaltes an Neutralzuckern unter der Einwirkung von unterschiedlichen Konzentration an Wasserstoffperoxid. Dargestellt sind die relativen Änderungen in Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle.

Eigentliches Ziel der von uns durchgeführten Untersuchungen war die Verbesserung der Absetzeigenschaften von Belebtschlamm einer Industriekäranlage durch selektive Schädigung von fadenförmig wachsenden Organismen. Nach den dabei erzielten Ergebnissen beruht jedoch der allgemein bekannte Effekt der verbesserten Sedimentation von Belebtschlamm durch den Zusatz von Wasserstoffperoxid oder Natriumhypochlorid

eher auf der Bildung von extraplastidären Polysacchariden, als auf der Schädigung der fadenbildenden Organismen [5. 53]. In dem von uns untersuchten Belebtschlammssystem mit mindestens 3 nachweisbaren verschiedenen Fadenbakterienarten unterschiedlicher taxonomischer Gruppen konnte bei keinem der Organismen mittels fluoreszenzmikroskopischer Methoden (Differenzfärbung mit DAPI und Sytox Green, vgl. Abschn. 6.1.v, S. xiv) eine nennenswerte Verringerung des Anteiles vitaler Zellen festgestellt werden. Im Gegenteil traten zuerst Schädigungen bei den Organismen in den äußeren Schichten der vorhandenen Flocken auf [5. 53]. Die Verbesserung der Absetzeigenschaften beruhte demzufolge im wesentlichen auf der Bildung kompakterer Flocken mit höheren Anteilen an EPS (vgl. Abbildung 5.30). Wie weitere Untersuchungen zum Abbau organischer Peroxide zeigten, wirkt die gebildete extrazelluläre Matrix zusätzlich als starke Diffusionsbarriere und ermöglicht damit einen weitgehenden Schutz der mikrobiellen Konsortien im Innern der Flocke (vgl. Abschn. 7.3.2).

6. Optimierung von Biofilmsystemen für den Abbau definierter Umweltschadstoffe.

Um für den Abbau bestimmter, vor allem persistenter oder toxischer Umweltschadstoffe optimale Abbauleistungen zu erzielen, ist eine gezielte Optimierung des Systems von Mikroorganismen, den zu eliminierenden Schadstoffen und den verwendeten Trägern notwendig. Dazu können in vielen Fällen die physiko-chemischen Parameter der beteiligten Partner herangezogen werden. Jedoch ist es notwendig, nicht nur die Spezialisten für das gewünschte Substrat zu betrachten, sondern auch mögliche Konkurrenten um Substrat und Raum im Biofilm. Ein charakteristisches Beispiel dafür ist die von uns untersuchte Etablierung von *Pseudomonas acidovorans* Ca50 in einem System zum Abbau von Chlornitrobenzolen. Wie Abbildung 5.11 und Tabelle 5.6 verdeutlichen, ist *P. acidovorans* Ca50 zwar eher hydrophil, bindet aber aufgrund seiner geringen Oberflächenladung und seines unter physiologischen pH-Bedingungen ausgewogenen Verhältnisses von positiven und negativen Ladungszentren gut auch an hydrophoben Materialien (46 % Adsorption an Hexadekan im MATH-Test). Aufgrund dieser Eigenschaften wurden zunächst unter Laborbedingungen und mit dem reinen Substrat gute Ergebnisse mit Polyurethan als Trägermaterial erzielt (Kuhlman, TU Berlin FG Siedlingswasserwirtschaft, persönliche Mitteilung). In nativen industriellen Abwässern stellen die Chlornitrobenzole jedoch üblicherweise nur einen geringen Teil der Gesamt-CSB-Fracht des Wassers dar. Die entsprechenden Spezialisten stehen also in Konkurrenz mit einer Vielzahl anderer Organismen mit unterschiedlichsten Oberflächeneigenschaften, für die hydrophobe Trägermaterialien gleichfalls eine optimale

Aufwuchsfläche bieten. Entsprechend zeigten die mit reinen Kulturen erzeugten Biofilme mit Mischsubstraten schnell Instabilitäten und verloren die Eigenschaft zum Abbau von Chlornitrobenzolen schließlich ganz. Als geeignetere Lösung für den Einsatz unter nicht sterilen Bedingungen erwies sich deshalb die Verwendung von unmodifiziertem Sinterglas (Siran). Auf Grund seiner außerordentlich geringen polaren und elektrostatischen Eigenschaften kann *P. acidovorans* Ca50 die stark negativen Oberflächen des Sirans eher besiedeln als viele der potentiellen Konkurrenten. Damit wurde der Konkurrenzdruck erheblich vermindert und das System deutlich stabilisiert.

Häufig zeigt sich jedoch, daß unter den theoretisch erwarteten optimalen Bedingungen nicht die erwünschten Leistungen erzielt werden. Um solche Abweichungen von den theoretischen Annahmen frühzeitig zu erkennen, sind Versuche mit ausgewählten Modellträgern ein geeignetes Mittel. Die Verwendung eines definierten Systems verschieden strukturierter Träger ermöglicht dabei die Bearbeitung ganz unterschiedlicher Fragestellungen.

Eine wesentliche Frage ist die Bestimmung des adsorptiven Verhaltens der Organismen unter möglichst realen Bedingungen. Dabei sind sowohl die Zahl der gebundenen Mikroorganismen, wie auch die Festigkeit der Bindung von Interesse. Je nachdem, welche technologische Lösung für den Biofilmprozeß letztendlich angestrebt wird, ist es von Vorteil, wenn bereits bei Adsorptionsversuchen unterschiedliche Scherkräfte simuliert werden können. Betrachtet man in diesem Zusammenhang die zur Verfügung stehenden Ergebnisse verschiedener Autoren, so fällt auf, daß bakterielle Adhäsion mit teils ganz unterschiedlichen Systemen ermittelt wird. Dabei kann grob unterschieden werden zwischen statischen und dynamischen Methoden. Die Messung in statischen Systemen erfolgt, indem die zu testenden Materialien in einer Suspension der entsprechenden Organismen plaziert werden. Nach definierten Zeiten bei je nach Bearbeiter unterschiedlicher Durchmischung und unterschiedlicher Anzahl und Intensität von Spühlschritten wird die Zahl der gebundenen Organismen auf der Trägeroberfläche bestimmt [6. 16, 6. 19, 6. 20]. Statische Methoden können überall dort geeignet sein, wo der native Adsorptionsprozeß gleichfalls überwiegend unter statischen Bedingungen erfolgt, wie beispielsweise im Boden. Relativ schwierig ist bei solchen Systemen die Ermittlung der tatsächlichen Festigkeit der adsorptiven Bindungen bzw. der auf das System einwirkenden äußeren Kräfte. So kann das Ergebnis bereits durch die Entnahme des Trägers und der dabei stattfindenden Passage der Wasser-Luft-Grenzschicht dramatisch verändert werden.

Die meisten technischen Systeme zur Eliminierung von Umweltschadstoffen werden mehr oder weniger intensiv durchströmt bzw. durchmischt. Für die Simulation des Adsorptionsverhaltens von Organismen in solchen Systemen sind eher dynamische

Verfahren der Adsorptionsmessung geeignet. Allgemein verbreitet ist dabei die Messung in einer Durchflußkammer mit parallel angeordneten Wänden [6. 1]. Das Prinzip dieser Parallelplattenkammer ist in Abbildung 6.1 dargestellt. Die Meßanordnung wird im Anhang (Abschn. A.1. t, S. xii) näher beschrieben.

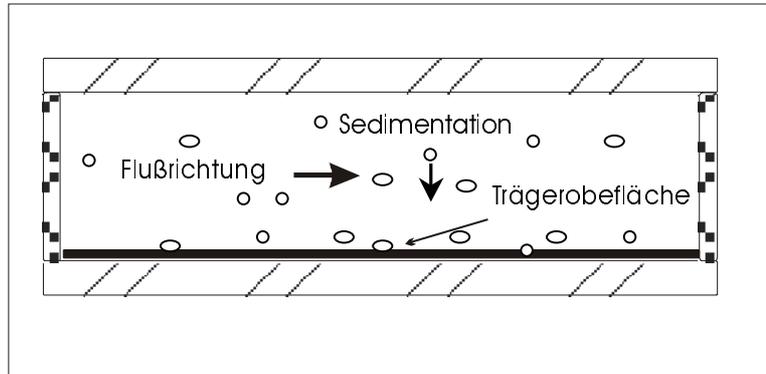


Abbildung 6.1: Wirkprinzip der Parallelplattenkammer zur Bestimmung der Adsorption von Bakterien an innerte Oberflächen

Die Parallelplattenkammer ist sehr gut geeignet, wenn exakte Meßgrößen bestimmt werden sollen. Sie eignet sich deshalb vor allem für die Ermittlung der thermodynamischen Kenngrößen der Adsorption. Darüber hinaus ist bei genauer Angabe von Mediumzusammensetzung, Partikeldichte, sowie von Durchflußgeschwindigkeit und Inkubationszeit eine sehr gute Vergleichbarkeit der Ergebnisse unterschiedlicher Autoren gegeben. Der wesentlichste Nachteil der Methode besteht darin, daß es mit dieser Anordnung nicht möglich ist, die Adsorption an partikulären oder porösen Materialien zu messen. Deshalb nutzten z.B. Rijnaarts et al. [6. 16] für die Ermittlung des Adsorptionsverhaltens solcher Materialien gepackte Säulen. Nach unseren Erfahrungen ist jedoch dabei der Anteil unspezifischer Zellrückhaltung relativ hoch. Auch lassen sich mit gepackten Säulen nur begrenzte Durchflußgeschwindigkeiten realisieren. In unseren Untersuchungen besser bewährt hat sich für partikuläre Träger die Verwendung einer Wirbelschichtkammer. Die verwendete Meßanordnung ist im Anhang Abschn. A.1.u, S. xiii dargestellt. Mit dieser Meßanordnung können unterschiedliche Strömungsgeschwindigkeiten und damit auch unterschiedliche Scherkräfte simuliert werden. Nachteilig wirkt sich dabei aus, daß je nach Dichte der verwendeten Träger jeweils nur ein begrenzter Korridor für die Variation der Strömungsgeschwindigkeit zur Verfügung steht. Zu geringe Strömungsgeschwindigkeiten ermöglichen keine Fluidisierung der Partikel, woraus die genannten Nachteile der Messung in einem Festbett resultieren. Zu hohe Strömungsgeschwindigkeiten bewirken eine Anreicherung der Trägerpartikel an der oberen Siebplatte, was ebenfalls zu Festbettbedingungen führt.

In der von uns verwendeten Meßanordnung kann das Wirbelbett im Bedarfsfall auch durch Luft erzeugt werden. Die Scherkräfte, die durch eine Wasser-Luft-Grenzfläche ausgeübt werden, gehören zu den stärksten auf einen Biofilm einwirkenden Kräfte überhaupt und werden für einen Partikel von 1 µm Durchmesser mit ca. 10^{-7} N angegeben [6. 3]. Dies ist mindestens zwei Zehnerpotenzen mehr, als allgemein für die Bindungskräfte zwischen Mikroorganismen und inneren Oberflächen angegeben wird [6. 17]. Dennoch finden unter solch extremen Bedingungen Adsorptionsprozesse statt, wie z.B. aus den Belegen an Schiffsrümpfen oder den dichten Biofilmen in Abwasserkanalsystemen zu ersehen ist. Auch in verschiedenen technischen Anlagen, die für Biofilntechnologien zum Einsatz kommen (Airliftreaktoren, Tauchstrahlsysteme) sind die Mikroorganismen mit ständigen Scherkräften an der Gasphase konfrontiert. Für eine reale Bewertung des Adsorptionsprozesses von Mikroorganismen in solchen Anlagen muß der Kontakt der Organismen und der Biofilmpartikel mit der Gasphase simuliert werden. Dies ist mit der Wirbelschichtkammer in der hier verwendeten Anordnung möglich. Der Adsorptionsverlauf für zwei unterschiedliche Organismen und ausgewählte Modellträger in einer luftgetragenen Wirbelschicht ist beispielhaft in Abbildung 6.2 dargestellt und zeigt die typische Sättigungskinetik, wie sie auch bei anderen Modellsystemen für die Adsorption angetroffen wird.

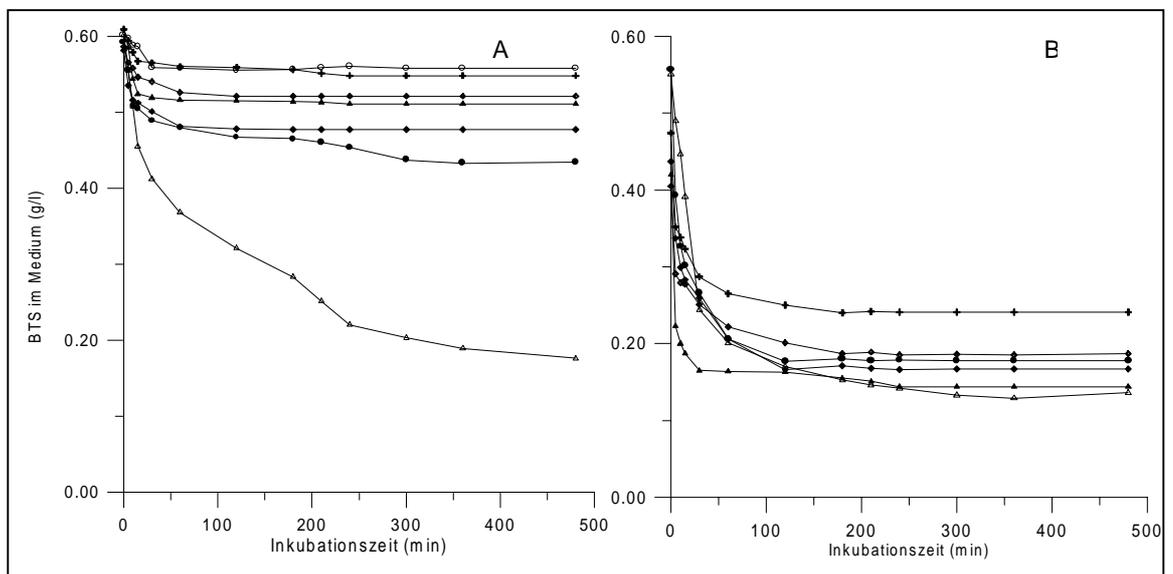


Abbildung 6.2: Adsorption von Mikroorganismen an unterschiedliche Modellträger in einer luftgetragenen bzw. einer flüssigkeitsdurchströmten Wirbelschicht (15 cm/min).
 A: *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F10
 B: *Bacillus niacini* W0

- +— EP63
- ▲— SL30
- ◆— AD41
- ◆— SZ30
- SN36
- KS10
- △— EP 63 im Flüssigkeitsstrom

Die absoluten Zahlen der adsorbierten Organismen wichen jedoch je nach Oberflächenstruktur der Organismen deutlich von denen in der flüssigkeitsdurchströmten Kammer ab. Für die meisten der untersuchten Bakterienstämme ergab sich erwartungsgemäß in der luftgetragenen Wirbelschicht eine deutlich geringere Zahl adsorbierter Organismen, als in der flüssigkeitsdurchströmten Kammer (Abbildung 6.2A). Im Vergleich zu einem Flüssigkeitsstrom von 15 cm/min lag die durchschnittliche Beladung bei 25-80 %. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch Gjaltema et al. [6. 7] bei der Untersuchung der Biomassenentwicklung von *Pseudomonas putita* in Airlift-Schlaufen-Reaktoren. Durchschnittlich wurden in den durch starke Turbulenzen geprägten Reaktoren nur ca. 50 % der trägergebundenen Biomasse erreicht, die aus statischen Adhäsionstests zu erwarten war. Darüber hinaus folgte die Adsorption der Organismen in statischen Versuchen weitgehend den theoretischen Annahmen (die beste Adsorption wurde mit aufgerauhten porösen Trägern ohne starke Nettoladung oder positivierten Oberflächen erzielt), während die Autoren in den verwendeten Airlift-Reaktoren keinen Einfluß der physiko-chemischen Trägereigenschaften mehr feststellen konnten. Bei den von uns durchgeführten Adsorptionsmessungen unter dynamischen Bedingungen (flüssigkeitsgetragene Wirbelschicht mit einer Strömungsgeschwindigkeit von 15 cm/min, bzw. luftgetragene Wirbelschicht), war die Abhängigkeit der Adsorption von der Struktur des Trägers hingegen weitgehend unbeeinflusst vom verwendeten Meßverfahren. Ein etwas anderes Bild ergab sich lediglich für *Bacillus niacini* W0, angezogen unter denitrifizierenden Bedingungen (Abbildung 6.2B). Wie bereits in Abschn. 5.1.2.1.2.1 erläutert, synthetisieren diese Organismen unter semianaeroben Bedingungen extraplastidäre Substanzen, die bei den verwendeten schwach hydrophoben und polaren Modellträgern die Adhäsion der Organismen vermitteln. Offensichtlich sind die dabei entstehenden Bindungen zwischen den Bakterien und den Trägeroberflächen wesentlich stärker als die der meisten anderen untersuchten Mikroorganismen. Deshalb war für diese Organismen kein signifikanter Einfluß der stärkeren Scherkräfte in der luftgetragenen Wirbelschicht gegenüber jenen im Flüssigkeitsstrom erkennbar. Auch waren für *B. niacini* W0 die Einflüsse der physiko-chemischen Trägereigenschaften wesentlich geringer als bei den anderen untersuchten Stämmen.

Bei der Optimierung der Träger für definierte Biofilmsysteme hat sich in unseren Untersuchungen eine Anordnung von definierten Modellträgern als hilfreich erwiesen. Für die Etablierung solcher Trägermodelle zur Beschreibung des Adsorptionsverhaltens von Bakterien mußte dabei zunächst ein geeignetes Modellmaterial gefunden werden. In unseren Arbeiten bewährt haben sich dafür unterschiedlich modifizierte Polystyrene, die von der Forschungsabteilung der Bayer AG in Bitterfeld synthetisiert wurden. Dabei handelt es sich um Versuchsprodukte in Anlehnung an die entsprechenden Handelstypen. Bei der Synthese der jeweiligen Produkte wurde Wert gelegt auf eine vergleichbare

Porenstruktur und eine einheitliche Oberfläche. Auf die für entsprechende andelsprodukte üblichen Formulierungen wurde verzichtet. Die wichtigsten Parameter der verwendeten Materialien sind in Tabelle 6.1 zusammengefaßt.

Ein wesentlicher Vorteil von Polystyren als Trägermatrix besteht in seinen thermodynamischen Oberflächeneigenschaften. Polystyren wird allgemein als hydrophobes Trägermaterial eingestuft. Das von uns verwendete Material war aber mit einem γ_{wi} von ca. 46 mJ/m² thermodynamisch betrachtet nur sehr schwach hydrophob. An dieser Stelle muß angemerkt werden, daß die angegebenen Grenzflächenspannungen in Tabelle 6.1 nur als Richtwerte betrachtet werden sollten. Da die Grenzflächenspannungen für die partikulären Materialien nicht direkt gemessen werden konnten, machte sich ein Verreiben zu einem Pulver erforderlich, für das dann die kapillare Benetzung ermittelt wurde. Die dabei erzielten Ergebnisse müssen jedoch nicht vollständig mit der tatsächlichen Grenzflächenspannung an der äußeren Oberfläche der Partikel übereinstimmen. Vergleichbare Resultate anderer Autoren [6. 20] lassen jedoch eine hinreichende Zuverlässigkeit der Ergebnisse erwarten.

Mit seiner geringen Hydrophobizität ermöglichte das ausgewählte Modellmaterial einerseits einen guten Kontakt zum umgebenden Medium und andererseits eine effektive Adsorption für die meisten der untersuchten Organismen. Gleichzeitig konnten durch geringe Modifikationen (z.B. Beschichtung mit Polyethylenimin) sowohl eine hydrophilere, wie auch eine hydrophobere Modifikation, sowie mehrere Varianten mit unterschiedlichen ionischen Eigenschaften erzeugt werden.

Ein weiterer Vorteil der gewählten Matrix ergibt sich aus der Tatsache, daß Polystyren selbst keine polaren Oberflächeneigenschaften aufweist. Bei Verwendung des unmodifizierten Trägermaterials sind also ausschließlich Lifshitz Van der Waals Wechselwirkungen zu betrachten. Allerdings wird mit jeder Modifikation auch die Polarität verändert, so daß die Bewertung der Wechselwirkungen der modifizierten Materialien deutlich schwieriger wird. Die Ausführungen in Abschnitt 5.1.2.1 machen jedoch deutlich, daß mit den verwendeten Materialien und unter Zuhilfenahme der thermodynamischen und der Strukturdaten der Bakterienoberfläche relativ zuverlässige Aussagen zum Adsorptionsverhalten der Organismen möglich sind.

Die Adsorption der Mikroorganismen erfolgt bei den verwendeten Modellträgern ausschließlich auf der äußeren Oberfläche der Partikel. Die adsorbierten Organismen stehen also in direktem Kontakt mit dem umgebenden Medium und sind den an der Oberfläche angreifenden Kräften vollständig ausgesetzt. Gleichzeitig steht aber eine große innere Oberfläche für die Adsorption von niedermolekularen Substraten zur Verfügung, während hochmolekulare Verbindungen wieder überwiegend im Bereich der äußeren Oberfläche gebunden werden (vgl. Adsorptionsisothermen in Abschn. 7.1 bzw. 7.2).

Tabelle 6.1: Eigenschaften der verwendeten Modellträger

Matraxeigenschaften							
Material		Stvrol-Divinylbenzol-Copolvmerisat					
Vernetzungsgrad		10-11 %					
mittlerer Porendurchmesser d_{50}		10 nm					
innere Oberfläche		ca. 700 m ² /g					
mittlere verfügbare Oberfläche > 1 μm		95 cm ² /g					
mittlerer Korndurchmesser		0,6-0,8 mm					
mittlere Dichte		1,2 g/ml					
verwendete Modifikationen							
Bezeichnung	funktionelle Gruppen	Kationenkapazität (meq/g)		Anionenkapazität (meq/g)		ξ -Potential mV	γ_s mJ/cm ²
		H ⁺	Orange II	Cl ⁻	Kristallviolett		
EP 63	keine	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	-25,5	42
EP63 hyd.	hydrophilisiert	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	-25,2	37
OC1060	hydrophobiert	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	-28,6	74
KS 10	— SO ₃ H	<0.01	<0.01	0,88	0,43	-32,9	34
AD 41	— N $\left\{ \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \right.$	1,02	1,16	<0.01	<0.01	+28,7	43
SZ 30	— N $\left\{ \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \end{array} \right.$	0,56	0,46	<0.01	<0.01	+23,3	27
SN 36	— N $\left\{ \begin{array}{l} \text{CH}_2\text{-CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{-CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{-CH}_3 \end{array} \right.$	0,69	0,76	<0.01	<0.01	+18,4	30
SL 30	— N $\left\{ \begin{array}{l} \text{CH}_3 \\ \text{CH}_3 \\ \text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH} \end{array} \right.$	0,50	0,54	<0.01	<0.01	+26,2	25

γ_s : Oberflächenspannung der Partikel in Wasser (Standardabweichung < 1 mJ/cm²)

Die Etablierung von Organismen mit definierten Abbauleistungen vollzieht sich nicht nur über die Adsorption an einer definierten Oberfläche. Im weiteren Verlauf der Biofilmbildung entscheiden das Wachstum der Organismen und die Ablösung von Bakterien und Biofilmteilen über Erfolg oder Mißerfolg der Ansiedelung. Trotz zahlreicher Untersuchungen vor allem in den vergangenen zwei bis drei Jahren [6. 6, 6. 15, 6. 21] ist die Populationsdynamik des sich entwickelnden Biofilmes jedoch nach wie vor weitgehend unbekannt und unser Wissen darüber von eher widersprüchlichen Ergebnissen geprägt. Aufschluß über die Entwicklung der Biofilmpopulation geben letztendlich vor allem Versuche in kontinuierlich betriebenen Versuchsanlagen. Die von uns eingesetzten Systeme wurden überwiegend als Wirbelschichtanlagen betrieben und sind an verschiedener Stelle ausführlich beschrieben worden [6. 12, 6. 13, 6. 14]. Abbildung 6.3 zeigt den schematischen Grundaufbau eines solchen Wirbelschichtreaktors in Labormaßstab mit 2l Innenvolumen.

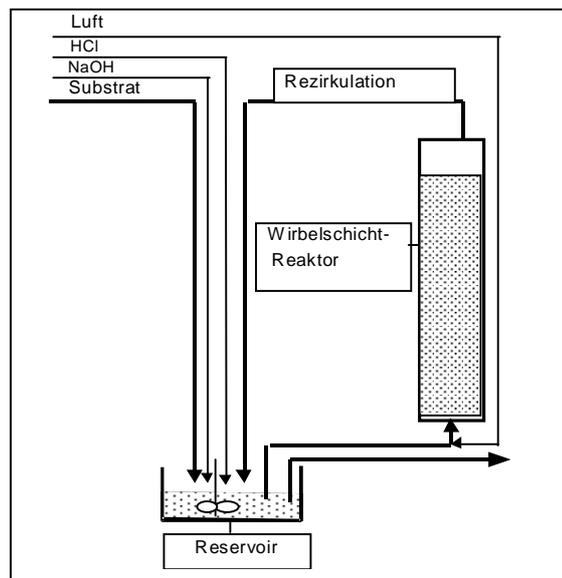


Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der verwendeten Laborbiofilmreaktoren [6. 12]

Wie bereits in Abschn. 5.2.2 erläutert, werden die Zusammensetzung der mikrobiellen Population, sowie die Struktur des Biofilmes stark von der Zusammensetzung des verwerteten Substrates geprägt. Auch Massol-Deya et al. [6. 15] zeigen für den Abbau von BTX-Aromaten, daß vergleichbare Substratkompositionen auch zur Ausbildung vergleichbarer mikrobieller Populationen führen. Für die Untersuchungen von Massol-Deya ist zusätzlich bemerkenswert, daß mehrere extern zugesetzte Stämme selbst bei vorheriger Adaption der Biofilmpopulationen innerhalb kurzer Zeit von der autochtonen Mikroorganismenflora verdrängt wurden und dabei eine Steigerung der Abbauleistung eintrat. Leider ist für diesen Fall die Oberflächenstruktur der beteiligten Organismen nicht

dokumentiert. Eine ungenügende Kompatibilität der verwendeten externen Hochleistungsstäme mit der autochtonen Flora ist jedoch nicht auszuschließen.

Unter gewissen Bedingungen, und zwar mindestens dann, wenn für ein bestimmtes Substrat nur eine begrenzte Anzahl verschiedenartiger Mikroorganismen zur Verfügung steht, kann die Wahl des Trägers wesentlich in die Zusammensetzung der mikrobiellen Population eingreifen. So wurde bei unseren Untersuchungen zum Abbau von methylierten Phenolen ein Stamm isoliert, der statt der üblichen meta-Spaltung von 3,4-Dimethylphenol lediglich eine Oxidation der p-ständigen Methylgruppe realisiert. Die nachfolgende Mineralisierung wurde kooperativ durch weitere Organismen realisiert [6. 12]. Dieses Bakterium (*Acinetobacter spec. PheA1*) war offensichtlich recht verbreitet und in ganz unterschiedlichen Quellen vorhanden, wurde selektiv aber nur auf dem stark anionischen Trägermaterial KS10 angereichert. Die Etablierung von PheA1 in der Biofilmpopulation des Trägers KS10 gelang unabhängig aus zwei verschiedenen Belebtschlümmen und einer Bodensuspension und führte übereinstimmend zum Auftreten der gleichen p-Oxidationsprodukte im Ablauf der verwendeten Versuchsanlagen (Abbildung 6.4). Wurden hingegen andere Trägermaterialien mit weniger negativen Oberflächenpotentialen verwendet, so dominierten jene Organismen, die den Abbau durch die übliche meta-Spaltung realisierten [6. 18].

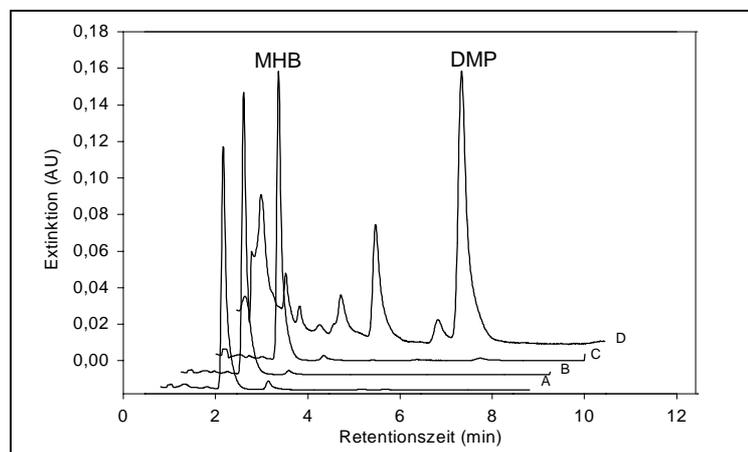


Abbildung 6.4: HPLC-Chromatogramm von Substraten und Zwischenprodukten aus dem Abbau von 3,4-Dimethylphenol [6. 12]. A: Träger KS10 beimpft mit Organismen aus dem Belebtschlamm 1, B: Träger KS10 beimpft mit Organismen aus dem Belebtschlamm 2, C: Träger KS10 beimpft mit einer Bodensuspension. D: Belebtschlammreaktor beimpft mit Belebtschlamm1. DMP: 3,4-Dimethylphenol
MHB: 2-Methyl-4-Hydroxybenzoesäure

Die festgestellten Präferenzen der untersuchten Organismen für bestimmte Trägerstrukturen stimmt gut mit den ermittelten Oberflächenladungseigenschaften der isolierten Stämme überein. *Acinetobacter spec.* PheA1 besitzt auf seiner Oberfläche ein relativ ausgeglichenes Verhältnis von Amino- und Carboxylgruppen (Abbildung 6.5), wodurch die Nettooberflächenladung gering wird (Abbildung 6.6).

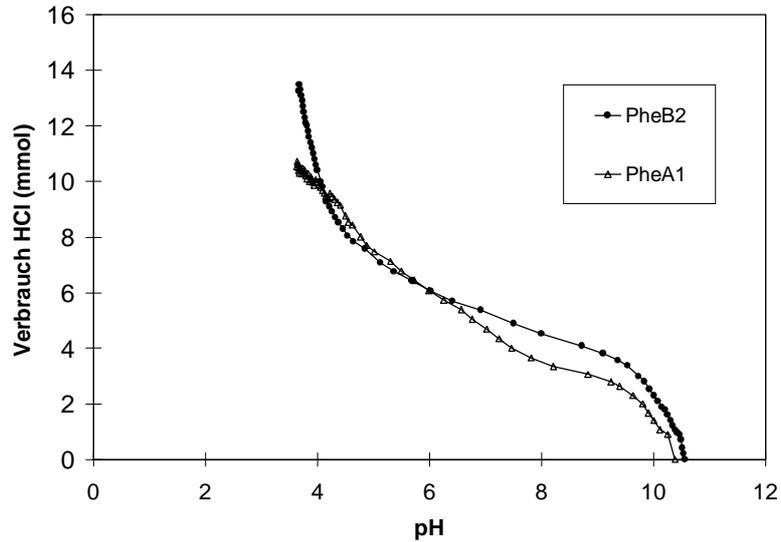


Abbildung 6.5: Mikrotitrationskurven der Stämme PheA1, isoliert aus einem Biofilm von Träger KS10 und PheB2 aus einem Belebtschlammssystem.

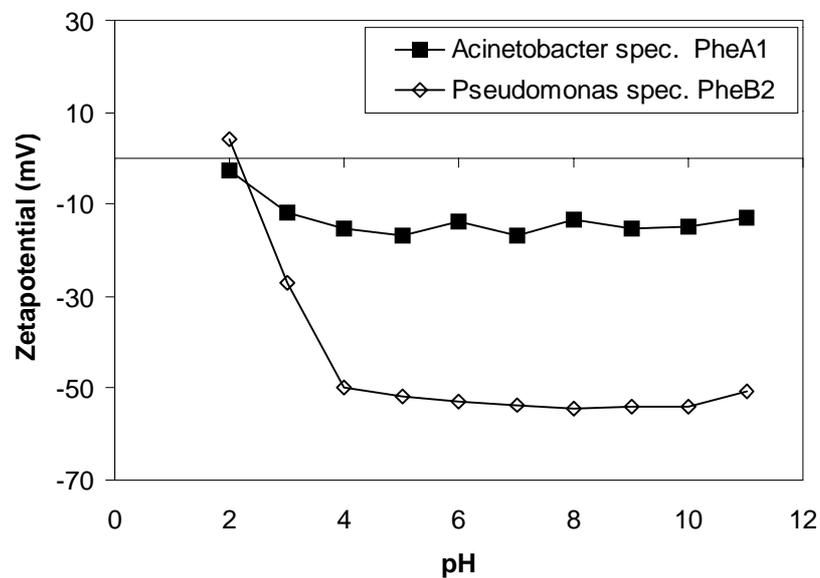


Abbildung 6.6: Zetapotentialkurven ausgewählter Repräsentanten von zwei Reaktoren für den Abbau von 3,4,-Dimethylphenol. (PheA1: Biofilmreaktor mit Träger KS 10; PheB2: trägerfreie Intensivbiologie)[6. 12]

Diese Oberflächenstruktur von PheA1 entspricht damit weitgehend der in 5.1.2.1.1 beschriebenen von *Bacillus niacini* W0 (vgl. Abbildung 5.17). In guter Übereinstimmung mit dem für diesen Strukturtyp der Zelloberfläche zu erwartenden Adsorptionsverhalten (vgl. Abschn. 5.1.2.1.1 und Abbildung 5.17) zeigte *Acinetobacter spec.* PheA1 unter physiologischen pH-Bedingungen eine besonders gute Anlagerung an negativ geladenen Trägeroberflächen (vgl. Tab. 5.6). Da die isolierten meta-spaltenden Bakterien durch starke negative Oberflächenladungen geprägt waren, wurden diese Organismen auf den stark sauren Trägern gegenüber PheA1 offensichtlich weitestgehend diskriminiert (Abbildung 6.6). Es kann davon ausgegangen werden, daß *Acinetobacter spec.* PheA1 in seiner Ursprungspopulationen keine dimethylierten Phenole verwertet. Er fand aber unter den Bedingungen eines anionischen Trägers und des einzigen Substrates 3,4-Dimethylphenol eine geeignete ökologische Nische.

Ähnliche selektive Wirkungen von Trägermaterialien beschreiben auch Zellner et al. [6. 21]. Untersuchungen der Zusammensetzung von mikrobiellen Populationen in einem Biofilm und den freien Flocken im gleichen System ergaben erhebliche Unterschiede zwischen beiden Populationen.

Die Nutzung von verschiedenartigen elektrostatischen Eigenschaften der Bakterien für die Optimierung von biologischen Systemen ist aufgrund der teilweise sehr deutlichen Unterschiede zwischen verschiedenen Organismen und der guten Meßbarkeit der Oberflächeneigenschaften recht einfach. Jaspers und Overmann [6. 8] verwenden diese Variabilität der Ladungseigenschaften darüber hinaus auch für die Isolierung einzelner Gruppen von Bakterien, indem sie die Unterschiede des isoelektrischen Punktes für eine Vorselektion der unterschiedlichen Ladungstypen ausnutzen. Aber auch andere Oberflächeneigenschaften können als Selektionsfaktor von Bedeutung sein. So zeigten Busscher und van der Mei [6. 3] durch in vivo Experimente, daß hydrophobe Oberflächen im Vergleich zu nativem Zahnmaterial eine deutlich verminderte Besiedlung mit Plaquebakterien aufweisen. In ähnlicher Weise können auch die polaren Eigenschaften der Trägermaterialien variiert werden. Die wohl interessanteste Methode für die Beeinflussung mikrobieller Populationen ist die Verwendung konkurrierender Bakterienarten. Inzwischen konnte für mehrere Arten gezeigt werden, daß einzelne Organismengruppen durch die Synthese extracellulärer Verbindungen die Ansiedlung potentieller Konkurrenten behindern können [6. 2, 6. 5]. Die Möglichkeit, Karies verursachende Streptokokken durch konkurrierende Bakterien, die nicht zur Säurebildung befähigt sind zu unterdrücken, wird in den USA gegenwärtig in klinischen Studien getestet.

Neben der Möglichkeit, Einfluß zu nehmen auf die Zusammensetzung mikrobieller Populationen, kann mit Hilfe der Trägerstruktur auch direkt in Abbauprozesse eingegriffen und damit die Leistungsfähigkeit von Biofilmsystemen weiter gesteigert werden.

Allgemein bekannt ist die Fähigkeit vieler Materialien, Inhaltsstoffe des umgebenden Mediums adsorptiv zu binden [6. 4, 6. 9, 6. 10]. Dieser Eigenschaft wird eine wesentliche Beteiligung bei der Erzielung einer hohen Prozeßstabilität z.B. bei starken Konzentrationsänderungen oder pH-Verschiebungen zugeschrieben [6. 9].

Der Abbau polymerer Verbindungen wird häufig durch eine Spaltung in kleinere Zwischenprodukte mittels extrazellulärer Enzyme eingeleitet. Durch die selektive Bindung der Polymeren an die Oberfläche der Trägermatrix kann dieser initiale Angriff gefördert oder auch verlangsamt werden. Ein Beispiel dafür ist die von uns untersuchte Spaltung von Huminstoffen unter der Wirkung von Peroxidasen, die in Abschn. 7.2. dargestellt wird. In einigen Fällen können gute Adsorptionseigenschaften des Trägers für bestimmte Substanzen aber auch zu negativen Effekten führen, und zwar beispielsweise dann, wenn ungewollt toxische Verbindungen zu unphysiologisch hohen Konzentrationen angereichert werden [6. 10]. Deshalb ist eine gezielte Auswahl geeigneter Trägermaterialien nicht nur hinsichtlich der Adsorptionseigenschaften für die vorhandenen Substrate, sondern auch für Zwischenprodukte und andere Inhaltsstoffe des umgebenden Medium erforderlich. Ein repräsentatives Beispiel für eine kombinierte adsorptive und biologische Behandlung wird in Abschn. 7.1.3 beschrieben.

Durch ihre adsorptiven Eigenschaften nehmen Biofilmträger passiv am biologischen Abbauprozess teil. Jedoch können auch Trägermaterialien verwendet werden, die aktiv in den Prozeßablauf eingreifen. Durch den Einsatz von Materialien mit katalytischen Eigenschaften können die biologischen Abbaumechanismen gezielt z.B. mit chemischen Verfahren gekoppelt werden. Dabei können u.a. Aktivkohlen oder metalldotierte Zeolite (Fe^{2+} - oder Mn^{2+} - haltige Träger) verwendet werden. Diese Katalysatoren können entweder direkt am Abbauprozess teilnehmen (vgl. Abschn. 7.3.2.) oder sie wirken indirekt z.B. durch die Aktivierung von Oxidationsmitteln [6. 11].

7. Leistungen trägerfixierter Organismen bei der Eliminierung ausgewählter Umweltschadstoffe

7.1. Abbau extremer Konzentrationen organischer Schadstoffe aus wäßrigen Medien.

7.1.1. Problemstellung – Besondere Anforderungen an die Abbauleistung

In verschiedenen Abwässern, vor allem solchen industriellen Ursprungs, werden häufig sehr hohe Konzentrationen organischer Inhaltsstoffe angetroffen. Kann in kommunalen Abwässern von einer durchschnittlichen organischen Belastung zwischen 200 mg/l und 500 mg/l CSB ausgegangen werden, so sind in industriellen Abwässern oder auch bei der Sanierung von Altlasten 10 000 mg/l CSB oder auch mehr keine Seltenheit. Viele der dabei anfallenden Substanzen sind Xenobiotika, d.h. sie kommen in dieser Form in der natürlichen Umwelt nicht vor. Entsprechend erweisen sich diese Verbindungen in konventionellen Behandlungsanlagen häufig als relativ persistent oder sie besitzen zusätzlich toxische Eigenschaften. Für solche Substanzen wird allgemein von einem erhöhten Gefährdungspotential für den der Abwasserbehandlung nachfolgenden Vorfluter ausgegangen und es werden entsprechend hohe Anforderungen an den Grad ihrer Eliminierung gestellt. Werden für den Abbaugrad von Abwasserinhaltsstoffen gewöhnlich 80 oder 90 % angestrebt, so können für die als umweltgefährdend eingestuft Komponenten wesentlich geringere Grenzwerte vorgeschrieben werden, die teilweise im Bereich weniger mg/l liegen [7. 2]. Dies bedeutet jedoch, daß bei hohen Zulaufkonzentrationen dieser Stoffe im Einzelfall ständig Abbaugrade von weit über 90 %, teils sogar über 99 % erforderlich sind. Hinzu kommt, daß die Einhaltung der relativ niedrigen Grenzwerte in konventionellen Anlagen, die meist als ideal durchmischte Rührkessel betrieben werden, sehr geringe Gleichgewichtskonzentrationen nach sich zieht. Nach den Gesetzen der Reaktionskinetik sind jedoch unter solchen Bedingungen eines substratlimitierten Abbaus nur geringe Reaktionsgeschwindigkeiten zu erreichen, was wiederum geringe Schlammbelastungen und große Reaktionsräume erforderlich macht.

Bei einigen Verbindungen verlangt auch die Toxizität der Substanzen selbst, daß die Gleichgewichtskonzentration während der Behandlung bestimmte, teils sehr niedrige Schwellenwerte nicht überschreiten darf. Dies gilt vor allem dann, wenn neben dem Abbau organischer Kohlenstoffverbindungen auch eine simultane Stickstoffelimination mittels Nitrifikation und Denitrifikation angestrebt wird. Insbesondere die nur langsam wachsenden Nitrifikanten sind gegenüber vielen toxischen Verbindungen außerordentlich empfindlich. So wurde der Schwellenwert für eine 75%ige Nitrifikationshemmung in einer von uns durchgeführten Studie [7.51] für Phenol mit 5 mg/l ermittelt. Bei Anilin- oder Pyrimidinderivaten lagen diese Schwellenwerte noch niedriger (Tabelle 7.1). Dies

bedeutet, daß bei gleichzeitiger Nitrifikation bei Überschreitung dieser Schwellenwerte mit erheblichen und nachhaltigen Störungen der Abbauleistung der Anlagen gerechnet werden muß. Die Schwellenwerte für eine nachhaltige Schädigung heterotropher Organismen liegen meist etwas höher als die für die autotrophen Nitrifikanten.

Tabelle 7.1: 75 % Hemmschwelle ausgewählter Verbindungen für die autotrophe Nitrifikation [7. 51]

Verbindung	Schwellenwert für 75%ige Hemmung der Nitrifikation (mg/l)
Anilin	5
Nitrobenzol	5
o-Nitrophenol	15
m-Nitrophenol	1
p-Nitrophenol	50
Fluoranilin	5
2-Ethylanilin	5
o-Nitroanilin, m-Nitroanilin, p-Nitroanilin	50
Dinitroanilin	50
N-Ethylanilin	20
N,N-Diethylanilin	50
Toluidin	5
o-Ethyltoluidin	5
2,4-Toluylendiamin	5
Pyridin	2
m-Phenylendiamin, p-Phenylendiamin	5
Phenol	5

Für solche Abwasserströme mit hohen Frachten und streng begrenzten Gleichgewichts- bzw. Ablaufkonzentrationen können Biofilntechnologien zu einer deutlichen Steigerung der Abbauleistungen und erheblichen Einsparungen an Reaktorvolumen beitragen. Zahlreiche Anlagen im Labor- und technischen Maßstab haben gezeigt, daß mit oberflächenimmobilisierten Organismen ein Vielfaches der Abbauleistungen konventioneller Belebungsanlagen erzielt werden kann [7. 5,7. 19, 7. 72, 7. 78]. Für diese Leistungssteigerungen gegenüber Systemen mit suspendierter Biomasse kommen mehrere Mechanismen in Betracht. Zunächst wird von vielen Autoren vor allem eine Erhöhung der Biomassekonzentration durch die Verwendung von Trägern mit

makroporösen Eigenschaften diskutiert, weil durch solche Materialien die besiedelbare Oberfläche erheblich vergrößert wird [7. 9, 7. 24, 7. 37]. Die sowohl in unseren Untersuchungen ermittelten Biomassekonzentrationen (vgl. Abschn. 7.1.2 bzw. 7.1.3), wie auch viele in anderen Arbeiten angegebene Werte [7. 19, 7. 39, 7. 78] von ca. 3 bis 6 g/l liegen jedoch nur unwesentlich höher als diejenigen, welche in Reaktoren mit suspendierter Biomasse verwendet werden. Durch den Einsatz dichter Packungen in Festbettreaktoren und hohe Biofilmdicken sind zwar auch höhere Biomassekonzentrationen erreichbar. Diese werden aber vor allem im kommunalen Bereich eingesetzt und korrelieren nur begrenzt mit den erwarteten höheren Abbauleistungen [7. 39]. Von größerer Bedeutung dürfte sein, daß durch die vergrößerte Trägeroberfläche auch eine Vergrößerung der aktiven Grenzfläche zwischen den Mikroorganismen und dem umgebenden Medium ermöglicht wird [7. 29]. Dadurch kann z.B. in Festbettreaktoren der Stoffaustausch wesentlich gesteigert werden. Bei der Verwendung von Wirbelschichtsystemen steht dieser theoretischen Annahme allerdings die Tatsache entgegen, daß sowohl in unseren Untersuchungen, wie auch in denen anderer Autoren gerade bei hohen Substratkonzentrationen überwiegend stark abgerundete Biofilmpartikel beobachtet wurden [7. 24, 7. 78], in denen das Trägermaterial weitgehend von der Biofilmmatrix eingeschlossen wird. Bei solchen Biofilmpartikeln spielt die vergrößerte Oberfläche der Trägermaterialien für den Stoffaustausch an der Grenzfläche zwischen Biofilm und Medium eine nur untergeordnete Rolle. Inwieweit die Trägermaterialien durch ihre Oberflächenstruktur indirekt Einfluß auf die dreidimensionale Struktur des Biofilmes und damit auf die Effektivität von Stoffaustauschprozessen nehmen, kann zum gegenwärtigen Zeitpunkt nicht abschließend beantwortet werden (vgl. Abschn. 5.2.1).

Für viele der Verbindungen, die in industriellen Abwässern oder auch in Altlasten in hohen Konzentrationen anfallen, ist inzwischen bekannt, daß sie zwar von entsprechenden Spezialisten teilweise sehr gut biologisch abgebaut werden, andererseits jedoch für die Mehrzahl der Organismen eine vergleichsweise hohe Persistenz oder Toxizität besitzen. Der Abbau solcher Verbindungen wird wesentlich durch den Anteil an geeigneten Spezialisten in der mikrobiellen Population bestimmt. Für die Etablierung solcher Spezialisten sind Biofilme auf makroporösen Trägern besonders geeignet. Die entsprechenden Organismen, die meist nur geringe Wachstumsraten aufweisen, können in geschützten Bereichen der Trägeroberfläche, sowie im Innern von Makroporen Bedingungen vorfinden, die ein Wachstum relativ unabhängig von äußerem Scherstreß ermöglichen und damit den Austrag dieser Spezialisten stark vermindern [7. 36].

Einige stark persistente Verbindungen werden erst von Konsortien unterschiedlicher Organismen vollständig mineralisiert. Die Ausbildung solcher Konsortien wird durch die ausgeprägte und relativ stabile Struktur des Biofilmes in besonderer Weise begünstigt (vgl. Abschn. 7.3).

Immer wieder beschrieben wird eine erhöhte Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen in Biofilmen, verglichen mit denen in freier Suspension unter gleichen Bedingungen [7. 5, 7. 62]. Diese erhöhten Umsatzraten auch bei sehr geringen Konzentrationen in der flüssigen Phase sind die Voraussetzung dafür, daß toxische Schadstoffe unter Einhaltung geringer Gleichgewichtskonzentrationen mit hoher Effizienz abgebaut werden. Als Ursache für diese erhöhte Aktivität kommt vor allem eine Anreicherung der abzubauenen Schadstoffe in der Grenzschicht zwischen Medium und Biofilmpartikel oder in der Biofilmmatrix in Betracht. Die Bedeutung der adsorptiven Eigenschaften des Trägers bei diesem Akkumulationsprozeß wird von verschiedenen Autoren unterschiedlich diskutiert [7. 37, 7. 63] und muß wahrscheinlich für jeden Fall neu bewertet werden (vgl. Abschn. 7.1.2 und 7.1.3).

Der Wechselwirkung von Adsorption und biologischem Abbau kommt mit hoher Wahrscheinlichkeit eine Schlüsselrolle für die häufig beschriebene erhöhte Prozeßstabilität von Biofilmsystemen gegenüber Anlagen mit frei suspendierter Biomasse zu [7. 16]. Durch die gegenüber den Abbauprozessen relativ schnell ablaufende Adsorption können in Phasen erhöhter Substanzkonzentration (Stoßbelastung) größere Mengen der Wasserinhaltsstoffe zunächst adsorptiv gebunden werden. In gleicher Weise erfolgt bei Verringerung der verfügbaren Substratmenge eine Abgabe von adsorptiv gebundenen Verbindungen. Dadurch werden einerseits Schädigungen der Biomasse durch toxische Konzentrationen vermieden, andererseits werden die Phasen eingeschränkter physiologischer Leistungsfähigkeit infolge Substratmangels verringert bzw. verkürzt. Neben dem Biofilm selbst mit seinen Adsorptionseigenschaften und seinen Bereichen eingeschränkter Diffusion kann bei diesem als Bioregeneration bezeichneten Prozeß auch der Träger eine wichtige Rolle spielen. Vor allem Materialien mit hohen Adsorptionskapazitäten für die zu eliminierenden Verbindungen stellen ein bedeutendes Pufferreservoir dar [7. 70] (vgl. auch Abschn. 7.1.1).

Biofilme auf adsorptionsfähigen Trägern, bei denen die einzelnen Verbindungen letztendlich vollständig abgebaut werden, stellen ein sich selbst regenerierendes System dar. Die Substanzelelimination erfolgt also ohne Verbrauch des Trägermaterials. Gerade bei der Altlastensanierung werden aber auch Wässer gefunden, die neben abbaubaren Verbindungen auch solche enthalten, die dem biologischen Abbau nicht, oder nicht in den erforderlichen Zeiträumen zugänglich sind. Diese Verbindungen können gleichfalls an den Biofilmpartikeln gebunden werden und sich dort akkumulieren. Die Eliminierung der

Wasserinhaltsstoffe erfolgt dann als echte Kombination von biologischer und adsorptiver Elimination und wird von einigen Autoren als integrierte biologisch-adsorptive Behandlung bezeichnet [7. 63]. Ein Teil der bewachsenen Biofilmpartikel muß dabei in regelmäßigen Abständen ersetzt werden. Wegen der vergleichsweise einfachen verfahrenstechnischen Gestaltung werden für diese Prozeßführung häufig klassische Belebtschlammanlagen verwendet, denen pulverförmige Trägermaterialien zudosiert werden (z.B. PAC-Verfahren unter Verwendung von pulverförmiger Aktivkohle). Bei diesem Verfahren ist eine besondere Betrachtung der adsorptiven Eigenschaften der verwendeten Träger erforderlich. Dies gilt insbesondere dann, wenn die durch adsorptive Prozesse zu eliminierenden Substanzen nicht nur eine hohe Persistenz, sondern zusätzlich bakterientoxische Eigenschaften besitzen (vgl. Abschn. 7.1.3).

7.1.2 Abbau phenolischer Verbindungen durch immobilisierte Organismen im Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor

Der Abbau von Phenol und seinen Derivaten ist seit den siebziger Jahren von zahlreichen Wissenschaftlern intensiv untersucht worden. Die meisten der vorkommenden Verbindungen sind prinzipiell biologisch abbaubar [7. 64]. Die Abbauewege sind weitgehend bekannt. Als besonders persistent erwiesen sich u.a. mehrfach nitrierte und auch mehrfach chlorierte Phenole. Trotz der guten biologischen Abbaubarkeit vieler Phenolderivate zeichnen sich eine Reihe von ihnen durch z.T. erhebliche bakterientoxische Eigenschaften aus. So werden u.a. Kresole und Chlorkresole auch als Desinfektionsmittel eingesetzt.

Phenole werden insbesondere im mitteldeutschen Raum, aber auch in Süddeutschland seit mehr als 100 Jahren in großen Tonnagen produziert. Sie fallen gleichfalls als Nebenprodukte vor allem bei der Kohleveredelung an. Entsprechend finden sich diese Verbindungen in hohen Konzentrationen im Boden und letztendlich im Grundwasser wieder. Während des langen Aufenthaltes waren die versickerten Produkte dabei teils erheblichen Veränderungen unterworfen. Deshalb werden heute neben Phenol und einfachen Phenolderivaten auch verschiedene Oxidations- und Polymerisationsprodukte angetroffen, deren Abbaubarkeit deutlich schlechter ist, als die der ursprünglichen Produkte. Derartig zusammengesetzte Substrate stellen eine Herausforderung für jedes biotechnologische Verfahren dar. Biofilmtechnologien besitzen jedoch gute Voraussetzungen für die erfolgreiche Behandlung solcher Substanzgemische.

Das in unseren Versuchen eingesetzte Substrat fiel als Grundwasser im Raum Halle an. Die grundlegende Zusammensetzung dieses Grundwassers ist aus Tabelle 7.2 zu ersehen.

Tabelle 7.2: Zusammensetzung des verwendeten Grundwassers [7. 40]

Parameter	Konzentration
CSB	13 700 mg/l
darunter:	
aliphatische Kohlenwasserstoffe (C9 bis C14 Parafine)	40 %
Phenol	20 %
Ein- und mehrkernige alkylsubstituierte Aromaten	25 %
Phenolindex (als Phenolequivalente)	3050 mg/l
BSB₅	7 400 mg/l
TOC	10 760 mg/l
Toxizität (Lumistox)	G _L 360
Ammonium	46 mg/l
Phosphat	12 mg/l

Für die Untersuchungen zur biologischen Abbaubarkeit der Inhaltsstoffe dieses Grundwassers wurden 3 Wirbelschichtreaktoren mit unterschiedlichen Trägermaterialien verwendet. Der grundlegende Aufbau dieser Reaktoren ist in Abbildung 6.12 dargestellt. Als Träger wurden 2 Materialien auf Kohlebasis (WGA: Winkler-Generator-Asche und DG 47: Aktivkohle der Fa. LURGI), sowie ein für Phenole adsorptionsfähiges Polymer (Polystyren EP63 Versuchsprodukt, vgl. Tabelle 6.1) verwendet. Die wichtigsten Eigenschaften der eingesetzten Träger sind in Tabelle 7.3 zusammengestellt.

Tabelle 7.3: Eigenschaften der verwendeten Trägermaterialien

Parameter	Träger		
	WGA	DG 47	EP 63
Körnung (mm)	0,5-1,0	0,5-1,6	0,6-0,8
Schüttdichte (kg/m³)	725	470	625
spez. Oberfläche (m²/g)	585	1000	700
Fluidisierungsgeschwindigkeit (cm/min)	21	24	15

Alle drei verwendeten Trägermaterialien besitzen aufgrund ihrer großen inneren Oberfläche gute Adsorptionseigenschaften. Ein wesentlicher Unterschied besteht jedoch

in der Oberflächenstruktur. Die Materialien auf Kohlenstoffbasis ermöglichen aufgrund ihrer multifunktionalen Oberfläche, sowie eines hohen Anteiles an Vertiefungen und Makroporen die Entstehung einer sehr vielfältigen mikrobiellen Population mit unterschiedlichen Mikrokonsortien (zur Ausbildung von Biofilmstrukturen auf Aktivkohlen vgl. auch Abschn. 7.1.3). Hingegen kann die Besiedelung des feinporigen Polymers ausschließlich auf der äußeren Oberfläche erfolgen.

Gewisse Unterschiede zwischen den hydrophoben Kohlematerialien und dem hydrophileren Polymer lassen sich aber auch hinsichtlich des Adsorptionsverhaltens erkennen. Die Adsorption der vorhandenen Wasserinhaltsstoffe an den einzelnen Trägern wurde anhand von statischen Adsorptionsversuchen ermittelt. Die Adsorptionsisothermen bei 23°C sind in Abbildung 7.1 für den Gesamt-CSB und in Abbildung 7.2 für phenolische Verbindungen (Kupplungsfähige Stoffe als Phenoläquivalente) dargestellt. Die errechneten Isothermen entsprachen in allen Fällen besser dem Freundlich-Modell als dem nach Langmuir, was auf eine Beladung in mehrmolekularen Schichten hinweist. Die entsprechenden Koeffizienten wurden nach Gleichung 7.1 berechnet und sind in Tabelle 7.4 wiedergegeben.

$$a = k \cdot c_{\text{eq}}^n \quad (\text{Gleichung 7.1})$$

a: Gleichgewichtsbeladung (mg/g Träger)

c_{eq} : Konzentration der adsorbierenden Substanz im Gleichgewicht (mg/l)

k, n : Systemkonstanten

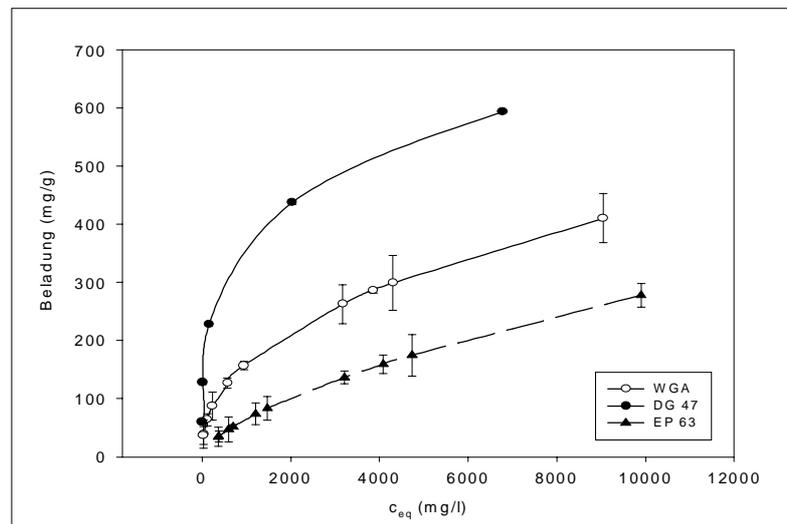


Abbildung 7.1: Adsorptionsisothermen der organischen Inhaltsstoffe des untersuchten Grundwassers bezogen auf CSB. Die Markierungen kennzeichnen die Standardabweichung der einzelnen Meßwerte.

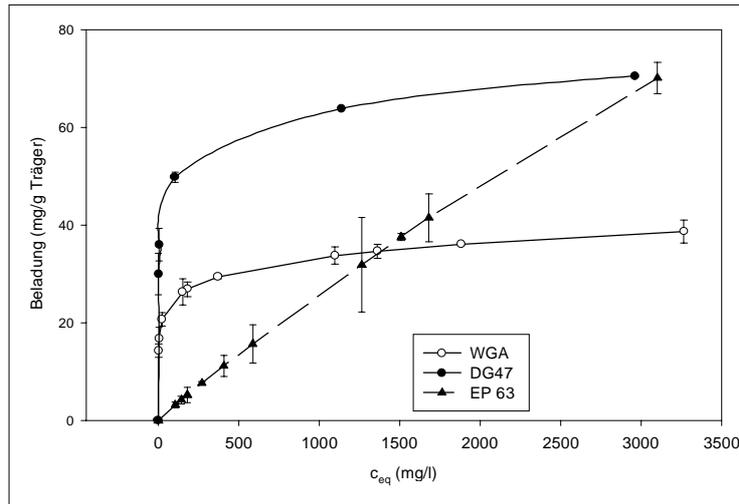


Abbildung 7.2: Adsorptionsisothermen der organischen Inhaltsstoffe des untersuchten Grundwassers bezogen auf die Summe phenolischer Verbindungen (Kupplungsfähige Stoffe als Phenoläquivalente). Die Markierungen kennzeichnen die Standardabweichung der einzelnen Meßwerte

Tabelle 7.4: Koeffizienten der Adsorptionsisothermen von CSB und Phenolen an drei unterschiedlichen Trägermaterialien nach dem Freundlich-Modell

Parameter		WGA	DG 47	EP 63
CSB	k	8,51 ± 0,32	6,35 ± 0,17	0,84 ± 0,48
	n	0,43 ± 0,04	0,25 ± 0,003	0,63 ± 0,07
Phenole	k	14,01 ± 0,97	30,73 ± 0,62	0,043 ± 0,004
	n	0,125 ± 0,01	0,104 ± 0,03	0,924 ± 0,12

Die Unterschiede hinsichtlich der Adsorption der verschiedenen Wasserinhaltsstoffe werden durch die ermittelten Adsorptionsisothermen verdeutlicht. Während sich die Differenzen bei den beiden Materialien auf Kohlebasis im wesentlichen aus den verschieden großen inneren Oberflächen erklären lassen, weicht das Adsorptionsverhalten des hydrophileren Polymers vor allem hinsichtlich der Adsorption der phenolischen Verbindungen erheblich von dem der Kohlen ab. Die Phenole wurden an den hydrophoben Kohlematerialien bereits bei geringen äußeren Gleichgewichtskonzentrationen mit hoher Effizienz gebunden. Dagegen erfolgte eine Adsorption der gleichen Verbindungen auf dem Polymer erst bei sehr hohen Konzentrationen. Die Adsorption der Phenole war damit wesentlich ineffizienter als die durchschnittliche Adsorption der Wasserinhaltsstoffe und wich gleichfalls erheblich auch vom Adsorptionsverhalten der reinen Modellverbindungen ab (vgl. Abbildung 7.3).

Das Eliminierungspotential der einzelnen Reaktoren wurde unter schrittweiser Verringerung der hydraulischen Verweilzeit und damit einer Erhöhung der jeweiligen Raumbelastung bestimmt. Die verwendeten Prozeßparameter sind in Tabelle 7.5 zusammengefaßt.

Tabelle 7.5: Prozeßparameter für den kontinuierlichen Betrieb der verwendeten Wirbelschicht-Biofilm-Reaktoren

Prozeßparameter	Vorgabe
Substrat	reales Grundwasser gem. Tabelle 7.1
Reaktorvolumen	2 l
Trägermenge	200 ml/l Reaktorvolumen
Temperatur	25 °C
pH-Wert	6,5-7,5
pO ₂	>2,0 mg/l
Hydraulische Verweilzeit	7,6 d bei t ₀ in Stufen bis 3 h
Raumbelastung CSB	0,9 kg/m ³ *d bei t ₀ bis maximal 49,7 kg/m ³ *d

Die Anfangsbelastung wurde auf 0,9 kg/m³*d eingestellt und zunächst für alle 3 Reaktoren schrittweise verdoppelt. Die Abbauleistung wurde aus den gemessenen Werten von TOC und Phenolen (als kupplungsfähige Stoffe) ermittelt. Tabelle 7.6 zeigt die entsprechenden Resultate für eine mittlere Raumbelastung von 12,8 kg CSB/m³*d.

Tabelle 7.6: Abbauleistungen für CSB und Phenole von 3 Wirbelschichtreaktoren mit unterschiedlichen Trägermaterialien. Raumbelastung: 12,8 kg CSB/m³*d

Parameter	verwendetes Trägermaterial		
	WGA	DG 47	EP 63
CSB Abbaurrate (%)	97,8	98,3	90,0
Ablaufkonzentration (mg/l)	297	227	1358
Phenole Abbaurrate (%)	99,90	99,93	97,8
Ablaufkonzentration (mg/l)	2,8	2,2	66,6
Biomassegehalt (mg BTS/g Träger) (berechnet aus DNA-Bestimmung [7. 78])	17,5	23,6	8,2

Bei dieser Belastung wurden mit allen drei Reaktoren stabile Abbauraten $\geq 90\%$ für den Gesamt-CSB und $> 97\%$ für den Anteil phenolischer Verbindungen erzielt. Allerdings waren bei näherer Betrachtung deutliche Unterschiede zwischen den Materialien auf Kohlebasis und dem eingesetzten Polymer erkennbar. Während mit den Kohlematerialien ein Rest CSB von <300 mg/l verblieb, lag dieser bei Verwendung des polymeren Trägers bei >1000 mg/l. Gleiches gilt für den Abbau der phenolischen Verbindungen, die in den Reaktoren mit Kohleträgern nahezu vollständig abgebaut wurden. Im Ablauf des Reaktors mit Polymerträger verblieb ein Rest von ca. 65 mg/l. Dies würde für eine technische Anwendung bedeuten, daß der polymere Träger trotz prinzipiell erzielbarer guter Abbauleistungen nicht geeignet wäre, um bei höheren Raumbelastungen die

üblicherweise notwendigen Ablaufwerte für umweltgefährdende Verbindungen wie Phenole (Grenzwert für Phenole meist <5 mg/l) zu erreichen. Inwieweit die Menge der verfügbaren Biomasse, die Biomassezusammensetzung oder aber die unterschiedlichen Adsorptionseigenschaften der eingesetzten Träger für das verwendete Substrat diese Unterschiede in der Abbauleistung bedingen, ist aus diesen Versuchen zunächst nicht zu ersehen, weil sich die Träger sowohl hinsichtlich des Biomassegehaltes, wie auch der Adsorptionseigenschaften unterscheiden. Auch verschiedene andere Autoren kamen mit unterschiedlichen Versuchsansätzen zu jeweils unterschiedlichen Ergebnissen. Während Li und DiGiano [7. 43] aus Batch-Versuchen eine erhebliche Bedeutung der Adsorption für Biomasseentwicklung und Abbauleistung ableiteten und Pirbazari et al. [7. 63] für kontinuierliche Abbauprobe eine Beteiligung sowohl der Aufwuchseigenschaften für die Biomasse wie auch der Adsorptionseigenschaften diskutierten, kamen Kindziersky et al. [7. 37] zu dem Schluß, daß die Adsorptionseigenschaften des Trägers für die Abbauleistung keine Bedeutung besitzt. Aus diesem Grund wurden entsprechende Experimente mit Modellträgermaterialien durchgeführt. Dafür wurden das bereits oben verwendete unmodifizierte Polystyren, sowie die anionische Modifikation KS10 und das kationische Material AD41 eingesetzt. Diese 3 Materialien unterscheiden sich einerseits hinsichtlich ihres Adsorptionsverhaltens und andererseits hinsichtlich ihrer Kompatibilität zu unterschiedlichen Organismengruppen, jedoch nicht hinsichtlich der inneren bzw. äußeren (für Mikroorganismen zugänglichen) Oberfläche. Die Adsorptionisothermen der Trägermaterialien für 2 ausgewählte Modellsubstrate (Phenol und Veratrol) sind in Abbildung 7.3 dargestellt.

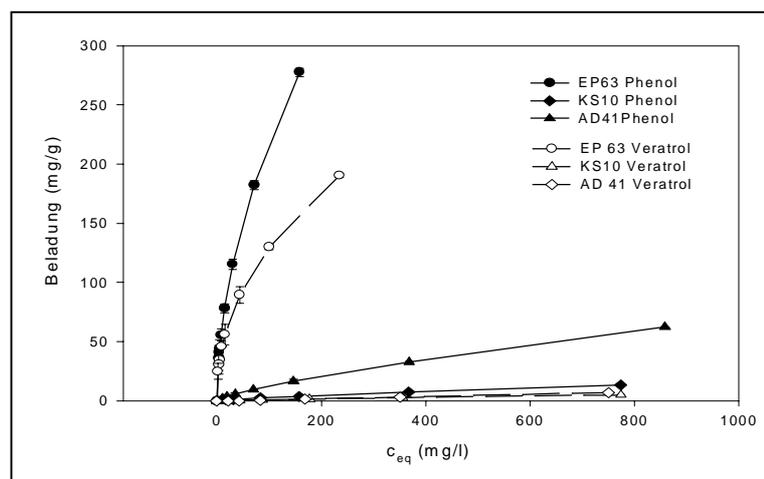


Abbildung 7.3: Adsorptionisothermen von ausgewählten Trägermaterialien für Phenol bzw. Veratrol. Die Markierungen kennzeichnen die Standardabweichung der einzelnen Meßwerte

Dabei wird deutlich, daß erwartungsgemäß lediglich daß unmodifizierte Material phenolische Verbindungen adsorbiert, während die ionischen Modifikationen mit den überwiegend durch hydrophobe Bindungen reagierenden aromatischen Modellsubstanzen kaum Wechselwirkungen eingehen.

Die Abbauleistungen der auf diesen Trägern immobilisierten Biofilmkonsortien, sowie die Menge der dabei auf dem Träger immobilisierten Biomasse sind in Abbildung 7.4 und Abbildung 7.5 dargestellt.

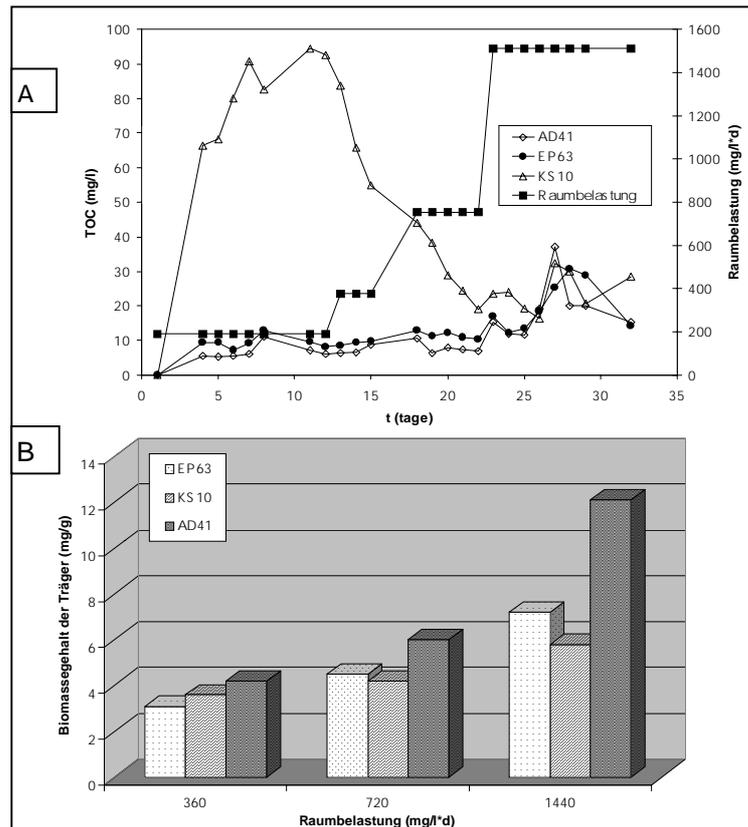


Abbildung 7.4: Abbauleistungen (A) und Biomasseentwicklung (B) von Biofilm-Wirbelschicht-Reaktoren mit unterschiedlichen Trägern. Substrat Phenol.

Die unterschiedlichen Wirkungen von Adsorptionskapazität der Träger und Biomasseentwicklung sind in den dargestellten Abbildungen deutlich zu erkennen. Wie aus den Resultaten hervorgeht, war die Abbauleistung der Reaktoren nach Erreichen der stationären Phase unabhängig vom Adsorptionsverhalten der Träger. Sowohl EP63 mit einer hohen Adsorptionskapazität, wie auch AD41 mit einer sehr geringen Adsorption der eingesetzten Substrate, zeigten vergleichbare Abbauleistungen.

Von größerer Bedeutung für die erreichbare Abbauleistung der Reaktoren war hingegen das Aufwuchsverhalten der Träger. Dabei scheinen sowohl die Menge der vorhandenen

Biomasse, wie auch die Zusammensetzung der mikrobiellen Population durch die Struktur des Trägers beeinflusst zu werden. Dies wird vor allem deutlich, wenn man die Abbauleistung am Beginn des Versuches betrachtet. Obwohl in Bezug auf die Biomasseentwicklung gerade innerhalb der ersten 10 Tage nur geringe Unterschiede zwischen den einzelnen Trägermaterialien festgestellt wurden, waren die Abbauraten in diesem Zeitraum teils erheblich verschieden. Insbesondere bei Verwendung des anionischen Trägermaterials KS10 stieg die Substratkonzentration am Ablauf auf bis zu 30 mgTOC/l an. Diese Adaptationsphase mit teils hohen Restkonzentration an organischer Substanz betrug selbst für ein vergleichsweise leicht abbaubares Substrat wie Phenol mehr als 10 Tage. Im Gegensatz dazu wurde Phenol bei Verwendung eines ungeladenen oder positiv geladenen Trägermaterials von Beginn an vollständig mineralisiert.

Etwas länger waren die jeweiligen Adaptationszeiten für das schlechter abbaubare Substrat Veratrol (Abbildung 7.5).

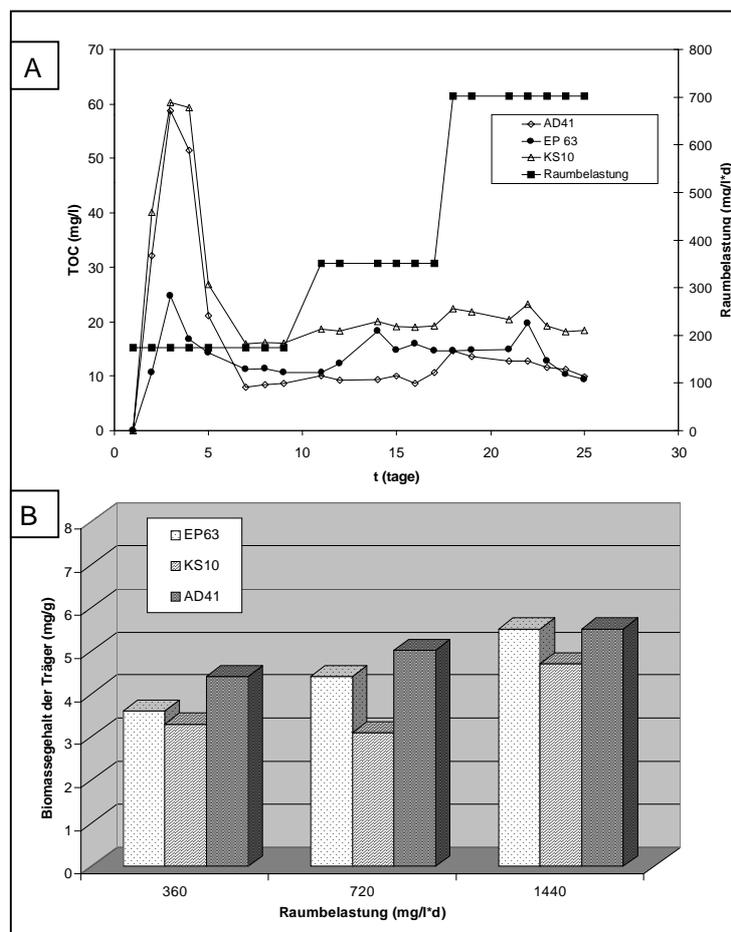


Abbildung 7.5: Abbauleistungen (A) und Biomasseentwicklung (B) von Biofilm-Wirbelschicht-Reaktoren mit unterschiedlichen Trägern. Substrat Veratrol.

Hier wurde ein vollständiger Abbau erst nach ca. 7 Tagen erreicht. Für derartige schlecht verwertbare Substrate gewinnt jedoch deutlich erkennbar die Adsorptionswirkung der Träger an Bedeutung. Während der kationische Träger AD41 die schnellste Biomasseentwicklung aufwies, wurde im Ablauf des Reaktors am Beginn des Betriebes dennoch ein deutlicher Anstieg der Substratkonzentration festgestellt, die mit der bei Verwendung des gleichfalls nicht adsorptionsfähigen Materials KS10 vergleichbar war. Mit dem adsorptionsfähigen Material EP63 trat hingegen nur eine leichte Erhöhung der Ablaufkonzentration ein. Ähnliche Resultate wurden auch erzielt, wenn nach Einstellung des Gleichgewichtes schnelle Konzentrationsänderungen (Stoßbelastungen) von bis zu 300 % der Substratkonzentration im Gleichgewicht simuliert wurden. Unmittelbar nach der Erhöhung der Substratkonzentration wurden die eliminierten Verbindungen als immobilisierte Aromaten auf dem Träger wiedergefunden. Die dabei gemessenen Konzentrationen von adsorptiv an den Trägermaterialien gebundenen Substraten sind in Tabelle 7.7 wiedergegeben.

Tabelle 7.7: Akkumulation von ausgewählten Substraten 5 h nach einer Erhöhung der Substratkonzentration um 300 % (Zulaufkonzentration im Gleichgewicht 1 g/l, erhöht für 5 h auf 3 g/l)

Substrat Träger	Phenol (mg/g Träger)	Veratrol (mg/g Träger)
EP 63	2,8	5,1
KS10	<0,1	<0,1
AD 41	0,3	<0,1

Die Leistungsfähigkeit der Biofilntechnologie bei der Mineralisierung hoher Substratkonzentrationen wurde für das oben beschriebene Grundwasser und für den Träger WGA weiter charakterisiert. Dazu wurde die Raumbelastung des Systems schrittweise bis an seine Leistungsgrenze heran gesteigert (Abbildung 7.6). Diese wurde zunächst bei etwa 50 kg CSB/m³*d (darunter ca. 15 kg Phenole/m³*d) erreicht. Als limitierend erwies sich jedoch nicht die Abbauleistung, sondern das verwendete Sauerstoffeintragungssystem über poröse Keramikfritten, so daß der Sauerstoffgehalt am Kopf des Reaktors bis auf nahe 0 zurückging. Durch eine spätere Änderung im Bereich der Sauerstoffversorgung konnte der Reaktor auch bei dieser Raumbelastung stabil betrieben werden.

Wie Abbildung 7.6 verdeutlicht, wurden bei Verwendung des oben beschriebenen Grundwassers als Substrat, bis zu einer Raumbelastung von 25 kg/m³ *d sehr konstante Abbauleistungen von > 98 % bei hoher Prozeßstabilität erzielt. Erst oberhalb dieser

Belastung traten nach Belastungserhöhung kurzzeitige stärkere Änderungen in der Ablaufkonzentration der organischen Inhaltsstoffe auf.

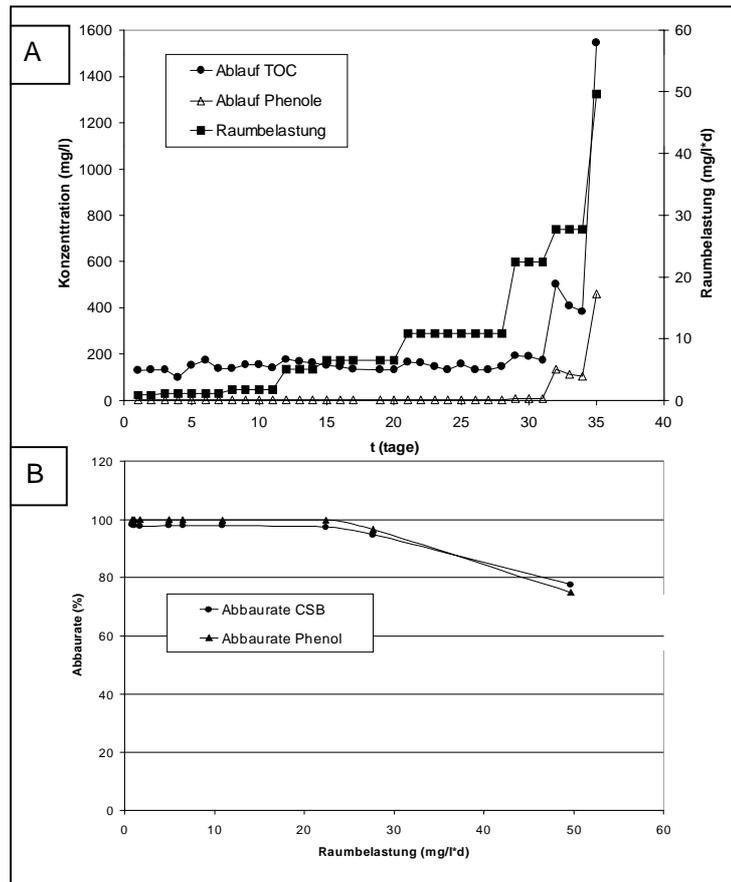


Abbildung 7.6: Abbauleistung eines Wirbelschicht-Biofilm-Reaktors mit WGA als Trägermaterial bei der Eliminierung der organischen Fracht aus einem realen Grundwasser. A: Ablaufkonzentration. B: Änderung der Abbaurrate in Abhängigkeit von der Raumbelastung

Die dargestellten Ergebnisse wurden durch Untersuchung mehrerer weiterer Substrate verdichtet [7. 76] und lassen folgende Schlüsse zu:

1. Die Eliminierung von Umweltschadstoffen aus hoch konzentrierten Wässern verlangt einen nahezu vollständigen Abbau der Abwasserinhaltsstoffe mit Abbauraten von teilweise mehr als 99 %. Damit ergibt sich als Optimierungsziel solcher Abbauprozesse eine hohe Abbauleistung (hohe Raum-Zeit-Ausbeute) bei möglichst geringer Substratkonzentration im Gleichgewicht.
2. Bei der Optimierung solcher Systeme kommt neben der Gewährleistung eines hohen Stoffüberganges, vor allem der Struktur des Trägers eine wichtige Rolle zu. Dabei liegt das Hauptaugenmerk auf Materialien, die für die erforderlichen Spezialisten geeignete Aufwuchsbedingungen bieten. Diese Bedingungen sind nicht notwendig mit den Bedingungen für eine Maximierung des Biomassegehaltes der Träger identisch.

3. Durch den Einsatz von adsorptionsfähigen Trägermaterialien wird eine deutliche Erhöhung der Prozeßstabilität vor allem in Bezug auf Stoßbelastungen erzielt. Diese Prozeßstabilität spielt eine besondere Rolle bei hohen Raumbelastungen und toxischen Substraten, weil hier die Schwelle zu schädigenden Stoffkonzentrationen besonders schnell überschritten wird.
4. Bei Verwendung optimierter Biofilmsysteme lassen sich Raumbelastungen von mehr als $50 \text{ kg/m}^3 \text{ d}$ auch für toxische Verbindungen realisieren, sofern diese Verbindungen von adaptierten Spezialisten mit genügend hoher Geschwindigkeit abgebaut werden und das System technisch beherrscht wird. Die erzielbaren Abbauleistungen sind damit wesentlich höher als in konventionellen Belebungsanlagen, die für maximal 1 bis $2 \text{ kg CSB/m}^3 \text{ d}$ ausgelegt werden.

Auch in anderen Arbeiten werden für vergleichbare Substrate nur selten Abbauleistungen von mehr als $10 \text{ kg/m}^3 \text{ d}$ angegeben [7. 19, 7. 20]. Allerdings erreichten Holladay et al. [7. 31] mit einem Wirbelschichtreaktor gleichfalls Abbauleistungen von $30 \text{ kg/m}^3 \text{ d}$.

7.1.3. Kombinierte Adsorptiv - biologische Behandlung arsenhaltiger Wässer durch Biofilme auf Pulverkohle

Viele native Wässer, sowohl Abwässer wie auch kontaminierte Grundwässer, enthalten neben hohen Konzentrationen von Verbindungen, die prinzipiell von Mikroorganismen abgebaut werden, auch unterschiedliche Anteile biologisch nicht abbaubarer Substanzen, die auf andere Weise immobilisiert und aus dem System entfernt werden müssen. Dazu gehören u.a. organische Verbindungen mit polymeren Strukturen und viele Anorganika. Unabhängig von gesetzlichen Rahmenbedingungen besteht eine Notwendigkeit zur Elimination solcher Verbindungen aus dem System vor allem dann, wenn diese zusätzlich bakterientoxische Eigenschaften aufweisen und den mikrobiellen Abbau der sonstigen organischen Fracht erheblich beeinträchtigen.

Für die Reinigung solcher Wässer kommt neben der Kombination mehrerer räumlich getrennter Verfahren (z.B. Nachreinigung durch Adsorption oder Kombination von biologischer Behandlung und chemisch oxidativen Verfahren) auch eine simultane Eliminierung der biologisch abbaubaren Verbindungen und der persistenten Inhaltsstoffe durch Biofilmtechnologien in Betracht. Dabei kann der biologische Abbau mit der adsorptiven Entfernung nicht abbaubarer Verbindungen kombiniert werden. Gleichfalls sind simultane Kombinationen z.B. mit chemisch oxidativen Prozessen möglich. Solche

System wurden bisher jedoch nur für Einzelfälle beschrieben [7. 10, 7. 45] (vgl. auch Abschn. 7.3.).

Bei einer simultanen biologisch-adsorptiven Behandlung laufen zwei Prozesse nebeneinander ab, die Adsorption und der biologische Abbau. Während im Biofilm immobilisierte Mikroorganismen die Mineralisierung der abbaubaren Inhaltsstoffe realisieren, werden nicht abbaubare Verbindungen im Biofilm oder an der Trägeroberfläche angereichert. Auf Grund der fehlenden räumlichen Trennung der ablaufenden Prozesse können sich die beteiligten Mechanismen dabei erheblich wechselseitig beeinflussen. Die Optimierung dieser Technologie verlangt entsprechend als Zielfunktion die gleichzeitige Betrachtung von Biomasseaufwuchs, Abbauleistung und Adsorption. Dabei liegt das Optimum selten im Maximum der beteiligten Einzelprozesse.

Medien, die dem beschriebenen Typus einer starken organischen Belastung bei gleichzeitigem Auftreten biologisch nicht abbaubarer toxischer Verbindungen entsprechen, werden u.a. in den Grundwässern des süddeutschen Raumes angetroffen. Das in den folgenden Versuchen eingesetzte Substrat entstammt, ähnlich wie das in Abschn. 7.1.2 beschriebene, einem Grundwasser aus einem Betrieb der Kohleverarbeitung und ist somit in vielen Parametern mit diesem vergleichbar. Aufgrund natürlich vorkommender Arsenverbindungen in den Böden des Ursprungsgebietes enthielt das hier untersuchte Wasser jedoch erhebliche Anteile stark bakterientoxischer Arsenverbindungen. Entsprechend wurde bei einer organischen Belastung von nur etwa 50 % der in Abschn. 7.1.2 beschriebenen, eine fast 10fach höhere Bakterientoxizität gemessen (Lumistox-Test: $G_L = 2100$ im Vergleich zu $G_L = 360$ in dem in Abschn. 7.1.2 beschriebenen Wasser). Zusätzlich zeigte die organische Fracht erhebliche Anteile stark polymerisierter und damit nur noch sehr schwer abbaubarer aromatischer Verbindungen. Die Zusammensetzung des verwendeten Wassers ist in Tabelle 7.8 dargestellt.

Wie die Ergebnisse aus Batch-Versuchen mit verdünntem Grundwasser zeigen (Abbildung 7.7), waren die organischen Inhaltsstoffe zu etwa 70% biologisch abbaubar. Durch den Zusatz von Pulveraktivkohle wurde der Anteil biologisch abbaubarer Verbindungen auf ca. 85 % gesteigert. Berücksichtigt man den Teil der organischen Fracht, der zusätzlich durch Adsorption aus dem Wasser eliminiert wurde, so konnte anhand der durchgeführten Batch-Versuche bei 0.1 % Aktivkohleanteil ein Eliminationsgrad von ca. 90 % und bei 0.5 % Aktivkohle von ca. 95 % erwartet werden.

Tabelle 7.8: Zusammensetzung des eingesetzten Grundwassers

Parameter	Konzentration
pH-Wert	9,5
Leitfähigkeit	613 mS/cm
TOC	2376 mg/l
CSB	5800 mg/l
NH₄⁺	61,2 mg/l
NO₃⁻	55 mg/l
PO₄³⁻	6,0 mg/l
Säurekapazität	45 mmol/l
Fluorid	13,7 mg/l
Blei	<0,02 mg/l
Cadmium	0,02 mg/l
Nickel	<0,05 mg/l
Zink	0,79 mg/l
Arsen	0,48 mg/l
Phenole: <i>kupplgsf. Stoffe</i> <i>Einzelverb.</i> (gem.EPA 8040)	411mg/l Phenol 238 mg/l, m(p)-Kresol 38,9 mg/l, o-Kresol 27,8 mg/l, 3.4-Dimethylphenol 4,5 mg/l 4-Hydroxbezoessäure 130,5 mg/l, Spuren weiterer Xylenole, Spuren versch. Chlor- und Nitrophenole
PAK (16 Komponenten nach EPA)	<0,1 mg/l je Komponente
Toxizität GL	2128

Die Optimierung des entsprechenden Prozesses erfolgte mittels kontinuierlicher Versuche im Labor- und Technikumsmaßstab. Dabei wurde eine zweistufige biologische Behandlung unter Verwendung des PAC-Verfahrens zugrunde gelegt [7. 54]. In einer zweistufigen Versuchsanlage wurde Pulverkohle semikontinuierlich dem Reaktor 1 zugesetzt und mit dem Überschussschlamm des Reaktors 2 entnommen. Bei Bedarf wurde ein Teil des Überschussschlammes zur Aufrechterhaltung eines definierten Schlammalters dem Reaktor 1 wieder zugeführt [7. 54].

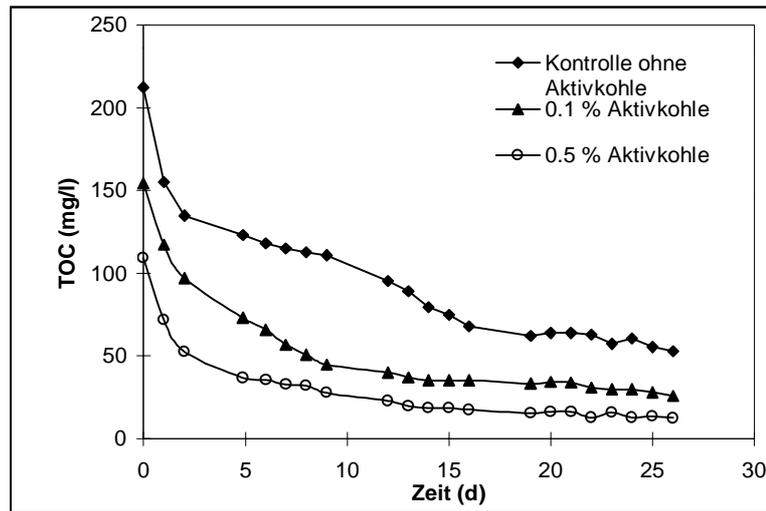


Abbildung 7.7: Einfluß von Zusätzen pulverisierter Aktivkohle auf den Abbau organischer Inhaltsstoffe eines phenol- und arsenhaltigen Grundwassers. Verwendete Aktivkohle: CHEMVIRON 313W

Für die Optimierung einer simultanen biologischen und adsorptiven Behandlung sind mehrere unterschiedliche Parameter zu berücksichtigen. Dazu gehört zunächst die Art des verwendeten Trägermaterials mit seinem Aufwuchsverhalten und seinen adsorptiven Eigenschaften zu berücksichtigen. Da der Träger auch die Funktion eines Adsorbens erfüllt, besitzt weiterhin das Verhältnis von Substrat- und Trägermenge eine wesentliche Bedeutung für die Elimination. Dieses wird einerseits durch die Trägermenge im Reaktor und andererseits durch die mittlere Verweilzeit der Biofilmpartikel bestimmt. Dabei ist zu beachten, daß durch die Variation dieser Parameter gleichzeitig Schlammalter und Biomassegehalt des Reaktors, also wesentliche Faktoren für den biologischen Abbau, beeinflußt werden.

Aufgrund der bekannten guten Kompatibilität von Aktivkohlen mit den für den Abbau von Phenolen verantwortlichen Organismen (vgl. Abschn. 7.1.2) und der Komplexität des zu behandelnden Wassers wurde als Trägermaterial Aktivkohle ausgewählt. Dabei war zu berücksichtigen, daß selbst polyfunktionale Materialien wie Aktivkohlen je nach Herkunft erhebliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung aufweisen können, wobei einzelnen Parametern für unterschiedliche Eliminationsleistungen auch ein unterschiedliches Gewicht zukommen kann.

Für den hier zu optimierenden Prozeß wurden 4 unterschiedliche Trägermaterialien mit vergleichbarer innerer Oberfläche (ca. 1000 m²/g) und einer ausgewiesenen Eignung für Wasserreinigungsprozesse untersucht:

1. SILCARBON TH 90G
2. LURGI Hydrafin SC44-1
3. NORIT RU 08
4. CHEMVIRON 313 W

Die wichtigsten Eigenschaften der verwendeten Materialien sind in Tabelle 7.9, sowie in Abbildung 7.8 bis Abbildung 7.10 zusammengestellt.

Tabelle 7.9: pH-Werte und Säurekapazitäten der verwendeten Trägermaterialien [7. 66]

	pH-Wert (10%ige Lösung)	Säurekapazität (10%ige Lösung)	Redoxkatalytische Aktivität
SILCARBON TH 90G	9,3	100 mmol/l	0,87 mmol/l*min
LURGI Hydradin SC 44-1	10,7	1100 mmol/l	10,67 mmol/l*min
NORIT RU 08	10,4	850 mmol/l	5,92 mmol/l*min
CHEMVIRON 313 W	10,8	350 mmol/l	1,83 mmol/l*min

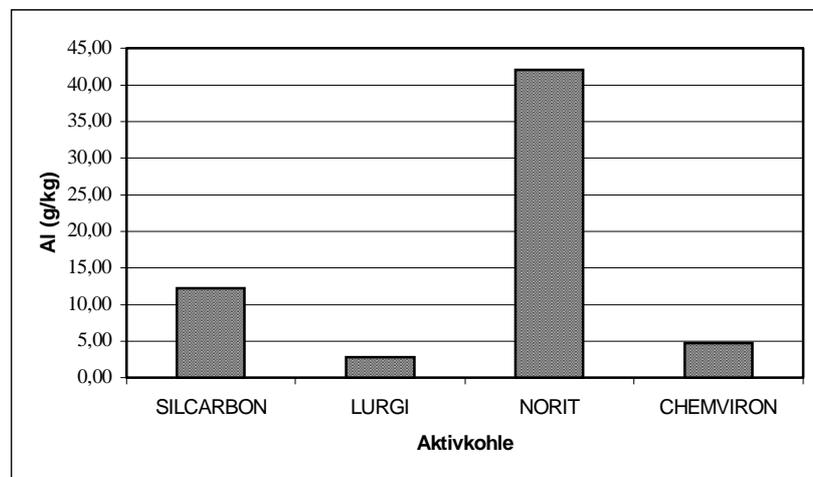


Abbildung 7.8: Aluminiumgehalte unterschiedlicher Aktivkohlen [7. 66].

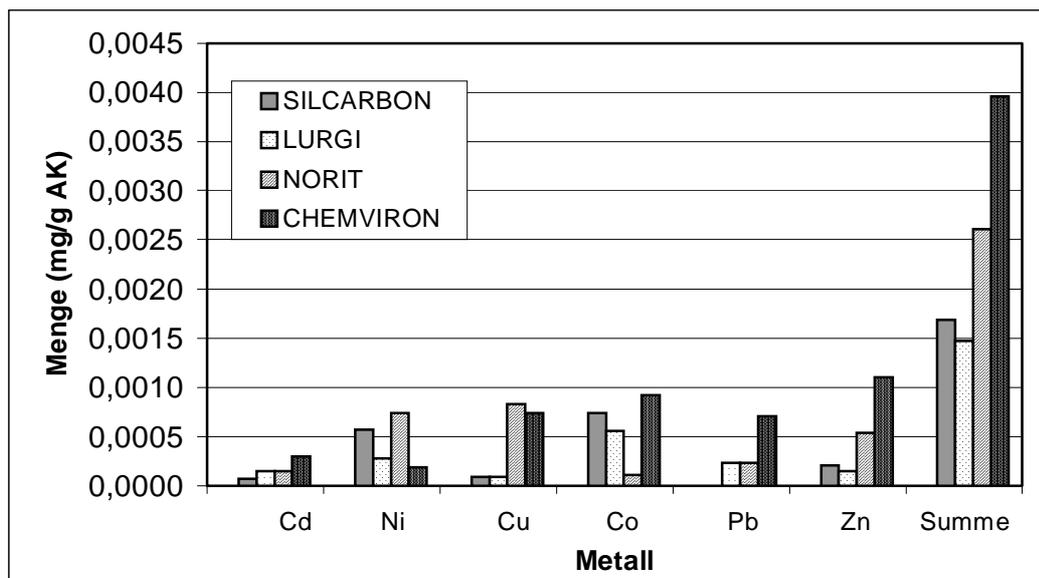


Abbildung 7.9: Gehalte unterschiedlicher Aktivkohlen an ausgewählten Schwermetallen [7. 66].

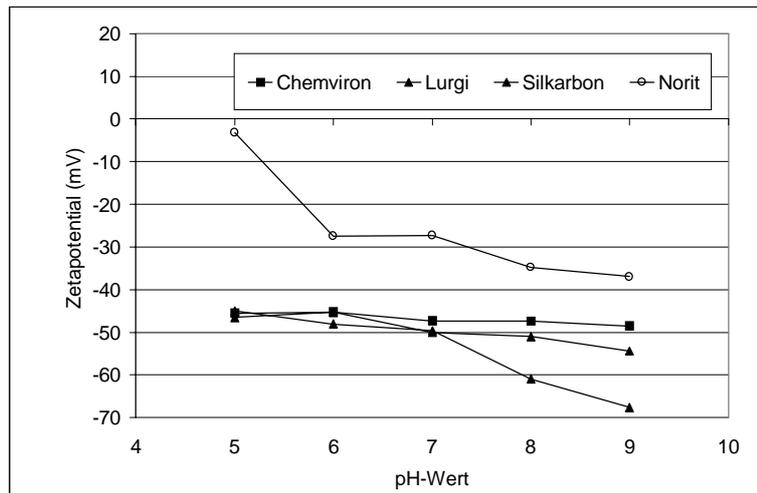


Abbildung 7.10: Zetapotentiale verschiedener Aktivkohlen im physiologischen pH-Bereich [7. 66].

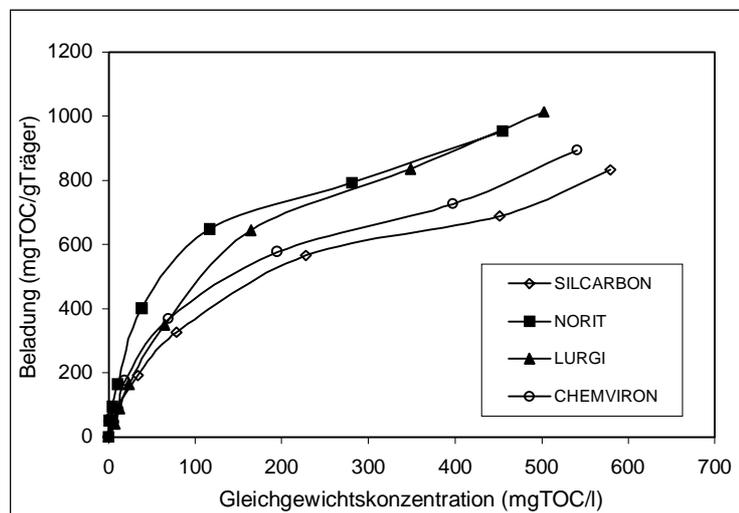


Abbildung 7.11: Adsorption der organischen Wasserinhaltsstoffe an verschiedene Aktivkohlen unter Gleichgewichtsbedingungen.

Tabelle 7.10: Adsorptionskapazitäten der verwendeten Trägermaterialien für Arsen

	Adsorptionskapazität (mg/kg)	
	unbehandelte Kohle	pH 7.0
SILCARBON TH 90G	35	<1
LURGI Hydrafin SC 44-1	25	21
NORIT RU 08	7	7
CHEMVIRON 313 W	1	<1

Die 4 ausgewählten Materialien zeigten erwartungsgemäß teilweise erhebliche Unterschiede in ihren Oberflächeneigenschaften, und wiesen unterschiedliche Gehalte

verschiedener adsorptiv gebundener Substanzen auf. Dagegen waren die Differenzen hinsichtlich des Adsorptionsverhaltens für die zu eliminierenden organischen Verbindungen vergleichsweise gering (Abbildung 7.11).

Untersuchungen zum Aufwuchsverhalten der verwendeten Materialien, sowie zum Abbau der organischen Wasserinhaltsstoffe in Batchversuchen ließen gleichfalls erhebliche Unterschiede zwischen den einzelnen Trägern erkennen. Dabei fällt auf, daß von den 4 untersuchten Trägermaterialien 3 zu vergleichbaren und zufriedenstellenden Eliminationraten führten, während mit SILCARBON TH 90G ein deutlich geringerer Abbaugrad erzielt wurde (Abbildung 7.12). Der Einfluß der Trägermaterialien auf das Abbauverhalten konnte durch Waschen der Träger oder Extraktion mit organischen Lösungsmitteln nicht signifikant beeinflusst werden [7. 66]. Dies weist darauf hin, daß die Eigenschaften der untersuchten Materialien durch die Struktur der Träger selbst und nicht durch mögliche vorhandene Kontaminationen bedingt waren.

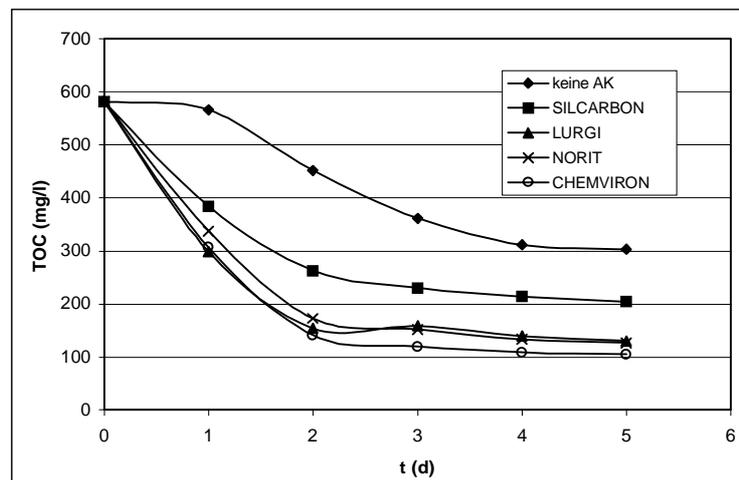


Abbildung 7.12: Einfluß verschiedener Aktivkohlen auf die Eliminierung organischer Wasserinhaltsstoffe im Batch-Versuch.

Noch deutlicher werden die Unterschiede zwischen den verwendeten Trägern, wenn die einzelnen Materialien hinsichtlich ihrer Aufwuchseigenschaften (Abbildung 7.13) und der entstehenden Biofilmstruktur (Abbildung 7.14) verglichen werden.

Die Träger NORIT und CHEMVIRON zeigten gut ausgebildete Bioflocken mit ausgeprägten Zellclustern und unter Einschluß der Kohlepartikel, wobei die Mehrzahl der im Epifluoreszenzbild sichtbaren Organismen eine intakte Zellstruktur erkennen läßt (in Abbildung 7.14 blau gefärbt). Dies spiegelt sich auch in den hohen DNA-Gehalten der Biofilmpopulation wider (Abbildung 7.13).

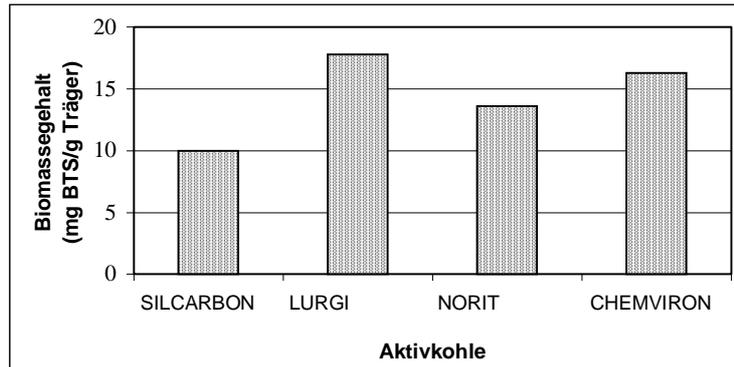


Abbildung 7.13: Biomassegehalt auf unterschiedlichen Trägermaterialien nach 5 Tagen in Batchkultur, ermittelt aus der Menge extrahierbarer DNA [7. 66, 7. 74]

Gleichzeitig macht das Epifluoreszenzbild auch deutlich, daß bei Verwendung der beiden gut biokompatiblen jedoch unterschiedlich zusammengesetzten Trägermaterialien auch die Struktur der Biofilmkonsortien Unterschiede aufweist. So zeigen die Mikrokonsortien bei Verwendung des Trägers NORIT eine deutlich kompaktere Struktur und stärker abgerundete Formen, während bei Verwendung der CHEMVIRON-Kohle eher lockere Konsortien mit länglichen Formen entstanden. Inwieweit diese sichtbaren Unterschiede auch Differenzen in der Zusammensetzung der mikrobiellen Population widerspiegeln, wird gegenwärtig geprüft.

Gut ausgebildete Bioflocken wurden auch bei Verwendung des Trägers Hydradin SC44-1 (LURGI) festgestellt, jedoch lag hier der Anteil geschädigter Zellen (im Epifluoreszenzbild grün gefärbt) deutlich höher als bei den beiden anderen Materialien. Der gemessene hohe DNA-Gehalt korreliert in diesem Fall nur wenig mit den Ergebnissen der Epifluoreszenzmikroskopie. Dies ist möglicherweise ein weiterer Hinweis auf eine, im Vergleich zu Chemvoren und Norit, höhere Dynamik von Aufwuchs und Absterbeprozessen, die zu einer Anreicherung extrazellulärer DNA in der Biofilmmatrix führt. Das Ergebnis korreliert mit der gemessenen hohen Adsorptionskapazität des Trägermaterials für Arsenverbindungen (Tabelle 7.10). Durch Akkumulation werden mit diesem Träger lokal höhere Arsenkonzentrationen erreicht, als mit den beiden oben beschriebenen Materialien. Dabei wurden offensichtlich die Toxizitätsschwellenwerte überschritten.

Sowohl im Epifluoreszenzbild, wie auch bei Verwendung der DNA-Bestimmung wurde mit dem Träger SILCARBON nur eine sehr geringe Biofilmentwicklung festgestellt, wobei ein erheblicher Teil der vorhandenen Zellen Schädigungen aufwies. Dieses Aufwuchsverhalten spiegelte sich auch in den durchgeführten kontinuierlichen Versuchen wider [7. 54, 7. 66].

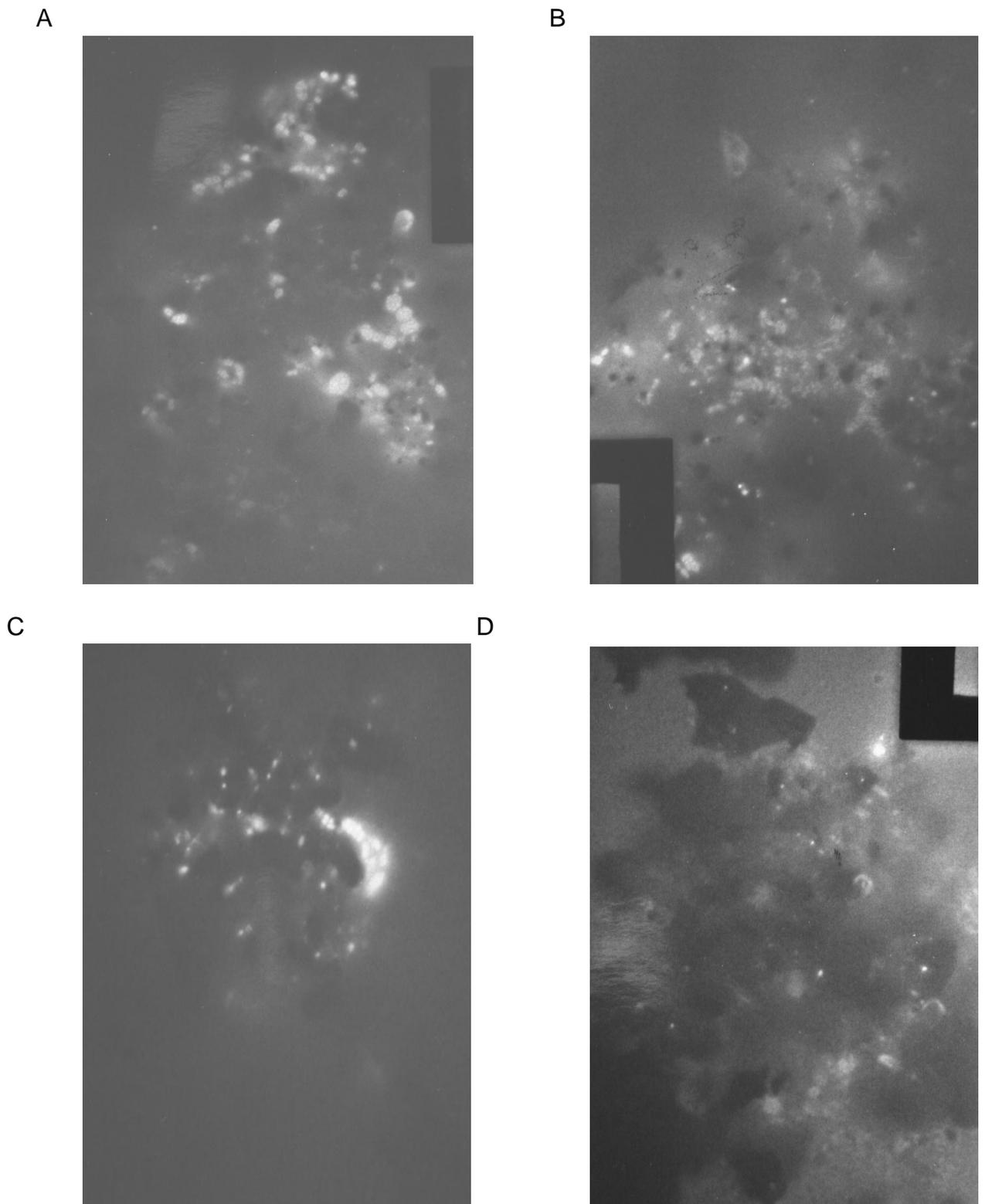


Abbildung 7.14: Epifluoreszenzbilder der bewachsenen Aktivkohlen. Färbung: DAPI (intakte Zellen - blau) / Sytox Green (Zellen mit gestörter Zellintegrität – grün)

- A: Norit
- B: Chemviron
- C: Lurgi
- D: Silcarbon

Bei Verwendung des Silcarbon-Materials als Träger war es mit dem gegebenen Substrat nicht möglich, einen stabilen Abbauprozess aufrecht zu erhalten. Bereits Raumbelastungen von 100 mg/l*d verursachten Instabilitäten des Prozesses und eine zunehmende Verringerung der Abbauleistung. Untersuchungen der Biomasseentwicklung bestätigten die Ergebnisse aus den Batch-Versuchen. Der Biomassegehalt des Reaktors war bei Verwendung der Silcarbon-Kohle nur gering. Darüber hinaus erfolgte der Biomasseaufwuchs nicht, wie erwartet, unter Einschluß der Trägerpartikel, sondern in separaten Flocken zwischen den zugesetzten Trägern. Selbst dort, wo einzelne Organismen an der Trägeroberfläche gebunden wurden, vollzog sich die weitere Biofilmentwicklung nicht auf der Trägeroberfläche, sondern im freien Raum (Abbildung 7.15).

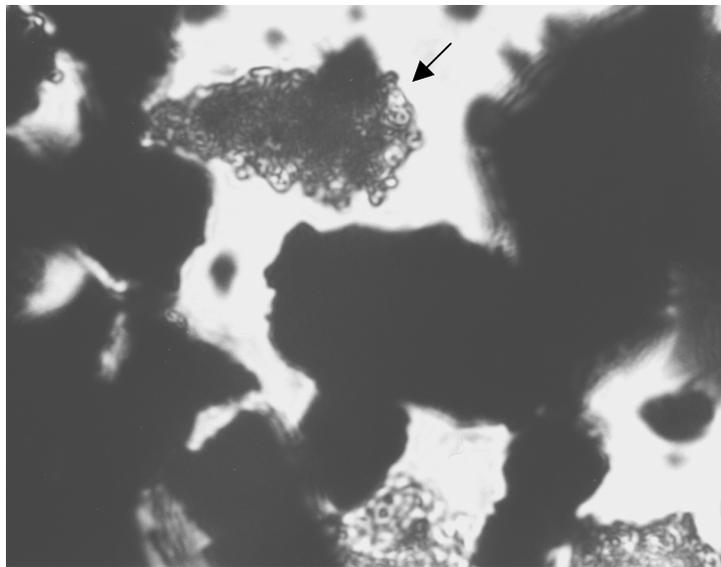


Abbildung 7.15: Aufwuchsverhalten von Mikroorganismen auf SILCARBON TH 90 G während der kontinuierlichen Behandlung von arsenhaltigem Grundwasser. Der Feil kennzeichnet die Belebtschlammflocke.

Als wesentlicher Faktor bei der Auswahl der Trägermaterialien erwies sich neben der Biokompatibilität das Adsorptionsverhalten gegenüber den anorganischen und eventuell organischen Arsenverbindungen. Wie Tabelle 7.10 verdeutlicht, zeigten die verwendeten Materialien hinsichtlich ihres Adsorptionsvermögens erhebliche Unterschiede. Während das Material NORIT nahezu keine Adsorptionskapazität für die vorhandenen Arsenverbindungen aufwies, wurden z.B. durch die verwendete Hydrafin-Kohle erhebliche Mengen an Arsen akkumuliert. Entsprechend zeigten die Materialien CHEMVIRON und NORIT im Batch-Versuch mit verdünntem Substrat zwar gute Aufwuchseigenschaften, waren aber im kontinuierlichen Betrieb nicht zur Elimination dieser toxischen Substanzen befähigt. Als besonders problematisch erwies sich das

Verhalten des SILCARBON-Materials. Unbehandelte SILCARBON-Kohlen adsorbierten zwar unter alkalischen Bedingungen große Mengen an Arsen, gaben diese aber nach Einstellung eines physiologischen pH-Wertes von pH 7 wieder frei. Damit wurde einerseits in frisch zugesetzten Kohlen die Besiedelung des Trägers mit Mikroorganismen behindert, andererseits erfolgte während der Behandlung aber nur eine sehr geringe Elimination von Arsenverbindungen (Tabelle 7.11, Tabelle 7.12). Entsprechend führten die toxischen Wirkungen der Arsenverbindungen bereits bei geringen Substratmengen zu starken Schädigungen des biologischen Systems.

Tabelle 7.11: Elimination ausgewählter Verbindungen aus Grundwasser durch eine zweistufige biologisch adsorptive Behandlung mit unterschiedlichen Trägermaterialien

Parameter	Konzentration		
	Zulauf	Ablauf SILCARBON TH 90G	Ablauf Lurgi Hydrafin SC 44-1
pH-Wert	9,5	8,3	7,9
CSB (mg/l)	5800	590	255
Arsen (mg/l)	0,48	0,39	0,11
Zink (mg/l)	0,79	0,16	0,11
Phenole:			
<i>kupplgsf. Stoffe (mg/l)</i>	411	18,4	<0,1
Toxizität GL	2128	32	0

Tabelle 7.12: Anreicherung ausgewählter Verbindungen aus Grundwasser in verschiedenen Trägermaterialien bei der zweistufigen biologisch adsorptiven Behandlung.

Parameter	Konzentration	
	SILCARBON TH 90G	Lurgi Hydrafin SC 44-1
Phenole:		
<i>kupplgsf. Stoffe (mg/kg)</i>	17800	1620
Arsen (mg/kg)	0,26	2,1
Zink (mg/kg)	61	31

Für die weitere Optimierung des Systems wurde das unter den eingesetzten Materialien als besonders geeignet bewertete Hydrafin SC 44-1 (LURGI) verwendet. Dabei wurde in

kontinuierlichen Versuchen mit einem Trägeranteil von 1 % ein optimales Schlammalter von 10 bis 12 Tagen ermittelt [7. 54].

Weitere Untersuchungen dienten der Optimierung des Trägeranteiles in den Reaktoren. Dieser übte auf Grund seiner Doppelfunktion als Biofilmtträger und Adsorbens einen erheblichen Einfluß auf die Leistungsfähigkeit des Gesamtsystems aus (Abbildung 7.16 bis Abbildung 7.18). Dies galt sowohl für die erzielbare Eliminationsleistung, wie auch für die Ablaufqualität.

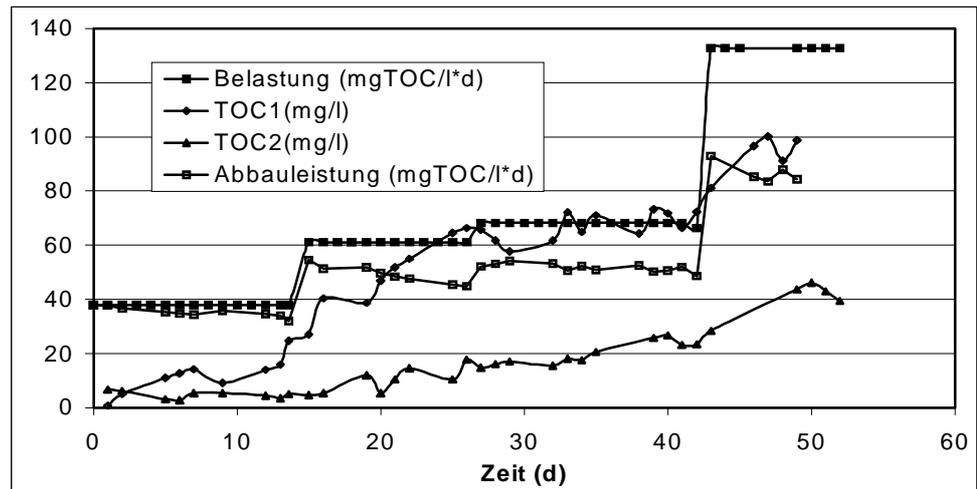


Abbildung 7.16: Abbau organischer Grundwasserinhaltsstoffe durch zweistufige biologisch-adsorptive Behandlung im kontinuierlichen Betrieb. Träger: 1 % Hydradin SC44-1.

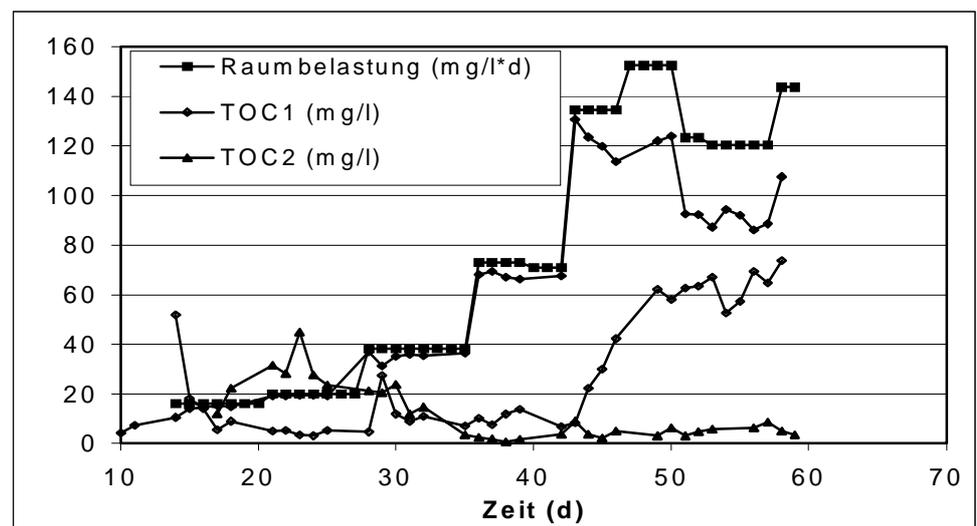


Abbildung 7.17: Abbau organischer Grundwasserinhaltsstoffe durch zweistufige biologisch-adsorptive Behandlung im kontinuierlichen Betrieb. Träger: 0.5 % Hydradin SC44-1.

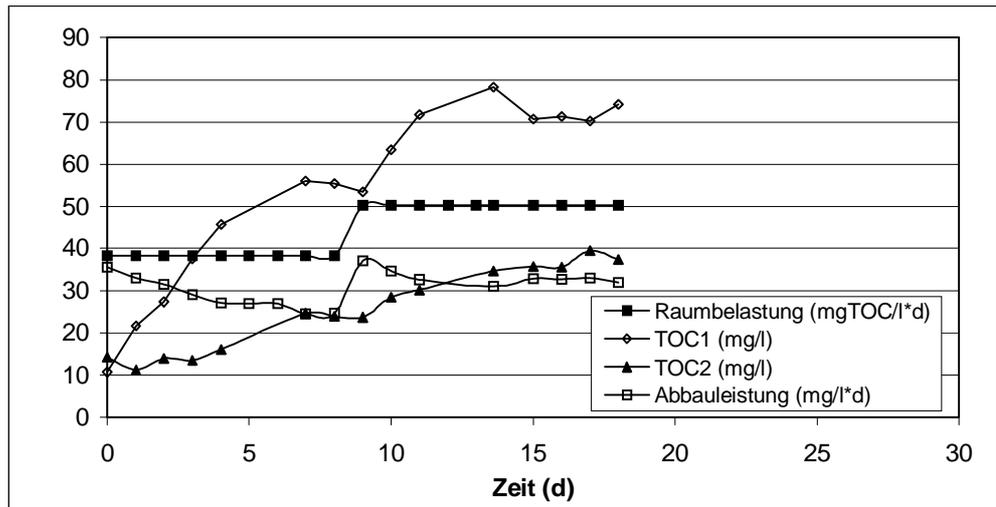


Abbildung 7.18: Abbau organischer Grundwasserinhaltsstoffe durch zweistufige biologisch-adsorptive Behandlung im kontinuierlichen Betrieb. Träger: 0.1 % Hydradin SC44-1.

Bei der Bewertung der erzielten Abbauleistungen muß berücksichtigt werden, daß die TOC-Reaktorkonzentration für das verwendete Substrat auf Grund toxischer organischer Inhaltsstoffe auf ca. 80 mg/l begrenzt ist, weil oberhalb dieser Konzentration mit einer zunehmenden Schädigung der Mikroorganismen gerechnet werden muß [7. 54]. Unter Berücksichtigung dieses Limits wurde mit 1 % Trägeranteil im Reaktorvolumen eine maximale Abbauleistung von ca. 300 mg CSB/l*d erzielt (Abbildung 7.16), bei 0,5 % wurden maximal 200 mg CSB/l*d erreicht (Abbildung 7.17) und bei 0,1 % lag die maximal mögliche Raumbelastung nur noch bei 100 mg CSB/l*d (Abbildung 7.18). Besonders beachtenswert ist der mit Verringerung der Trägermenge abnehmende Eliminationsgrad organischer Fracht im Reaktor 2. Während bei 1 % Trägermaterial der nach der ersten Stufe verbleibende Rest-CSB nahezu vollständig im Reaktor 2 eliminiert wurde, stieg dieser mit abnehmender Trägermenge kontinuierlich an und wurde auch bei Verlängerung der Verweilzeit nicht weiter abgebaut. Dies läßt den Schluß zu, daß bei hohen Trägeranteilen das Gesamtsystem durch die biologische Abbauleistung limitiert wird. Das im Reaktor 1 nicht vollständig abgebaute Restsubstrat konnte durch die Verlängerung der Reaktionszeit im Reaktor 2 noch vollständig mineralisiert werden. Hingegen bestand der Rest-CSB bei geringeren Trägermengen offensichtlich überwiegend aus biologisch nicht abbaubaren Verbindungen. Die fehlende Adsorptionskapazität führte dabei letztlich über die ungenügende Elimination der toxischen Verbindungen zu einer Limiterung der Gesamteliminationsleistung. Die Ausschöpfung der Leistungsfähigkeit des Gesamtsystems erforderte also für die Aufrechterhaltung der Adsorptionskapazität einen Trägeranteil von ca. 1 %. Weitere Versuche zeigten, daß die maximal erreichbare Eliminationsleistung des Systems bei konstanter Trägermenge von 1 % durch die

Konzentration der organischen Fracht nicht signifikant beeinflusst wurde. Bei Verwendung des gewählten Trägers waren toxische Wirkungen der Wasserinhaltsstoffe innerhalb der Leistungsgrenzen des optimierten Gesamtsystems demzufolge von untergeordneter Bedeutung. Dies bestätigt die Annahme, daß unter diesen Bedingungen die biologische Abbauleistung als limitierend anzusehen ist.

Wie das dargestellt Beispiel verdeutlicht, kommt dem Biofilmträger bei gleichzeitigem Vorhandensein hoher, jedoch abbaubarer organischer Belastungen und persistenter toxischer Verbindungen eine mehrfache Rolle zu. Er dient zunächst wie bei leicht abbaubaren Substraten auch als Aufwuchsmaterial für den Biofilm. Darüber hinaus werden toxische Verbindungen, die nicht oder nicht mit genügender Effizienz biologisch abgebaut werden, adsorptiv gebunden und können mit dem Überschussschlamm aus dem System entnommen werden. Dadurch ermöglicht der Einsatz von Biofilmträgern höhere Raum-Zeit-Ausbeuten.

Ein weiterer Vorteil dieser Prozeßführung besteht darin, daß bei ausreichender Adsorptionskapazität auch Substrate mit hohen Konzentrationen sowohl toxischer, wie auch nicht toxischer Verbindungen behandelt werden können. Für die Gesamtkapazität des Systems ist offensichtlich vor allem das Verhältnis von Substanzmenge und Adsorbens, nicht primär die vorhandene Konzentration der Inhaltsstoffe entscheidend. Wie Abbildung 7.19 zeigt, wurden mit dem beschriebenen optimierten System nachfolgend im Technikumsmaßstab bei wesentlich höheren Substratkonzentrationen sogar bessere Umsatzraten erzielt, als aus den Laborexperimenten mit geringeren Konzentrationen zu erwarten war.

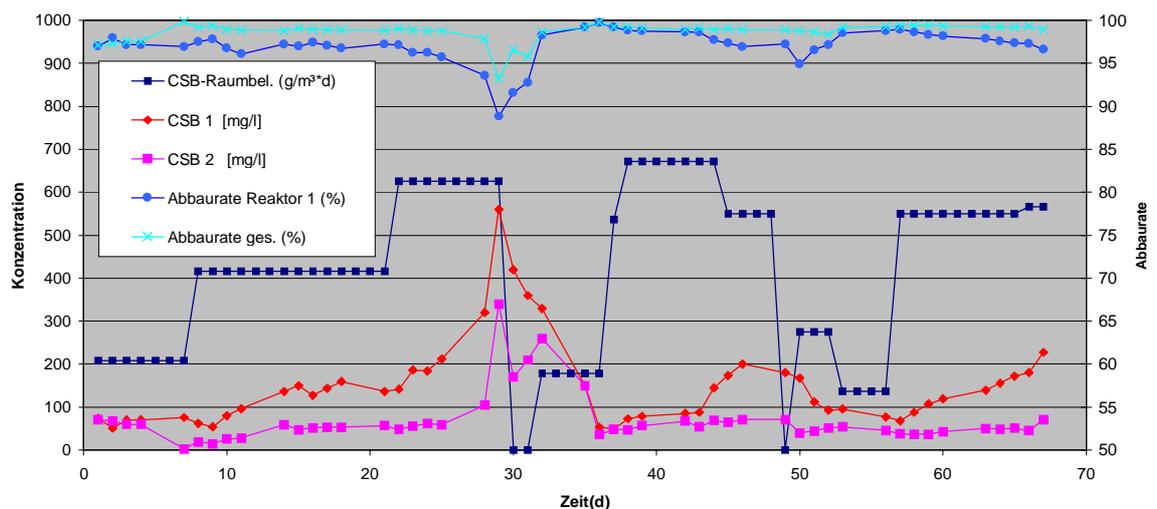


Abbildung 7.19: Leistungen einer zweistufigen biologisch-adsorptiven Grundwasserbehandlung unter optimierten Bedingungen (Träger Hydradin SC 44-1, Trägermenge im Reaktor 1 %, Schlammalter 12 d) im Technikumsmaßstab (Reaktorvolumen: 1,2 m³) [7. 54]

Neben der Stabilisierung des Gesamtsystems durch Akkumulation toxischer persistenter Verbindungen werden auch nicht toxische persistente Substanzen an der Trägermatrix adsorbiert und mit dieser aus dem System entfernt. Dadurch kann die Eliminationsleistung des Gesamtsystems zusätzlich erhöht werden. Die Adsorption biologisch abbaubarer Substrate spielte bei optimierter Prozeßführung nur eine untergeordnete Rolle. Der Anteil adsorptiv gebundener organischer Verbindungen lag selbst bei den höchsten Belastungen von 500 mg/l*d bei maximal 2 % der eliminierten organischen Gesamtfracht. Dieser Anteil wurde im wesentlichen durch nicht biologisch abbaubare Verbindungen repräsentiert. Bei nicht optimierter Prozeßführung wurden jedoch im Einzelfall bis zu 20 % der organischen Fracht ausschließlich durch Adsorption eliminiert (vgl. Tabelle 7.12).

7.2. Eliminierung persistenter Verbindungen – Die Bedeutung des Biofilmträgers beim Abbau von Huminstoffen

Neben hoch konzentrierten und toxischen Substanzen stellen stark persistente Verbindungen eine wichtige Gruppe von Problemstoffen vor allem in Abwässern industriellen Ursprungs, aber auch bei biotechnologischen Verfahren in der Altlastensanierung dar. Die Eliminierung dieser Verbindungen gelingt in ökonomisch vertretbaren Zeiträumen meist nur durch die Kombination der biologischen Behandlung mit chemischen oder physiko-chemischen Verfahren [7. 11]. In begrenztem Umfang können aber auch Biofilmtechnologien zur Mineralisierung solcher Substanzen beitragen.

Zu den stark persistenten Verbindungen gehören u.a. die Huminstoffe, hochmolekulare Verbindungen mit aromatischen, chinoiden und aliphatischen Strukturelementen. In wäßrigen Medien sind Huminstoffe vor allem als persistente Bestandteile des Deponiesickerwassers bekannt geworden. Sie entstehen jedoch auch durch biogene Prozesse in biologischen Kläranlagen selbst und stellen hier einen limitierenden Faktor für die Abbauleistung der Anlagen dar [7. 38, 7. 44].

Der Abbau der Huminstoffe erfolgt nur sehr langsam und vollzieht sich in Abhängigkeit von der Struktur der Verbindungen und vom jeweiligen Reaktionsmedium im Maßstab von Monaten, Jahren oder gar Jahrzehnten. Er wird üblicherweise durch relativ unspezifische extrazelluläre Peroxidasen eingeleitet. Dabei sind vor allem verschiedene Pilze von Bedeutung, die die Verbindungen bei Stickstoffmangel als N-Quelle zu nutzen vermögen. Die Fähigkeit heterotropher Mikroorganismen zur Mineralisierung von Huminstoffen wird dagegen als eher gering beschrieben [7. 84]. Untersuchungen verschiedener Autoren zeigen jedoch, daß die Leistungsfähigkeit biologischer Anlagen durch den Einsatz von Biofilmträgern signifikant erhöht werden kann [7. 32, 7. 33, 7. 47]. Wie vergleichende

Untersuchungen der Elimination persistenter Verbindungen aus Deponiesickerwasser durch verschiedene Verfahren der biologischen Behandlung am IBT belegen, kann diese meßbare Zunahme des Anteiles der eliminierbaren organischen Fracht nicht durch adsorptive Effekte erklärt werden [7. 47].

Die Ergebnisse unserer kontinuierlichen Versuche über mehr als 100 Tage zeigten jedoch nicht nur die Vorteile der Biofilmentechnologie gegenüber einem konventionellen Belebtschlammssystem, sondern legten auch den Schluß nahe, daß die Leistungsfähigkeit des biologischen Systems durch die Art des Trägermaterialies und/oder die Prozeßführung erheblich beeinflußt werden kann. Lag der Eliminationsgrad für TOC bei Verwendung suspendierter Biomasse bei >83 %, so wurden mit einem Festbettreaktor mehr als 85 % und im Wirbelschichtreaktor mehr als 94 % erreicht. In allem Fällen wurden weder Überschußschlamm noch Trägeranteile entnommen. Die adsorptive Elimination war demzufolge vernachlässigbar. Da aufgrund der unterschiedlichen technologischen Anforderungen von Fest- und Wirbelschichttechnologie zwei nicht identische Trägermaterialien verwendet wurden, war mit dieser Versuchsanordnung zunächst nicht zu klären, ob die gemessenen Unterschiede des Abbaugrades auf den Einfluß der Trägermaterialien oder die Prozeßführung zurückgeführt werden können. Untersuchungen anderer Autoren wiesen vor allem auf Einflüsse der Trägermaterialien auf die biologische Abbaubarkeit hin. So gehen Imai et al. [7. 34] von einer adsorptiven Bindung der Huminstoffe an den Träger als Voraussetzung für den nachfolgenden biologischen Angriff aus. Denne und Ecker diskutierten für den Einfluß von Aktivkohlen auch eine katalytische Aktivität des Trägermaterials [7. 15]. Um den Einfluß der Träger näher zu charakterisieren, wurde die Fraktion der Huminsäuren aus dem natürlichen Medium isoliert und deren Abbau im Labormaßstab in Wirbelschicht-Biofilm-Reaktoren unter Verwendung von unterschiedlich strukturierten Modellträgermaterialien untersucht. Die Struktur der verwendeten Polystyrenträger ist in Tabelle 6.1 zusammengefaßt. Der Abbau der Huminsäuren in Abhängigkeit von ihrem Molekulargewicht wurde mittels Gelpermeationschromatographie verfolgt.

Wie Abbildung 7.20 verdeutlicht, wurden sowohl das Ausmaß des biologischen Abbaus, wie auch die Molekülgrößenverteilung durch die verwendeten Trägermaterialien beeinflußt. In allen Fällen wurden vor allem die Verbindungen mit einem Molekulargewicht < 1000 kD abgebaut. Dies stimmt mit den Ergebnissen anderer Autoren [7. 34] überein. Bei Verwendung kationischer Träger wurden jedoch zusätzlich auch größere Moleküle bis zu 2000 kD angegriffen. Dabei resultierte der mikrobielle Angriff auf die Huminstoffmoleküle letztendlich in einem Abbau der Verbindungen. Im Gegensatz dazu war der Abbaugrad bei Verwendung des nicht derivatisierten Trägermaterialies nur gering

und mit dem anionischen Träger erfolgte sogar eine geringe Zunahme des Anteils der hochmolekularen Strukturen > 5000 kD.

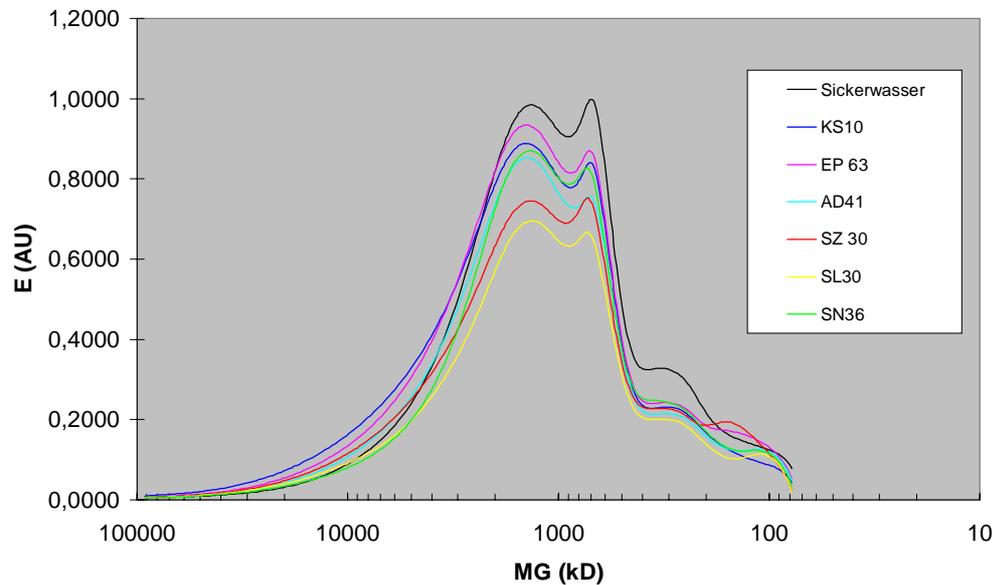


Abbildung 7.20: Einfluß unterschiedlicher Trägermaterialien auf den Abbau der Huminsäurefraktion aus Deponiesickerwasser im Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor. Trägermaterial Polystyrol-DVB-Kopolymerisat underivatisiert (EP 63), anionisch (KS 10), kationisch (AD 41, SZ 30, SL 30) oder gemischt funktionalisiert (SN 36) (vgl. Tab. 6.1)

Die erzielten Ergebnisse wurden in weiteren Untersuchungen unter Verwendung einer kommerziell verfügbaren Huminsäure (Fluka) und mit 3 ausgewählten Trägern (KS10-anionisch, AD41-kationisch, EP 63 nicht derivatisiert, vgl. Tab. 6.1) vertieft [7. 42].

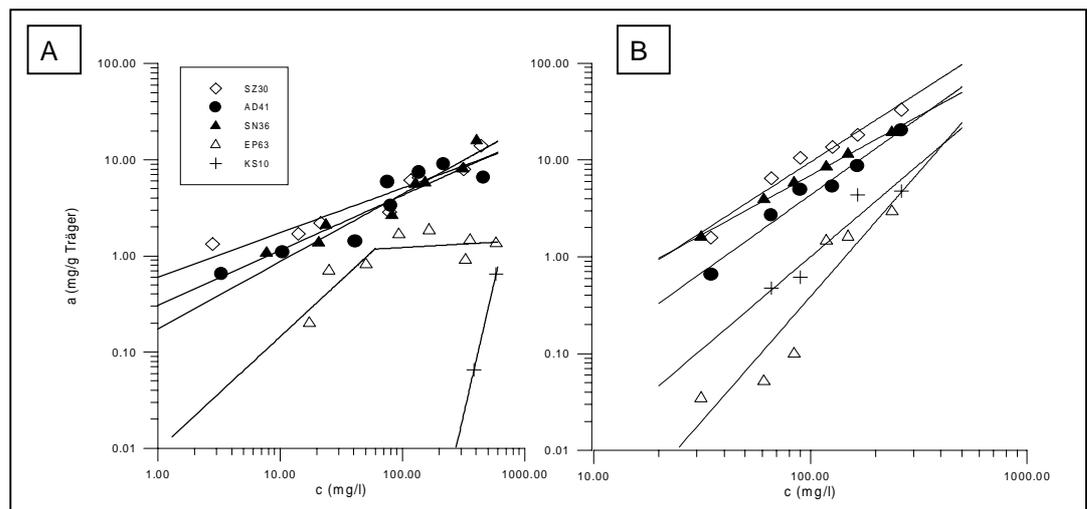


Abbildung 7.21: Adsorptionsverhalten von Huminsäure, isoliert aus Deponiesickerwassr (A) und kommerziell verfügbarer Huminsäure (B) an unterschiedlichen Trägermaterialien (zur Struktur der Träger vgl. Tab. 6.1).

Wie aus Abbildung 7.21 hervorgeht, wurden sowohl die natürliche Huminsäure, wie auch das Handelsprodukt durch kationische Polystyrenträger gebunden, während die nicht derivatisierten oder anionischen Träger mit den Huminsäuren kaum Wechselwirkungen eingingen. Da sich die eingesetzten Materialien im wesentlichen durch die Ioneneigenschaften der Oberflächen unterscheiden, läßt dies den Schluß zu, daß die Bindung der Huminsäuren vor allem durch ionische Wechselwirkungen erfolgte.

Wie Abbildung 7.22 für das kationische Trägermaterial AD41 zeigt, wurde die verwendete kommerziell verfügbare Huminsäure in den kontinuierlich betriebenen Wirbelschicht-Reaktoren mit signifikanten Umsatzraten biologisch abgebaut. Sowohl die TOC-Konzentration im Ablauf, wie auch der Biomassegehalt der Träger zeigen eine deutliche Abhängigkeit von der Raumbelastung. Zusätzliche Batchversuche ergaben für einen weiten Konzentrationsbereich >10 mg/l eine konstante Abbaugeschwindigkeit. Der Abbau unterlag demzufolge in diesem Bereich einem Geschwindigkeitsgesetz 0. Ordnung, war also nicht durch das Substrat limitiert [7. 42].

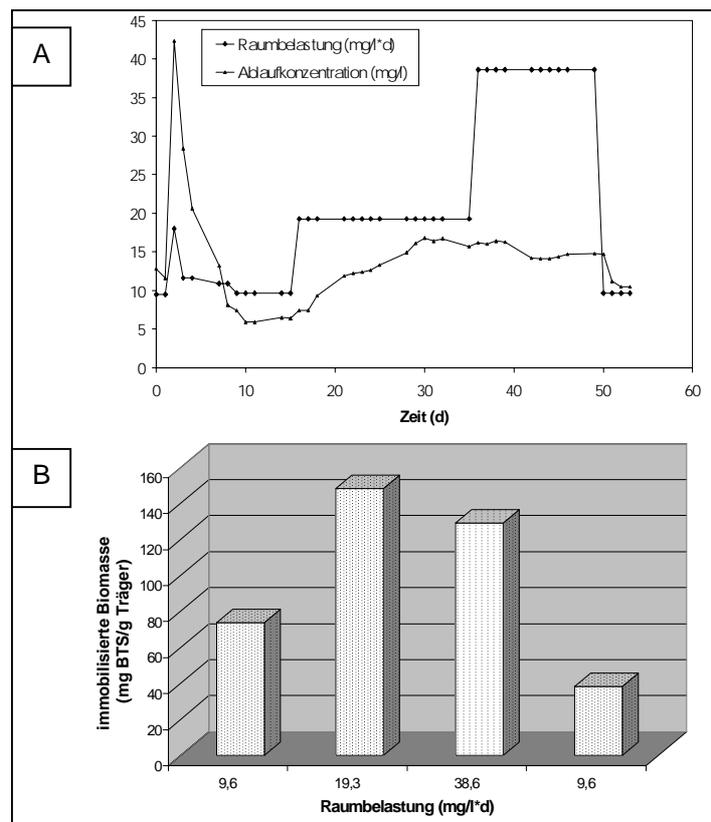


Abbildung 7.22: Abbau von Huminsäure (Fluka) durch immobilisierte Mikroorganismen im Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor (Träger AD 41) (A) und Entwicklung der immobilisierten Biomasse (B) in Abhängigkeit von der Raumbelastung.

Eine deutliche Abhängigkeit der Abbaugeschwindigkeit wurde jedoch in Abhängigkeit von den verwendeten Trägermaterialien festgestellt. Wurden mit dem kationischen Träger AD41 Abbauleistungen von maximal 25 mg/l*d (125 mg/kgTräger*d) erzielt, so lagen die Abbauleistungen bei Verwendung des unmodifizierten Trägers EP63 bei 4,4 mg/l*d und mit dem anionischen Trägermaterial KS10 wurden sogar nur 2,8 mg/l*d erreicht. Entsprechend deutlich sind auch die Unterschiede hinsichtlich der erzielbaren Ablaufkonzentrationen bei gleicher Raumbelastung (Abbildung 7.23), und der Biomassegehalte auf den einzelnen Trägermaterialien.

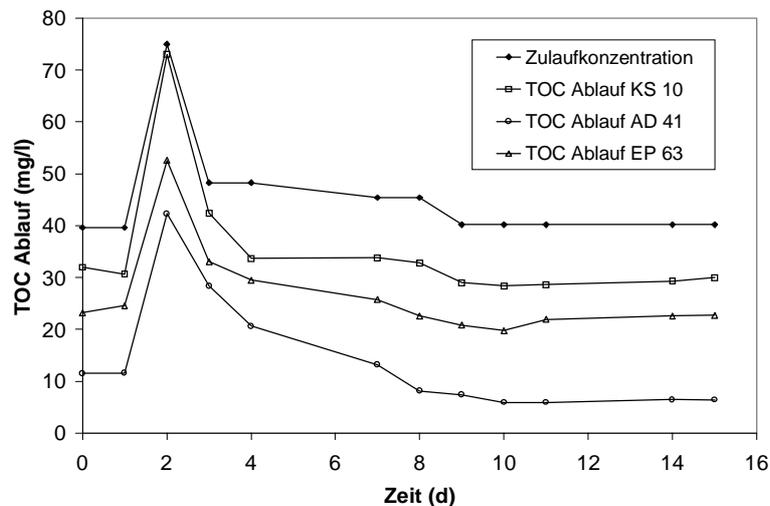


Abbildung 7.23: Einfluß unterschiedlicher Trägermaterialien auf den Abbaugrad von Huminsäure im Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor. Raumbelastung 9,8 mg/l*d

Während für den Träger AD41 (kationisch) 73,8 mg BTS/g Träger gemessen wurden, lag der Wert für das unmodifizierte Material EP63 bei 30,3 mg BTS/g Träger und für KS10 bei lediglich 6,5 mg BTS/g Träger.

Deutlich unterschiedlich war auch der Einfluß der Stickstoffversorgung auf die Abbauleistung in den 3 untersuchten Reaktoren. Da viele Organismen Huminstoffe in erster Linie als N-Quelle bei Stickstoffmangel erschließen, war eine signifikante Wirkung der Stickstoffversorgung auf die Abbauleistung der mikrobiellen Population zu erwarten. Während mit dem Träger AD41 bei Stickstoffmangel auch erwartungsgemäß eine Erhöhung der Abbauleistung von bis zu 20 % erzielt werden konnte, war mit den anderen beiden Trägermaterialien der Einfluß der Stickstoffversorgung nur gering (Abbildung 7.24).

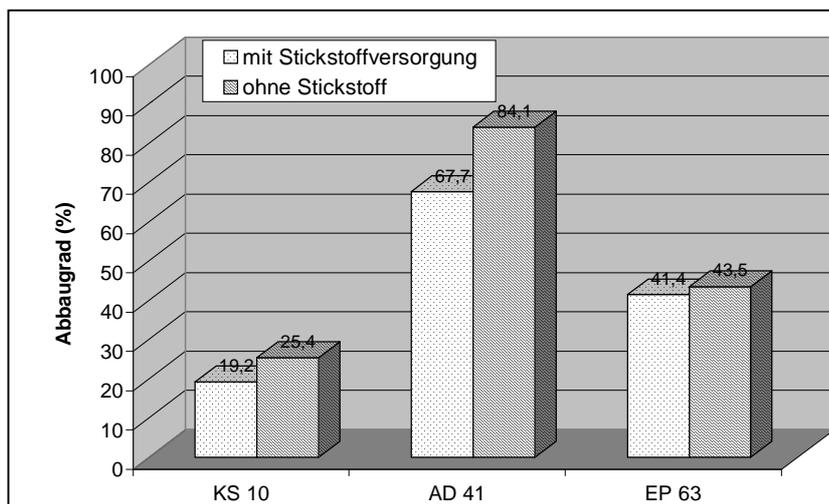


Abbildung 7.24: Einfluß der Stickstoffversorgung auf den Abbaugrad von Huminsäure in Wirbelschicht-Reaktoren mit unterschiedlichen Trägermaterialien (Raumbelastung 9,8 mg/l*d).

Im Gegensatz zu den verwendeten Trägern spielten die Mikroorganismen für die erzielbare Abbauleistung eine eher untergeordnete Rolle. Wurden sie von den Trägern getrennt und in Schüttelkulturen inkubiert, so wurden unabhängig von ihrer Herkunft nahezu gleiche Abbauraten von lediglich 0,7 mg/l*d erzielt (Abbildung 7.25).

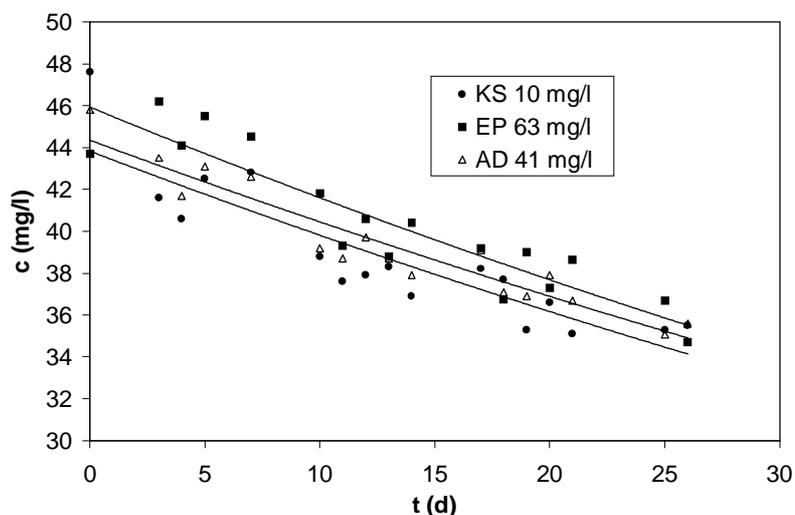


Abbildung 7.25: Abbau von kommerzieller Huminsäure (Fluka) durch suspendierte Mikroorganismen, die vorher aus Biofilmreaktoren mit unterschiedlichen Trägern isoliert wurden.

Dieses Ergebnis, wie auch der unterschiedliche Stickstoffeinfluß weisen darauf hin, daß die Verwertung der Huminstoffe maßgeblich durch Faktoren beeinflusst wird, die unabhängig von der mikrobiellen Population agieren. Dafür kommt vor allem der Träger selbst in Betracht. Die verwendeten Trägerstrukturen, die Struktur der Huminstoffe und die unterschiedliche Effizienz der Bindung der Huminstoffe an die Träger lassen den

Schluß zu, daß ein ursächlicher Zusammenhang zwischen der Bindung des Substrates an den Träger und vermutlich der primären Spaltung der Huminstoffmoleküle durch extrazelluläre Peroxidasen besteht. Zu ähnlichen Schlußfolgerungen kamen auch Imai et al. [7. 34]. Bei Verwendung von Aktivkohle als Trägermaterial wurde gleichfalls ein enger Zusammenhang zwischen der Adsorption der Verbindungen und ihrer Abbaubarkeit festgestellt.

Aus den vorliegenden Untersuchungen und der Struktur der verwendeten Träger kann gefolgert werden, daß vor allem ionische Beziehungen für den Abbauprozess von Bedeutung sind. Wie die Struktur der Huminsäuremoleküle in Abbildung 7.26 verdeutlicht, kann durch ionische Wechselwirkungen der Carboxylgruppen der Huminsäuren mit den Aminogruppen des Trägers AD41 die Elektronendichte des Substratmoleküls verringert und so der Angriff durch Peroxidasen erleichtert werden. Ob darüber hinaus weitere Effekte, z.B. Einflüsse auf die Biofilmstruktur und damit auf den Transport von Intermediaten zwischen verschiedenen Partnern des Biofilmkonsortiums, oder Änderungen der Aktivitäten der beteiligten Enzymsysteme beteiligt sind, kann bisher nicht eingeschätzt werden.

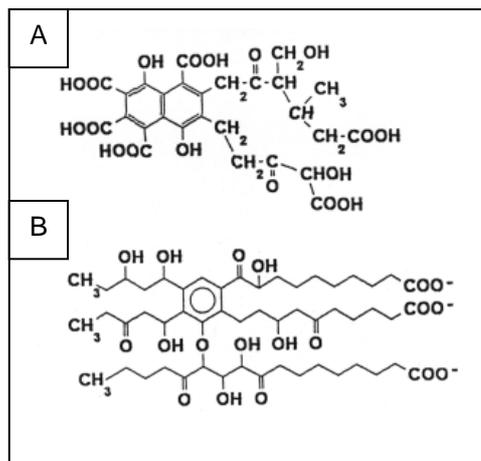


Abbildung 7.26: Charakteristische Strukturen von Huminsäuren aus (A) Süßwasser und (B) Meerwasser [7. 58].

7.3 Abbau persistenter organischer Verbindungen mit bakterientoxischen Eigenschaften durch die Kombination biologischer und chemischer Wirkmechanismen

Viele Substanzen anthropogenen Ursprungs zeichnen sich durch eine hohe Persistenz gegenüber mikrobiellen Abbauprozessen oder durch bakterientoxische Eigenschaften aus. Für biologische Behandlungsanlagen besonders problematisch sind dabei vor allem

solche Verbindungen für die beide Eigenschaften zusammentreffen. Liegen diese Stoffe in geringen Anteilen neben hohen Konzentrationen abbaubarer Verbindungen vor, so kann das Problem z.B. durch Kombination des biologischen Abbaus mit adsorptiven Verfahren gelöst werden. Ein solches Beispiel wurde in Abschn. 7.1.3 beschrieben. Stellt die zu eliminierende Problemsubstanz jedoch selbst eine Hauptkomponente dar, so muß dieser Lösungsansatz sowohl aus technologischen, wie auch aus Kostengründen verworfen und nach anderen Wegen gesucht werden, die üblicherweise eine Wiedergewinnung oder vollständige Mineralisierung der entsprechenden Schadstoffe zum Inhalt haben.

7.3.1 Problemstellung – Besondere Anforderungen an die Abbauleistung

Verbindungen mit bakterientoxischen Eigenschaften, die darüber hinaus auch durch adaptierte Mikrokonsortien nicht oder nicht in technologisch vertretbaren Zeiträumen abgebaut werden, sind in dieser Form einer mikrobiellen Behandlung zunächst nicht zugänglich. Handelt es sich dabei jedoch um organische Verbindungen, so können diese z.B. durch chemische Stoffumwandlungsprozesse in biologisch leichter abbaubare Verbindungen überführt werden. Für eine derartige Prozeßführung sind verschiedene Beispiele bekannt. Üblich sind z.B. die oxidative Behandlung mit H_2O_2 oder Ozon bzw. eine Reduktion mit Fe. In der überwiegenden Mehrzahl der Anwendungen werden die chemischen und biologischen Prozesse räumlich getrennt realisiert [7. 14, 7. 41]. Die simultane Kombination chemischer und biologischer Prozesse in einem einheitlichen Reaktionsraum wurde hingegen bisher nur selten realisiert [7. 10, 7. 45].

Eine sehr effektive Form der Kombination chemischer und biologischer Reaktionen stellt die Verwendung des Biofilmträgers selbst als Katalysator für den chemischen Reaktionsprozeß dar. Dafür kommen z.B. verschiedene Feststoffkatalysatoren auf der Basis metalldotierter Zeolite in Frage. Auch für Aktivkohlen ist die Fähigkeit, als Katalysator in Redoxreaktionen zu agieren, seit langem bekannt [7. 25]. Da Aktivkohlen gleichzeitig für viele Prozesse als Biofilmträger geeignet sind, besitzen sie gute Voraussetzungen für die Verwendung in biologisch-chemischen Kombinationsverfahren.

Der Einsatz katalytisch aktiver Biofilmträger für die Eliminierung toxischer organischer Verbindungen erfordert eine genaue Abstimmung der einzelnen Prozesse zueinander. Unter allen Prozeßbedingungen muß gewährleistet bleiben, daß der erste Reaktionsschritt, die katalytische Spaltung, mit ausreichender Geschwindigkeit abläuft, um eine Anreicherung des toxischen Substrates und damit eine nachhaltige Schädigung der biologischen Komponente zu verhindern. Dazu ist es notwendig, daß der Transport

des Substrates hin zum Träger mit genügend hoher Geschwindigkeit erfolgen kann. In diesem Zusammenhang kommt der Dicke des Biofilmes und seiner Struktur eine herausragende Rolle zu. Für hohe Transportgeschwindigkeiten wäre ein möglichst ungestörter konvektiver Transport wünschenswert. Dieser wird bevorzugt bei geringen Biofilmdicken und lockeren Biofilmstrukturen erreicht. Gleichzeitig muß die Struktur des Biofilmes aber auch so beschaffen sein, daß die vorhandenen mikrobiellen Konsortien ausreichend vor der Wirkung des toxischen Primärsubstrates geschützt werden. Ein möglichst limitierter Stofftransport innerhalb des Biofilmes kann dafür einen wichtigen Beitrag leisten. Weiterhin muß gewährleistet werden, daß die im ersten Reaktionsschritt gebildeten Produkte durch die Biofilmorganismen mit ausreichender Reaktionsgeschwindigkeit mineralisiert werden können, was wiederum eine bestimmte Mindestbiomassekonzentration voraussetzt. Nur ein ausreichend optimiertes Träger-Biofilm-System ermöglicht die gleichzeitige Realisierung dieser teils sehr unterschiedlichen Zielfunktionen. Als wichtigste Variable steht dafür das Verhältnis von Substratangebot und Trägermenge zur Verfügung, wobei die Ausbildung des Biofilmes in Abhängigkeit von diesen beiden Parametern erfolgt.

7.3.2. Mineralisierung organischer Peroxide durch Biofilmkonsortien auf katalytisch aktiven Trägern

Peroxide verursachen in lebenden Zellen starke Schäden des genetischen und enzymatischen Apparates. Deshalb besitzen die meisten Organismen sehr effektive Mechanismen für die Peroxidspaltung. Im Gegensatz zu natürlich vorkommenden Verbindungen werden jedoch einige industriell erzeugte Peroxide von diesen leistungsfähigen Enzymsystemen nur mit geringer Geschwindigkeit entgiftet. Einige Substanzen sind sogar starke Inhibitoren der beiden zellulären peroxidspaltenden Enzyme Peroxidase und Katalase [7. 56] und wirken demzufolge als starke Zellgifte. In konventionellen biologischen Kläranlagen führen sie deshalb zu ganz erheblichen Störungen.

Häufig eingesetzte organische Peroxide sind Methylhydroperoxid (MHP) und Cumolhydroperoxid (MHP). Beide Verbindungen werden bei der oxidativen Phenolsynthese verwendet und fallen entsprechend in den Abwässern der jeweiligen Produktionsanlagen in höheren Konzentrationen an. Während MHP mikrobiell gespalten werden kann, erwies sich CHP in unseren Untersuchungen als sehr effektiver Inhibitor des zellulären peroxidspaltenden Systems und wirkte bereits in geringen Konzentrationen stark bakterientoxisch. Oberhalb einer Konzentration von 3 mmol/l kam die Athmungsaktivität heterotropher Organismen vollständig zum Erliegen. Noch wesentlich

stärker war die Wirkung dieser Substanz auf nitrifizierende Organismen. Die 75 % Hemmschwelle für die Nitrifikation lag bei lediglich 0,1 mmol/l [7. 56]. Im Abwasser einer Produktionsanlage für Phenol wurden jedoch Konzentrationen an organischen Peroxiden von bis zu 300 mmol/l gemessen, was erwartungsgemäß zu erheblichen Beeinträchtigungen der örtlichen biologischen Abwasserbehandlung und zu einer vollständigen Hemmung der Nitrifikation führte [7. 56]. Als Problemsubstanz wurde in diesem Abwasser CHP identifiziert. Deshalb wurde im Labormaßstab der Versuch unternommen, dieses Abwasser mittels kombinierter chemisch-katalytischer und biologischer Prozeßführung zu behandeln.

In einem konventionellen Belebtschlammssystem wurde CHP erst nach längerer Adaptionsphase und nur mit sehr geringen Abbauraten eliminiert [7. 57]. Die maximal erreichbare Abbauleistung lag bei lediglich 30 mgTOC/l*d. Höhere Belastungen führten innerhalb kurzer Zeit zu einem Anstieg der Peroxidkonzentration und in der Folge kam der TOC Abbau nahezu vollständig zum Erliegen. Versuche zur gezielten katalytischen Spaltung der vorhandenen Peroxide mit Hilfe verschiedener Feststoffkatalysatoren führten überwiegend zu unbefriedigenden Ergebnissen, weil vor allem das stark toxische CHP kaum gespalten werden konnte. Dagegen erwiesen sich die relativ unspezifisch wirkenden Aktivkohlen in Abhängigkeit von ihrer Herkunft teils als sehr effektive Katalysatoren für die Spaltung des CHP (Abbildung 7.27) [7. 57].

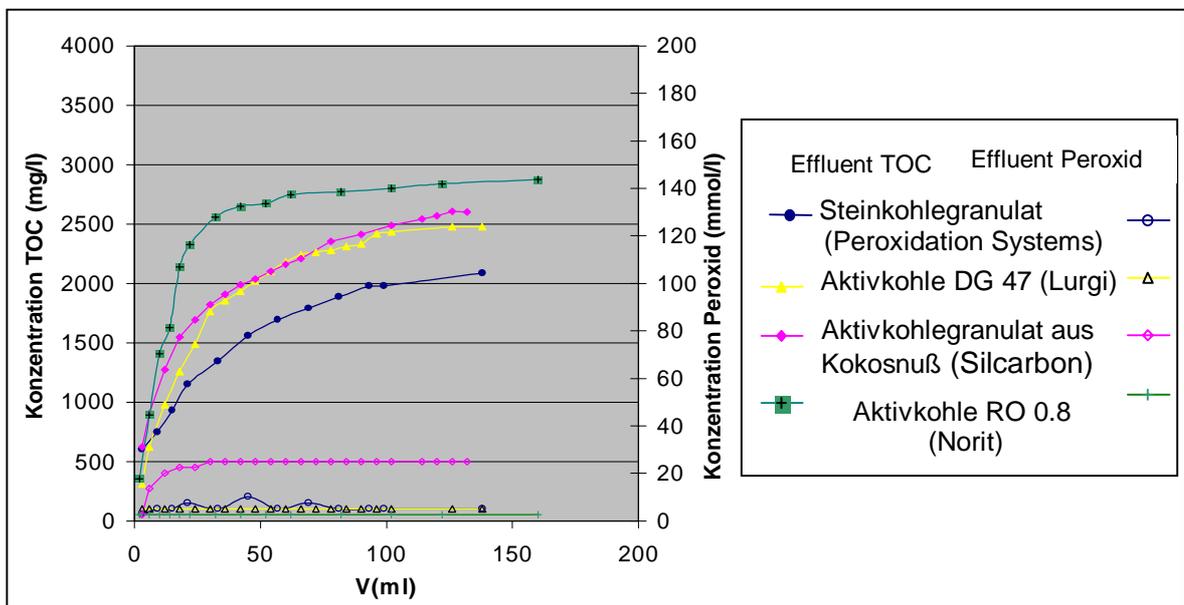


Abbildung 7.27: Adsorption und Spaltung von organischen Peroxiden an verschiedenen Aktivkohlen [7. 57]

Durch die katalytische Spaltung wurde CHP vorrangig in die Produkte Dimethyl-Phenyl-Carbinol und Sauerstoff umgewandelt. In geringer Konzentration erfolgte auch eine Disproportionierung zu den entsprechenden Aldehyden. Der Wasserstoffanteil in der entstehenden Gasphase lag jedoch stets unterhalb von 4% [7. 57]. Die bei der katalytischen Spaltung entstandenen Produkte erwiesen sich als wenig bakterientoxisch und biologisch gut abbaubar. Abbildung 7.28 zeigt den Einfluß der Peroxidspaltung mittels vorgeschaltetem Aktivkohlekatalysator auf die Abbauleistung eines 2 l Laborreaktors mit suspendierter Biomasse. Wie die dargestellten Ergebnisse verdeutlichen, nahm die Abbauleistung unmittelbar nach Einsatz des Katalysators erheblich zu. Durch stufenweise Erhöhung der Raumbelastung wurde eine maximale Abbauleistung von 1400 mg/l*d erzielt, was eine 45fache Steigerung gegenüber der Abbauleistung ohne vorherige katalytische CHP-Spaltung bedeutet.

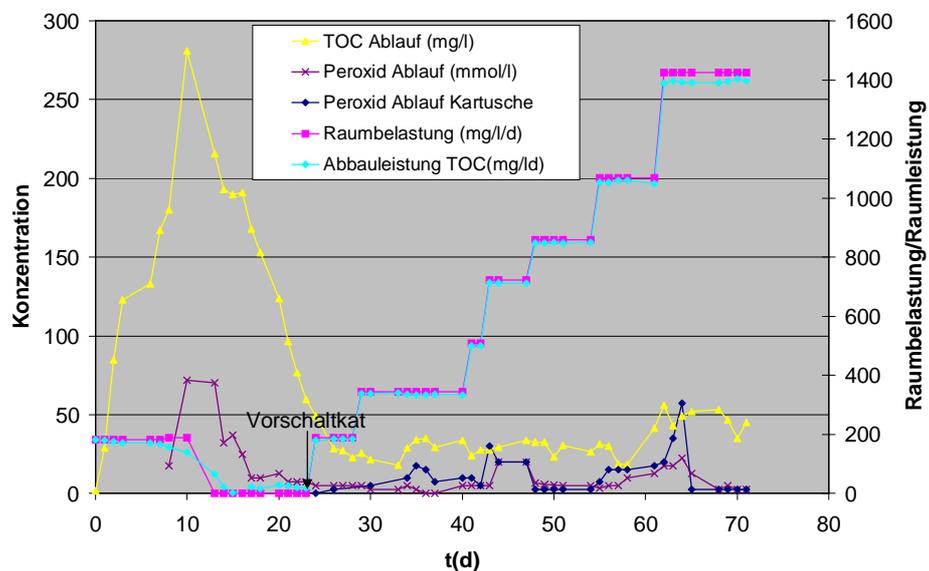


Abbildung 7.28: Einfluß einer vorgeschalteten CHP-Spaltung mittels Aktivkohle auf die Abbauleistung eines Belebtschlammreaktors [7. 57].
Zulaufkonzentration TOC: 2089 mg/l, Peroxide: 300 mmol/l

In weiteren Untersuchungen war zu prüfen, ob die katalytische Spaltung des stark toxischen CHP und der biologische Abbau auch simultan in einem Reaktionsraum realisiert werden können. Dazu wurde zwei weiteren Reaktoren entweder pulverförmige (Hydrafin SC44-1, Fa. LURGI, mittlerer Korndurchmesser 25µm) oder granuliert Aktivkohle (aktiviertes Steinkohlegranulat, Fa. Peroxidation Systems, 0,8-1mm Durchmesser) zugesetzt. Aufbau und Betriebsweise der Reaktoren sind in [7. 57] ausführlich beschrieben. Die Anlagen wurden entweder als Suspensionsreaktor mit Pulveraktivkohle oder Wirbelschichtreaktor (mit granulierter Aktivkohle) mit je 200 ml Träger betrieben. Dabei erfolgte der Aufwuchs der Biomasse überwiegend als Biofilm auf

den Trägern. Die Träger verblieben während des gesamten Versuchszeitraumes im Reaktor. Entfernt wurden lediglich geringe Mengen suspendierter Biomasse (<0,1 g/d) aus dem Wirbelschichtreaktor. Die katalytische Aktivität der Träger wurde in Vorversuchen ermittelt und lag für den verwendeten Temperaturbereich ($T=25^{\circ}\text{C}$) bei ca. 500 mmol/kgTräger*h. Damit war für Raumbelastungen <3500 mgTOC/l*d keine Limitierung des Gesamtsystems durch die katalytische Stufe zu erwarten.

Die Leistungsgrenzen beider Reaktoren wurden durch stufenweise Erhöhung der Raumbelastung ermittelt. Wie Abbildung 7.29 und Abbildung 7.30 verdeutlichen, wurden diese in beiden Reaktoren bei einer Raumbelastung von ca. 1400 mgTOC /l*d erreicht.

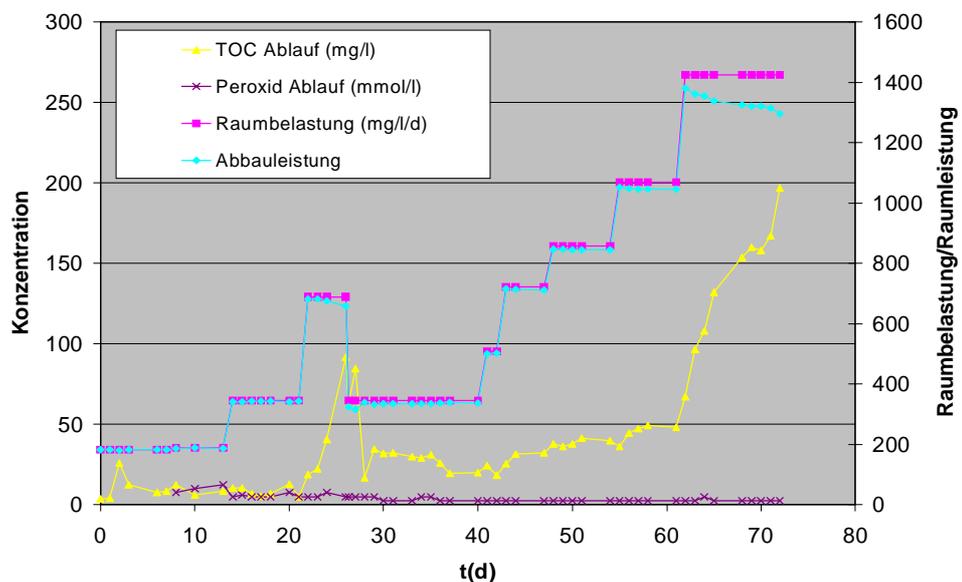


Abbildung 7.29: Abhängigkeit der Abbauleistung von der Raumbelastung beim Abbau organischer Inhaltsstoffe eines CHP-haltigen Abwassers im Biofilmreaktor mit granulierter Aktivkohle als Trägermaterial. Zulaufkonzentration TOC: 2089 mg/l, Peroxide: 300 mmol/l

Die dabei erzielten Abbauleistungen waren mit denen vergleichbar, die auch bei sequentieller katalytischer und biologischer Behandlung erreicht wurden. Diese wurde bei sequentieller Prozeßführung mit 1400 mgTOC/l*d ermittelt. Im Wirbelschichtreaktor lag die maximal erzielbare Abbauleistung bei 1350 mg/l*d und im Suspensionsreaktor mit Pulveraktivkohle bei 1300 mg/l*d. In allen Fällen wurde auch bei Erreichen der Leistungsgrenze keine Anreicherung von Peroxiden im Medium festgestellt. Dies zeigt, daß in diesem Prozeß nicht die katalytische CHP-Spaltung sondern der biologische Abbau limitierend wirkte.

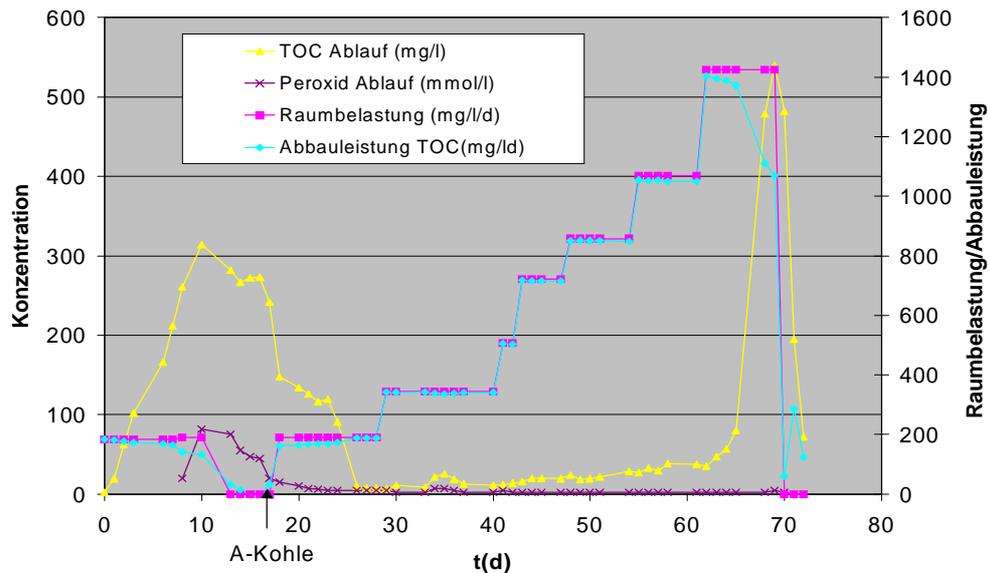


Abbildung 7.30: Abhängigkeit der Abbauleistung von der Raumbelastung beim Abbau organischer Inhaltsstoffe eines CHP-haltigen Abwassers im Biofilmreaktor mit Pulveraktivkohle als Trägermaterial.
Zulaufkonzentration TOC: 2089 mg/l, Peroxide: 300 mmol/l

Die limitierte biologische Abbauleistung bedingte eine vergleichsweise hohe Empfindlichkeit gegenüber Stoßbelastungen in allen Reaktoren. Änderungen der Raumbelastung um mehr als 300 mgTOC/l*d führten jeweils zu einem kurzzeitigen deutlichen Anstieg des Ablauf-TOC. Erst nach mehreren Tagen war die mikrobielle Population in der Lage, die zugeführte organische Fracht mit hinreichender Effektivität zu eliminieren (vgl. Versuchstag 20 bis 30 in Abbildung 7.29). Die vorhandene Biomasse zeigte offensichtlich nur geringe Leistungsreserven. Entsprechend konnte die Steigerung der Reaktorleistung nur langsam und unter Berücksichtigung einer ausreichenden Zeit für die notwendige Biomasseneubildung erfolgen.

Aus den dargestellten Versuchsergebnissen wird deutlich, daß der vorhandene Biofilm den Transport des Substrates zum Träger hin nur wenig beeinträchtigt. Auch mit der höchsten Belastungsstufe wurden Peroxide weder im Medium angereichert, noch war mittels Kalimjodidreduktion eine Akkumulation von Peroxid im Biofilm nachweisbar. Allerdings scheinen Transportprozesse eine gewisse Rolle für die weitere biologische Verwertung der organischen Inhaltsstoffe zu spielen. Während der Biomassegehalt in allen 3 Reaktoren unabhängig von der Prozeßführung mit ca. 6g BTS/l vergleichbar war, zeigen sowohl die erreichbare maximale Abbauleistung, wie auch der Rest-TOC im Ablauf eine gewisse Abhängigkeit von der Struktur des Biofilmes. Die Partikel der granulierten Aktivkohle waren von Biofilmen mit durchschnittlich weniger als 100 µm Dicke umgeben. Dagegen wurden in den Reaktoren mit suspendierter Biomasse überwiegend locker

aggregierte Flocken von bis zu 3 mm Durchmesser gebildet. Allerdings zeigten auch diese in Abhängigkeit von der Prozeßführung erhebliche strukturelle Unterschiede (vgl. Abschn. 7.3.3). Während beim Abbau von peroxidfreiem Abwasser nur lose Aggregationen verschiedener Organismen ohne erkennbare Struktur entstanden, zeigten die Biofilme bei simultaner Peroxidspaltung eine ausgeprägte Struktur mit dichten mikrobiellen Konsortien und zahlreichen Zwischenräumen. Entsprechend wurden die höchste maximale Abbauleistung und auch die jeweils höchsten prozentualen Abbaugrade mit den lockeren Flocken bei sequentieller Prozeßführung erreicht, während mit den stärker strukturierten Systemen jeweils geringfügig aber signifikant geringere Leistungen erzielt wurden.

7.3.3 Änderungen der Biofilmstruktur unter dem Einfluß eines toxischen Substrates

Wie in Abschn. 7.3.2 gezeigt wurde, können z.B. organische Peroxide im Biofilmreaktor durch eine Kombination aus chemischer Peroxidspaltung und anschließendem biologischen Abbau vollständig mineralisiert werden. Dabei übernimmt der Biofilmträger gleichzeitig die Funktion eines Katalysators für den katalytischen ersten Reaktionsschritt. Bei der Realisierung eines solchen Prozesses kommt dem Biofilm eine besondere Rolle zu.

Da die organischen Peroxide, wie Untersuchungen sowohl im Labormaßstab [7. 57] wie auch in der technischen Anwendung [7. 56] belegen, sehr stark bakterientoxisch wirken, muß die Struktur des Biofilmes einerseits gewährleisten, daß das Substrat mit hoher Effektivität an den katalytischen Wirkort, den Biofilmträger transportiert werden kann. Gleichzeitig muß aber auch ein ausreichender Schutz der peroxidsensitiven Mikroorganismen vor der Wirkung der toxischen Substrate vorhanden sein. Eine solche zweifache Funktion stellt hohe Anforderungen an die Organisation der Biofilmstruktur.

Anhand des phasenkontrastmikroskopischen Bildes erscheint der Biofilm zumindest bei Verwendung von Pulveraktivkohle äußerlich als ein um den Träger geschlossenes Gebilde. Lediglich die granulierten Aktivkohle wies in Oberflächenbereichen, die stark in den Raum hinausragten, keinen oder nur einen sehr geringen Bewuchs auf.

Erst bei Verwendung der Fluoreszenzfärbung wird sichtbar, daß die mikrobiellen Aggregate eine ausgeprägte Struktur aufweisen, die in Abhängigkeit von den gewählten Prozeßbedingungen einer erheblichen Variation unterliegt. Wenig ausgeprägt war diese Struktur in den Belebtschlammflocken bei sequentieller Prozeßführung (Abbildung 7.31A). Die Flocken stellten lediglich lose Aggregate dar, die von den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen DAPI und Sytox Green innerhalb von maximal 10 min vollständig

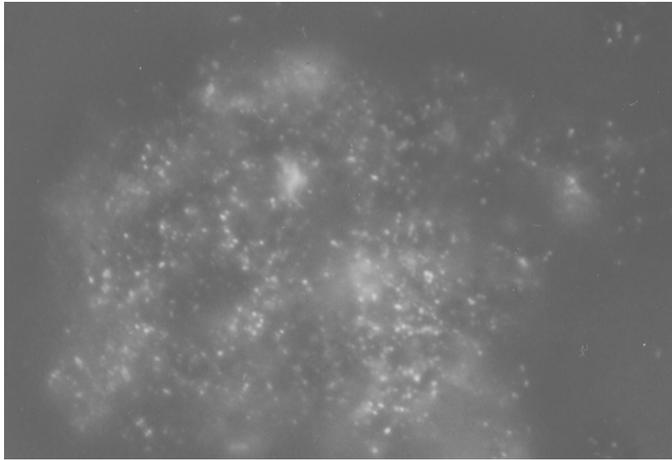
durchdrungen werden konnten. Dabei zeigte die überwiegende Mehrzahl der vorhandenen Bakterien die blaue Färbung vitaler Organismen. Ein völlig anderes Bild ergab sich hingegen, wenn die entsprechenden Reaktoren mit peroxidhaltigem Abwasser versorgt wurden.

Das Epifluoreszenzbild zeigte unter diesen Bedingungen deutlich ausgeprägte Zellcluster, die von einer optisch dicht erscheinenden Matrix umgeben werden (Abbildung 7.31B). Weitere Untersuchungen zeigten, daß die Mehrzahl der vitalen Zellcluster in tieferen Biofilmschichten angeordnet war, während die wenigen Organismen an der unmittelbaren äußeren Oberfläche häufig eine Schädigung der Zellintegrität aufwiesen (in Abbildung 7.31B an der grünen Fluoreszenzfärbung erkennbar). Der Transport der Fluoreszenzfarbstoffe erfolgte in diesen Biofilmen nur sehr langsam. Bis zu 24 h waren notwendig, um eine ausreichende Markierung auch tieferer Schichten des Biofilmes zu erzielen [7. 57]. Die Negativfärbung mit Oregon Green (2',7'-Difluoro-Fluoreszin) zeigt hingegen, daß die Biofilmmatrix kein geschlossenes Gel darstellte, sondern ein dichtes Netz leicht permeabler Kanäle aufwies, in die der Farbstoff bereits innerhalb weniger Minuten vordringen konnte (Abbildung 7.31C). Ebenso wie der Fluoreszenzfarbstoff können in diesen Kanälen auch Substrate mit vergleichsweise hoher Geschwindigkeit transportiert werden.

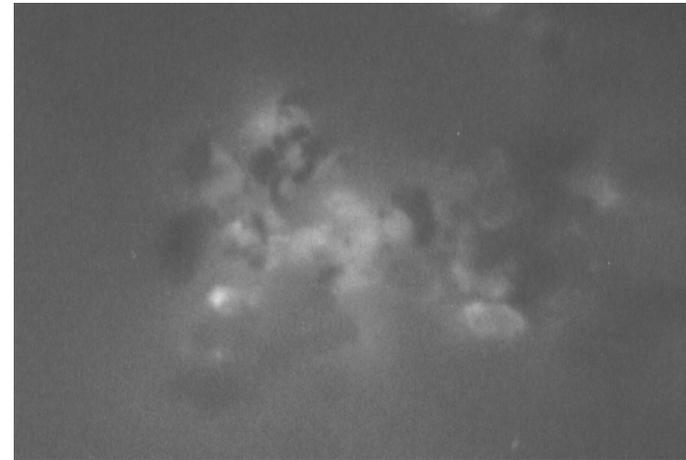
Daß die Biofilmstruktur wesentlich durch die Wirkung der toxischen Peroxide geprägt wird, verdeutlicht Abbildung 7.31D. Die Abbildung zeigt die Struktur des Biofilmes aus Abbildung 7.31B 8 Tage, nachdem die vorhandenen Peroxide durch katalytische Vorbehandlung aus dem Substrat entfernt worden waren. Dabei wird deutlich, daß in dieser Zeit erhebliche Veränderungen in der Biofilmstruktur stattgefunden haben. Das Fluoreszenzbild zeigt ausgeprägte Zellcluster auch in den äußeren Schichten der Biofilmmatrix. Gleichzeitig verringerten sich die optische Dichte der Biofilmmatrix und der Diffusionswiderstand erheblich. Die jetzt vorhandenen Biofilme wurden von den verwendeten Fluoreszenzfarbstoffen innerhalb von ca. 2 h vollständig penetriert.

Der deutliche Einfluß des CHP auf die Struktur der Biofilmmatrix ist nicht nur visuell erkennbar, sondern er spiegelte sich auch in quantitativen Parametern, wie der meßbaren Dichte des Biofilmes und im Neutralzuckergehalt der Biomasse wieder. Während die Biomasse aus Belebtschlammflocken ohne Peroxideinfluß nur einen Trockenmasseanteil von ca. 10 % aufwies, lag dieser für Biomasse, die von der granulierten Aktivkohle isoliert wurde bei bis zu 55 %. Wie zusätzliche Batchexperimente (Durchführung vgl. Anhang A.1.f, S.iii) zeigten, löste die Anwesenheit von CHP bei den Mikroorganismen vor allem eine verstärkte Produktion von Polysacchariden aus, die dann eine ausgeprägte extraplastidäre Matrix bildeten. Jedoch auch der Gehalt an frei in der flüssigen Phase gelösten Neutralzuckern nahm merklich zu.

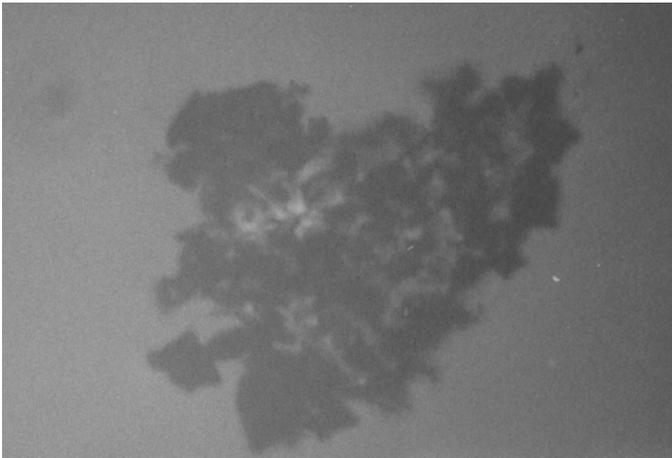
A.



B.



C.



D.

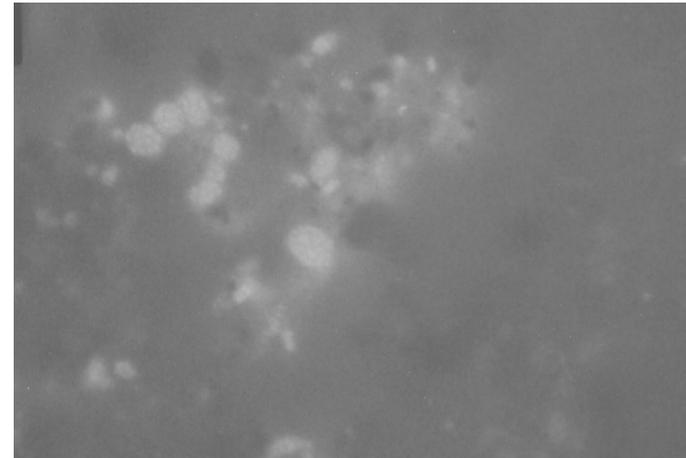


Abbildung 7.31: Epifluoreszenzbild von Belebtschlammflocken und Biofilmen unter den Einfluß unterschiedlicher Peroxidkonzentrationen.
A: Belebtschlammflocke bei sequenzieller Prozeßführung, d.h. ohne direkte Einwirkung von Peroxiden (Färbung DAPI/Sytox Green)
B: Belebtschlammflocke bei simultaner Peroxidspaltung mit Pulveraktivkohle ((Färbung DAPI/Sytox Green)
C: Negativfärbung einer Belebtschlammflocke aus dem selben Reaktor wie B (Färbung Oregon Green)
D: Belebtschlammflocke aus dem selben Reaktor wie B, jedoch 8 Tage nachdem Peroxide aus dem Zulauf entfernt wurden (Färbung DAPI/Sytox Green)

Der Anstieg des Polysaccharidgehaltes in den Belebtschlammflocken war bereits 2 bis 4 h nach Zusatz der Peroxide meßbar und erfolgte in Abhängigkeit von der CHP-Konzentration. Bereits eine Konzentration von 1 mg/l CHP führte bei den verwendeten Organismen zu einer Verdopplung des Neutralzuckergehaltes (Abbildung 7.32). Höhere Konzentration bewirkten sowohl einen schnelleren Anstieg, wie auch höhere Gehalte. CHP in zellschädigenden Konzentrationen führte hingegen erwartungsgemäß zu einer Verlangsamung der Polysaccharidproduktion. Dies weist darauf hin, daß die Bildung der Polysaccharide durch aktive mikrobielle Prozesse erfolgt, und nicht als Folge einer Zellschädigung anzusehen ist.

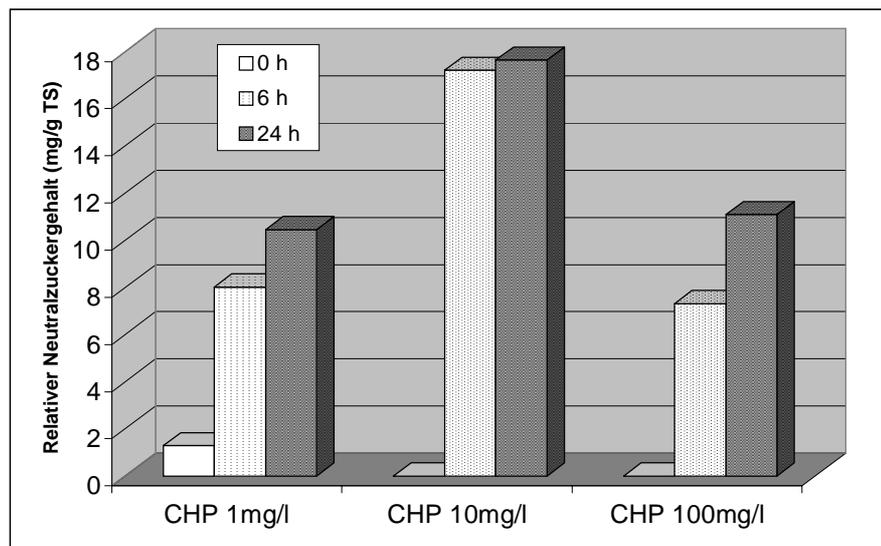


Abbildung 7.32: Änderung des Neutralzuckergehaltes von Belebtschlammflocken nach Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen von CHP. Dargestellt wird der relative Gehalt gegenüber einer CHP- freien Kontrolle.

Die dargestellten Ergebnisse stimmen mit Resultaten anderer Autoren überein, die gleichfalls einen Zusammenhang zwischen der Biofilmarchitektur und dem Substratangebot feststellten. So beschreiben Wolfaardt et al. [7. 85], sowie Møller et al. [7. 59] für unterschiedliche Herbizide wesentlich stärker ausgeprägte Biofilmstrukturen, als diese bei Verwertung leichter abbaubarer Substanzen festgestellt wurden. De Beer et al. [7. 12] fanden für die Wirkung von freiem Chlor darüber hinaus einen deutlichen Zusammenhang zwischen der Penetration des Biofilmes und der Desinfektionswirkung. Die erhöhte Resistenz der Biofilmkonsortien konnte für diesen Fall auf eine verminderte Diffusionsgeschwindigkeit zurückgeführt werden.

Die erzielten Resultate lassen zusammenfassend folgende Schlußfolgerungen zu:

1. Die Elimination persistenter Verbindungen, die gleichfalls stark bakterientoxische Eigenschaften aufweisen, ist mit Hilfe von Biofilmen unter Verwendung katalytisch

aktiver Träger prinzipiell möglich. Die Spaltung des toxischen Primärsubstrates erfolgt dabei durch chemische Prozesse an der Trägeroberfläche. Eine Akkumulation des toxischen Primärsubstrates kann durch entsprechende Optimierung des Verhältnisses von organischer Fracht und Trägermenge weitgehend verhindert werden. Limitierend für den Gesamtprozeß ist dann der mikrobielle Abbau der Produkte aus dem ersten katalytischen Schritt.

2. Bei der Kombination chemisch-katalytischer und biologischer Wirkmechanismen mittels Biofilmtechnologie kommt der Struktur des Biofilmes eine wichtige Rolle zu. Durch eine ausgeprägte Architektur kann der Biofilm einen sehr effektiven Stofftransport zum Träger hin gewährleisten. Die dabei gemessenen Transportleistungen sind nur durch einen konvektiven Transport erklärbar, für den vor allem ein ausgeprägtes Netz gut permeabler Kanäle in Frage kommt. Die prinzipielle Möglichkeit eines konvektiven Transportes in Biofilmen wurde bereits von anderen Autoren gezeigt [7. 13]. Gleichzeitig bietet der Biofilm durch seine Struktur einen ausreichenden Schutz der mikrobiellen Konsortien, die im vorliegenden Fall selbst sensitiv gegenüber dem toxischen Substrat blieben.

7.4 Eliminierung von Substanzen mit geringer Bioverfügbarkeit

Der biologische Abbau organischer Verbindungen wird von einer Reihe unterschiedlicher Faktoren beeinflusst. Ein wesentlicher Faktor ist das Vorhandensein von Organismen, die zum Abbau der jeweiligen Substrate befähigt sind. Eine zweite wesentliche Voraussetzung besteht in der Gewährleistung einer ausreichenden Bioverfügbarkeit. Die Ursachen für eine verminderte Bioverfügbarkeit sind vielfältig. In den meisten Fällen besteht aber ein enger Zusammenhang mit einer geringen Wasserlöslichkeit der betreffenden Substanzen. Hydrophobe Verbindungen, z.B. Kohlenwasserstoffe oder viele Lösungsmittel bilden mit Wasser Phasen oder Emulsionen. Die Abbaugeschwindigkeit wird dann häufig von der für den mikrobiellen Angriff verfügbaren Oberfläche bestimmt. So werden z.B. Mineralölkohlenwasserstoffe durch Mikroorganismen relativ gut abgebaut, sofern eine ausreichende Verteilung der Verbindungen in Wasser gewährleistet werden kann. Durch Zusätze oberflächenaktiver Substanzen können in stabilen Emulsionen auch solche Verbindungen eingeschlossen werden, die selbst eine gute Bioverfügbarkeit aufweisen. Andere Verbindungen bilden Aggregate oder kristalline Ablagerungen. Häufig entsteht eine geringe Bioverfügbarkeit auch durch Adsorption der Verbindungen an Oberflächen oder gar in Porenräumen, die für Mikroorganismen nicht zugänglich sind.

Entsprechend den unterschiedlichen Ursachen für eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit werden verschiedene Verfahren für die Steigerung der biologischen Abbaubarkeit eingesetzt. Dazu gehört z.B. der Einsatz oberflächenaktiver Substanzen für die Mobilisierung von Ablagerungen oder adsorptiv gebundener Verbindungen [7. 82]. Stabile Emulsionen können durch Zusätze von Flockungsmitteln gespalten werden [7. 1]. Auch der Eintrag mechanischer Energie durch intensive Durchmischung oder mittels Ultraschall kann zu einer Mobilisierung schlecht bioverfügbarer Verbindungen beitragen [7. 27, 7. 65]. Die Ergebnisse der einzelnen Maßnahmen sind recht unterschiedlich und von der jeweiligen Situation abhängig. In einigen Fällen kann auch der Einsatz oberflächenimmobilisierter Organismen eine angemessene Lösung darstellen [7. 48].

7.4.1. Abbau organischer Verbindungen aus stabilen Emulsionen

Emulsionen finden in den verschiedensten Bereichen der Industrie, vor allem als Kühl- und Schmierstoffe breite Anwendung. Nach Gebrauch erfolgt üblicherweise eine Spaltung dieser Emulsionen mit verschiedenen physikalisch-chemischen Methoden [7. 1, 7. 23, 7. 65], wobei die anfallenden Produkte einer Wiederverwertung oder Entsorgung zugeführt werden. Zunehmende Qualitätsansprüche beim Gebrauch führen jedoch zu einer Entwicklung immer stabilerer Emulsionen, die teils nur noch unvollständig gespalten werden können. Solche sehr stabilen Restemulsionen gelangen dann in den Ablauf der chemisch-physikalischen Behandlungsanlagen und müssen durch geeignete Verfahren mineralisiert werden. Wie unsere Untersuchungen mit Abwässern aus unterschiedlichen Emulsionsspaltanlagen belegen, sind dafür neben verschiedenen Kombinationen der biologischen Behandlung mit physikalischen oder chemischen Verfahren [7. 49] auch Biofilntechnologien prinzipiell [7. 48] geeignet.

Für ein ausgewähltes repräsentatives Abwasser mit einem TOC-Gehalt von 2 600 mg/l wurde in Batchexperimenten ein maximaler Abbaugrad von ca. 63 % ermittelt. Dieser konnte auch durch den Zusatz von Pulverkohle nicht signifikant erhöht werden. Lediglich die Abbaugeschwindigkeit stieg geringfügig an [7. 48]. Wesentlich andere Ergebnisse wurden jedoch erzielt, wenn der Abbau in kontinuierlichen Langzeitversuchen realisiert wurde. Für diese Versuche kam eine zweistufige Versuchsanlage mit suspendierter Biomasse zum Einsatz. Eine detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus wird in [7. 48] gegeben. In dieser Versuchsanlage wurde die vorhandene organische Fracht in der ersten Stufe zu etwa 60% abgebaut. Dieser Abbaugrad blieb bis zu einer Belastung von 4000 mg/l*d nahezu unverändert, was auf eine schwer abbaubare Restkontamination

hinweist. Durch Verwendung einer zweiten Stufe erhöhte sich der erzielbare Abbaugrad auf 70 %.

Obwohl anhand der Batchversuche nicht zu erwarten, gelang eine wesentliche Verbesserung des biologischen Abbaus in diesem System durch den Zusatz von Pulveraktivkohle in der zweiten Behandlungsstufe (Abbildung 7.33). Bereits ein Gehalt von 0,1 % bewirkte eine Erhöhung des erzielbaren Abbaugrades von 70 % auf 78 %, mit 1 % Pulverkohlezusatz wurde ein Abbaugrad von 96 % erzielt. Eine weitere Erhöhung des Aktivkohleanteiles bewirkte jedoch in diesen Versuchen einen Rückgang des Abbaugrades auf 84 %. Dies verdeutlicht, daß die Änderungen des Abbaugrades nicht durch Adsorption erklärt werden können. Tatsächlich war auch der Anteil nachweisbarer organischer Verbindungen in den Biofilmpartikeln nur gering und für den Gesamtprozeß vernachlässigbar. Auch eine Verringerung der mengenproportionalen Aktivkohlezugabe zum Ausgleich für den abgetrennten Überschußschlamm von zunächst 200 mg/l Zulaufvolumen auf 100 mg/l und schließlich auf 50 mg/l zeigte keine Auswirkungen auf den erzielbaren Abbaugrad.

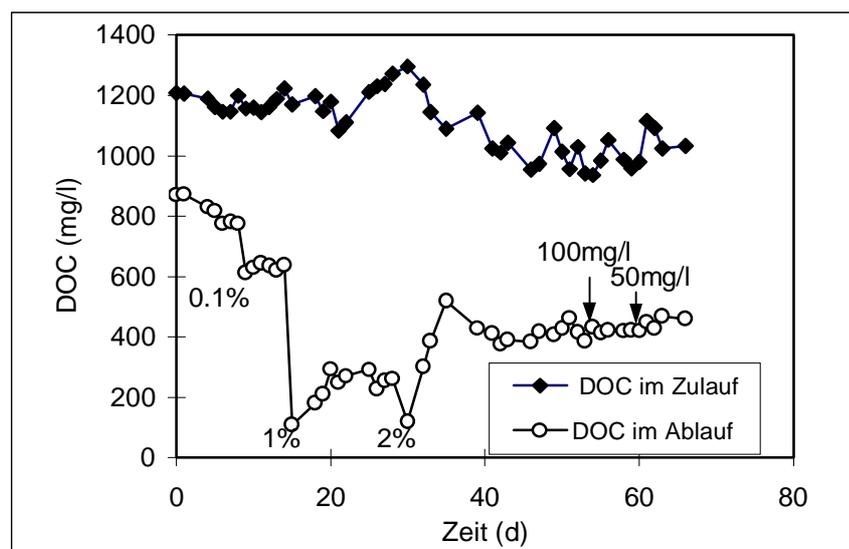


Abbildung 7.33: Einfluß von Pulveraktivkohle auf den biologischen Abbau der organischen Inhaltsstoffe aus Abwasser einer Emulsionsspaltanlage in der zweiten Stufe der biologischen Behandlung. Der Anteil an Pulverkohle im System zu den entsprechenden Versuchsphasen ist in % angegeben. Bis zum 55. Versuchstag wurde der Überschußschlamm-austrag durch Zugabe von Aktivkohle WPX (200 mg/l Zulaufvolumen) ausgeglichen. Danach wurde die Zugabe auf 100 mg/l bzw. 50 mg/l reduziert [7. 48].

Die Wirkungsmechanismen, die dieser erheblichen Leistungssteigerung zugrunde liegen, können bisher nicht eindeutig bestimmt werden. Möglich sind jedoch Wechselwirkungen der bifunktionalen emulsionsbildenden Verbindungen mit funktionalen Zentren der

Biofilmmatrix. Aus diesen Wechselwirkungen können erhebliche Änderungen in den Obeflächeneigenschaften der emulgierten Substanzen resultieren, die z.B. die Verringerung der Oberflächenladung zur Folge haben. Auch Änderungen der molekularen Zusammensetzung von Emulsionen durch Umorientierung einzelner Moleküle ist denkbar. Durch derartige Wechselwirkungen kann die Integrität micellarer Strukturen erheblich beeinträchtigt und damit die Bioverfügbarkeit der abzubauenen Substanzen deutlich erhöht werden. Aus den bisher vorliegenden Ergebnissen wird jedoch deutlich, daß für die Erhöhung der Bioverfügbarkeit ein ausreichender Eintrag mechanischer Energie erforderlich ist. Ein einfacher Kontakt mit Biofilmoberflächen, wie dies z.B. im Festbett erfolgt, genügt offensichtlich nicht [7. 48]. Dies weist auf eine Beteiligung von intensiven Stoffaustauschprozessen an der Verbesserung der Abbaubarkeit hin.

7.4.2 Einsatz immobilisierter Mikroorganismen zur Leistungssteigerung bei der Bodenwäsche

Viele Böden sind infolge jahrzehntelanger industrieller Nutzung oder auch infolge von Unglücksfällen mit organischen Schadstoffen belastet. Für die Reinigung solcher Böden stehen verschiedene Verfahren zur Verfügung, die auf thermischen (Verbrennung, Entgasung), physiko-chemischen (Extraktion, Bodenwäsche) oder auch biologischen Wirkprinzipien (Mieten, Bioreaktoren) beruhen. Dabei wird die Leistungsfähigkeit biotechnologischer Verfahren in vielen Fällen durch die Bioverfügbarkeit der Schadstoffe limitiert, die kapillar oder adsorptiv an den Bodenpartikeln gebunden oder infolge zu geringer Wasserlöslichkeit in aggregierter Form vorliegen.

Die Bodenwäsche gehört aufgrund der erzielbaren Reinigungsleistung und vergleichsweise einfacher technischer Anforderungen zu den häufig verwendeten Sanierungsverfahren für Böden. Bei diesem Verfahren werden gebundene Schadstoffe durch den Eintrag mechanischer Energie von der Bodenmatrix getrennt und je nach ihren physiko-chemischen Eigenschaften in der Waschflüssigkeit und vor allem in der Feinkornfraktion, dem sogenannten Schluff, angereichert. Der Hauptanteil des Bodens kann am Ende des Prozesses wieder verwertet werden. Der hochkontaminierte Schluff muß jedoch einer meist teuren Entsorgung als Sonderabfall zugeführt werden. Deshalb wird eine Bodenwäsche üblicherweise nur bis zu einem Feinkornanteil (<63 µm) von ca. 25 % eingesetzt.

In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, das kontaminierte Feinkornmaterial in einem Folgeprozeß zu reinigen [7. 6, 7. 27, 7. 35, 7. 67, 7. 71]. Dazu wurden vor allem extraktive und biologische Verfahren eingesetzt. Die Erfolge waren jedoch auch bei Verwendung von spezialisierten Mikroorganismen oder verschiedenen

Tensidzusätzen großen Schwankungen unterworfen [7. 6, 7. 26, 7. 35]. Ein wesentliches Problem bestand dabei in der unzureichenden Bioverfügbarkeit besonders von hydrophoben Verbindungen, wie PAH und Teerölen. Diese Verbindungen werden in den ausgeprägten Feinporenräumen der Tonminerale sehr fest adsorbiert und sind dem mikrobiellen Abbau dann nicht mehr zugänglich.

Ziel unserer Untersuchungen war es daher, die zu eliminierenden Schadstoffe bereits während des Waschprozesses in eine bioverfügbare Form zu überführen, um sie in einem nachfolgenden Schritt mikrobiell zu mineralisieren. Diese Zielstellung konnte mit relativ geringem Aufwand durch kombinierte adsorptiv biologische Behandlung erreicht werden. Dabei wurden auf sogenannten „bioadsorptiven Carriern“ [7. 50] Mikroorganismen gezielt an das jeweilige Schadstoffspektrum adaptiert. Dafür kann sowohl das bei der Bodenwäsche anfallende unbehandelte Waschwasser oder aber auch ein synthetisches Nährmedium verwendet werden. Die bewachsenen Carrier wurden dann dem kontaminierten Boden zugesetzt und in den Waschprozeß einbezogen. Während bei der konventionellen Bodenwäsche die zu eliminierenden Schadstoffe ausschließlich zwischen der groben Bodenfraktion und dem Feinkorn verteilt werden, wurden in unseren Versuchen erhebliche Anteile adsorptiv an den Carriern gebunden. Eine charakteristische Verteilung von PAH vor und nach einer entsprechenden Bodenbehandlung ist in Abbildung 7.34 wiedergegeben.

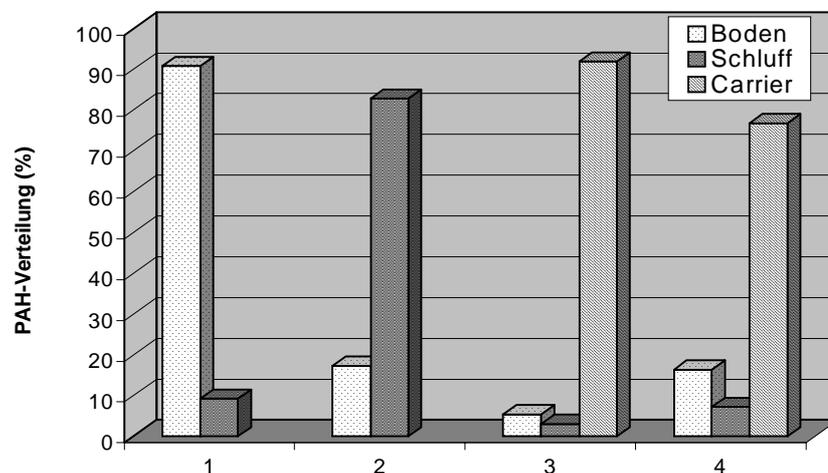


Abbildung 7.34: Eliminierung von PAH aus einem realen kontaminierten Boden während der Bodenwäsche (Laborsimulation) [7. 55]. Verteilung von PAH (Summe 16 PAH nach EPA) zwischen Grobkorn, Schluff und Biofilmcarriern .
 1.: unbehandelter Boden
 2.: behandelter Boden ohne Carrier
 3.: behandelter Boden mit Polyurethancarrier
 4.: behandelter Boden mit modifiziertem Polyurethancarrier

Wie Abbildung 7.34 verdeutlicht, kann die Verteilung der PAH während der Bodenwäsche durch den Carrier wesentlich beeinflusst werden. Dabei kommt der Struktur der verwendeten Carrier eine herausragende Rolle zu. Diese sollten einerseits eine hohe Adsorptionskraft besitzen, andererseits müssen die gebundenen Schadstoffe aber für die Mikroorganismen gut verfügbar bleiben. Dazu ist neben den entsprechenden physikochemischen Oberflächeneigenschaften auch eine möglichst große mikrobiell verfügbare Oberfläche erforderlich. Im Falle der Bindung von PAH waren vor allem hydrophobe Materialien, wie Polyurethan oder Polyethylen geeignet. Mit diesen Materialien konnten ca. 90 % der vorhandenen PAH-Fracht gebunden werden. Damit wurde der Übergang der Verbindungen auf die eher hydrophilen Feinkornpartikel fast vollständig unterbunden. Zusätzlich erfolgte auch ein Übergang eines Teiles der bereits an den Feinkornpartikeln gebundenen Schadstoffe auf den Carrier. Allerdings erwiesen sich bei diesen Carriern die starken hydrophoben Wechselwirkungen als nachteilig für die mikrobielle Regeneration. Deshalb wurden für weitere Untersuchungen oberflächenmodifizierte offenporige Polyurethanträger verwendet. Mit diesen Materialien wurde zwar eine etwas geringere Adsorption der PAH erzielt (Abbildung 7.34/4), jedoch erfolgte auch hier keine signifikante Schadstoffanreicherung in der Schluff-Fraktion (Abbildung 7.35) und die adsorbierten Verbindungen wurden in der Regenerationsphase gut biologisch abgebaut.

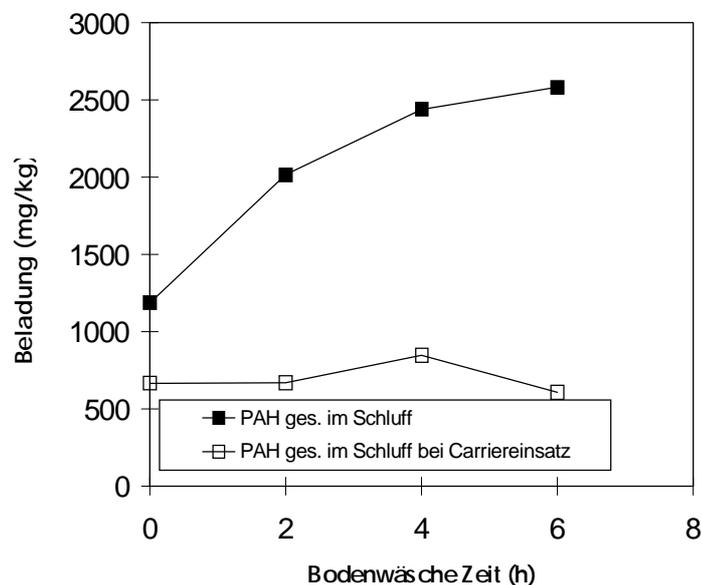


Abbildung 7.35: Einfluß von modifizierten Polyurethancarriern auf die Anreicherung von PAH (Summe 16 PAH nach EPA) in der Schluff-Fraktion während der Bodenwäsche [7. 55].

Da dem Boden bereits mit adaptierten Mikroorganismen bewachsene Träger zugesetzt wurden, setzte der Abbau der PAH in der Regenerationsphase ohne nennenswerte lag-Phase mit hoher Effizienz ein. Der Abbauprozess ließ sich dabei mit guter Näherung durch eine Funktion erster Ordnung beschreiben (Abbildung 7.36).

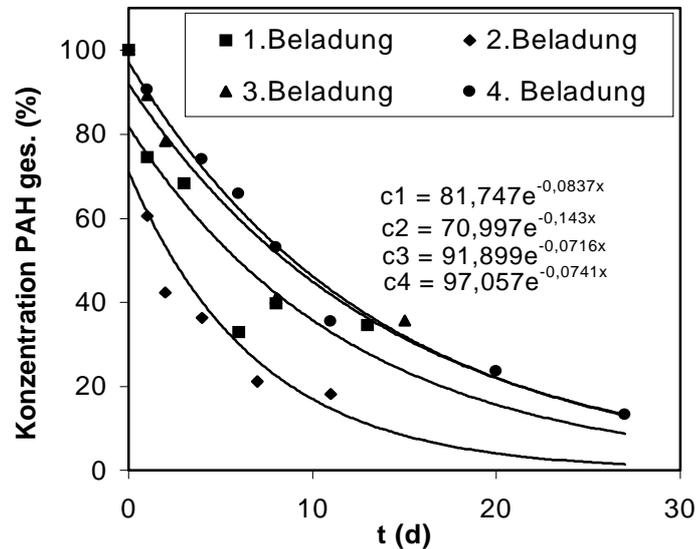


Abbildung 7.36: Abbaugeschwindigkeiten von PAH (Summe 16 PAH nach EPA) bei mehrmaliger Beladung von modifizierten Polyurethanträgern. Die erneute Beladung der Träger erfolgte jeweils nach Erreichen eines konstanten Restgehaltes [7. 55].

Die erzielten Abbauraten waren bei Verwendung von modifiziertem Polyurethan bis zu einer Anfangsbeladung von 6000 mg/kg Träger nahezu konstant und die regenerierten Träger konnten ohne nachteilige Wirkungen mehrfach für den Waschprozeß eingesetzt werden. Die erreichte PAH-Adsorption war dabei sogar geringfügig höher als beim erstmaligen Einsatz der Carrier und die erzielten Abbauraten blieben über mindestens 4 Regenerationszyklen nahezu unverändert (Abbildung 7.36).

Während des Einsatzes in Bodenwaschanlagen werden die bioadsorptiven Carrier erheblichen mechanischen Belastungen ausgesetzt. Deshalb ist neben den adsorptiven und biotechnologischen Eigenschaften für diesen Zweck auch die mechanische Stabilität der verwendeten Materialien zu berücksichtigen. Auch in dieser Hinsicht zeigten die optimierten Polyurethanträger gute Resultate. In technischen Versuchen wurden kaum mechanische Schäden an den verwendeten Trägern festgestellt.

Die prinzipielle Eignung des Verfahrens für die Optimierung von Bodenwaschprozessen konnte bereits in ersten technischen Versuchen bei der Behandlung stark phenolhaltiger Böden gezeigt werden.

7.5 Eliminierung von Umweltschadstoffen aus schwermetallbelasteten Abwässern durch die Kombination von biologischem Abbau und Biosorption

In vielen Bereichen der industriellen Produktion, aber auch bei der Sanierung kontaminierter Böden der entsprechenden Industriestandorte fallen organisch belastete Abwässer an, die zusätzlich unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Schwermetalle enthalten. Zu den charakteristischen Industriezweigen gehören u.a. die chemische und pharmazeutische Industrie, die Farbenherstellung und die Herstellung von Sprengstoffen. Die Eliminierung der Schwermetalle erfolgt üblicherweise durch chemische und physikalische Wirkmechanismen, wie Fällung/Flockung, Ionenaustausch, Elektrolyse, Flottation, Adsorption oder Membranverfahren (Umkehrosmose, Elektrodialyse, Flüssigmembranpermeation) [7. 4]. Mit abnehmender Konzentration und zunehmender organischer Belastung steigen die notwendigen Aufwendungen für diese Verfahren jedoch erheblich an. Deshalb wird auch die Biosorption als mögliche Alternative seit vielen Jahren intensiv untersucht.

Die Fähigkeit mikrobieller Biomassen, aus wässrigen Medien Schwermetalle in teils hohen Konzentrationen anzureichern, ohne dabei größeren Schaden zu nehmen, ist seit vielen Jahren bekannt. Dieser Fähigkeit können sowohl aktive [7. 22], wie auch passive Mechanismen [7. 60, 7. 69, 7. 73] zugrunde liegen. Bei der passiven Biosorption spielen neben Adsorption, Komplexbildung, passiven Transportvorgängen und Metallsalzausfällungen an der Zellwand vor allem Ionenaustauschprozesse mit H^+ , Mg^{2+} oder Ca^{2+} eine bedeutende Rolle [7. 22]. Als Bindungsstellen kommen dabei Carboxyl-, Phosphat-, Sulfhydryl-, Amino- und Hydroxylgruppen in Betracht.

Während bei der Anreicherung und Gewinnung von Edelmetallen häufig auf die hohe Spezifität aktiver Biosorptionsprozesse gesetzt wird, kommen bei der Entgiftung von Abwässern vor allem passive Prozesse zum Einsatz. Da Schwermetalle in hohen Konzentrationen aufgrund ihrer toxischen Wirkungen üblicherweise die biologische Aktivität und das mikrobielle Wachstum behindern, verwenden technische Biosorber dabei meist ruhende, d. h. tote oder inaktive Zellen, deren Wirkung ausschließlich auf der passiven Biosorption beruht [7. 60, 7. 69]. Ein Abbau organischer Verbindungen ist dabei nicht vorgesehen oder von untergeordneter Bedeutung. Ein solches Verfahren wird z.B. von der Fa. Linde unter dem Namen METEX^[R] angeboten.

Trotz guter Adsorptionsleistungen und nachgewiesener Standzeiten von z.T. mehreren Jahren [7. 60] sind für viele Anwendungsgebiete klassische Biosorber den physikalisch-chemischen Verfahren unterlegen [7. 69]. Deshalb werden verschiedene Anstrengungen unternommen, um neue hochaffine Mikroorganismen aufzufinden und zu charakterisieren [7. 22, 7. 69]. Aber auch solche leistungsstarken Biosorber bleiben normalerweise auf Anwendungen beschränkt, bei denen die Abwässer ausschließlich oder überwiegend durch anorganische Verbindungen belastet sind. Sollen neben den Schwermetallen auch größere Mengen organischer Inhaltsstoffe entfernt werden, so besitzen die meist verwendeten Schlammbettreaktoren erhebliche Nachteile. Im günstigsten Fall erfolgt unter den dabei verwendeten anaeroben Bedingungen keine Elimination der organischen Fracht. Aber auch eine anaerobe Zersetzung der wirksamen Biomasse ist möglich. Werden neben den Schwermetallen auch die organischen Verbindungen abgebaut, so tritt ein erheblicher Biomassezuwachs ein. Der entstehende Schlamm ist dann stark schwermetallbelastet, erreicht aber im Gegensatz zu inaktiver Biomasse kaum noch die erforderlichen Schwermetallgehalte, die für eine weitere Verwertung erforderlich sind.

Durch den Einsatz von Biofilmreaktoren könnten viele dieser dargestellten Probleme erheblich minimiert werden. Ein wesentlicher Vorteil besteht darin, daß im Biofilm verglichen mit reinen Schlammreaktoren ein höherer Anteil adsorptiv wirksamer Substanzen in Form der extrazellulären Matrix zur Verfügung steht. Gleichzeitig ist bekannt, daß Biofilmsysteme bei gleicher organischer Belastung ein erheblich geringeres Biomassewachstum aufweisen als vergleichbare Belebtschlammanlagen [7. 8]. Mit der vorhandenen Biomasse könnten demzufolge bei gleicher Schwermetallfracht höhere Anreicherungen erzielt werden. Schließlich besitzen Mikroorganismen in Biofilmen häufig eine herausragende Resistenz gegenüber toxischen Verbindungen [7. 21], so daß eine hinreichende Abbauleistung u.U. auch bei sehr hohen Schwermetallkonzentrationen zu erzielen wäre. Als nachteilig in einem solchen Prozeß war zu erwarten, daß die Biomasseentwicklung wesentlich durch Menge und Zusammensetzung der organischen Fracht geprägt wird. Eine Optimierung des Systems in Bezug auf die Biosorption der Schwermetalle ist dabei kaum möglich. Lediglich durch die Wahl des Biofilmträgers kann begrenzt auf das Adsorptionsvermögen des Gesamtsystems Einfluß genommen werden.

Die erzielbaren Leistungen von Biofilmreaktoren hinsichtlich der simultanen Elimination von organischen Verbindungen und Schwermetallen wurde in Laborversuchen für ausgewählte Modellsubstrate ermittelt. Dabei kam der Wechselwirkung von Biosorption und dem gleichzeitig ablaufenden Abbau organischer Verbindungen eine besondere Beachtung zu.

Die erzielten Resultate mit verschiedenen Schwermetallen und einem organischen Modellsubstrat zeigten dabei eine starke Abhängigkeit der erreichbaren Leistungen sowohl von der Art der zu eliminierenden Schwermetalle, wie auch von der Struktur der verwendeten Trägermaterialien [7. 18, 7. 28].

Abbildung 7.37 zeigt das Adsorptionsverhalten von zwei ausgewählten Trägern für die Schwermetalle Blei und Kupfer. Beide Materialien hatten nur eine begrenzte Adsorptionskapazität für die untersuchten Schwermetalle. Diese lag jedoch bei dem verwendeten Adsorberpolymer WOFATIT bei sonst vergleichbarem Adsorptionsverhalten nahezu doppelt so hoch, als bei dem zweiten Träger Anthrazit H, einem Kohleprodukt.

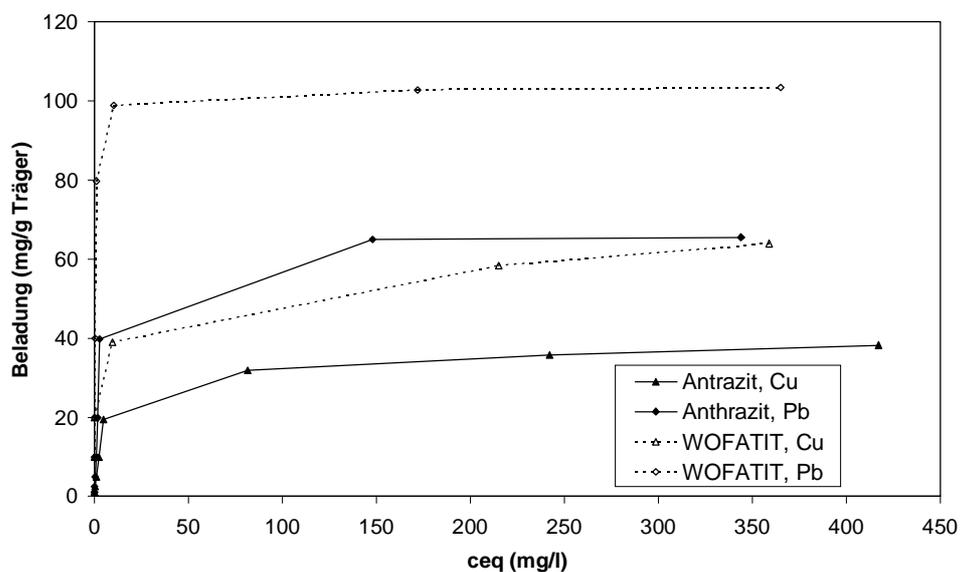


Abbildung 7.37: Adsorptionsverhalten von Blei und Kupfer (als Blei(II)sulfat bzw. Kupfer (II)sulfat) an zwei ausgewählten Trägermaterialien

Beide Materialien wurden als Träger in kontinuierlich betriebenen Biofilmreaktoren eingesetzt. Die erzielbaren Leistungen wurden mit denen eines baugleichen Reaktors unter Verwendung suspendierter Biomasse verglichen. Wie der Vergleich der Konzentrationen im Zu- und Ablauf der jeweiligen Reaktoren (Abbildung 7.38) verdeutlicht, wurde Blei (als Pb^{2+}) sowohl von der suspendierten Biomasse wie auch durch das Biofilmkonsortium mit hoher Effizienz adsorptiv gebunden [7. 18]. Die dabei erreichten Eliminationsgrade lagen selbst für Zulaufkonzentrationen von 400 mg/l Pb (Raumbelastung $150 \text{ mgPb}^{2+}/\text{l}\cdot\text{d}$) bei $>98 \%$. Die vom Gesetzgeber häufig geforderten sehr geringen Ablaufkonzentrationen von $<0.5 \text{ mg/l}$ wurden jedoch nur für Zulaufkonzentrationen $< 50 \text{ mgPb/l}$ und Raumbelastungen von maximal $15 \text{ mgPb/l}\cdot\text{d}$ erreicht.

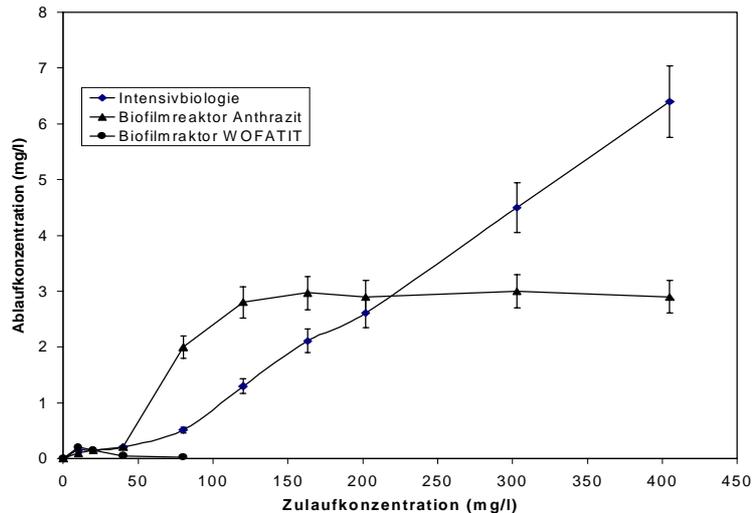


Abbildung 7.38: Verhältnis von Zu- und Ablaufkonzentration bei der Biosorption von Blei in kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren mit freier bzw. immobilisierter Biomasse [7. 18].

Eine signifikante Beeinträchtigung des CSB-Abbaus durch die Wirkung von Blei wurde für suspendierte Biomasse in der trägerfreien Kultur und bei Verwendung des Trägers Anthrazit selbst für die höchste verwendete Zulaufkonzentration (400 mgPb²⁺/l) und hohe CSB-Frachten nicht festgestellt. Selbst bei einer Raumbelastung von 3000 mgCSB/l*d lagen die erzielten Abbaugrade für CSB noch bei nahe 90 %.

Anders gestaltete sich das Prozeßverhalten bei Verwendung von WOFATIT als Trägermaterial. Wie Abbildung 7.38 verdeutlicht, wurden Bleikonzentrationen im Zulauf von bis zu 80 mg/l (Raumbelastung: 29 mgPb²⁺/l*d) nahezu vollständig adsorbiert. Jedoch wurde bereits bei dieser Zulaufkonzentration der CSB-Abbau zunehmend instabil, erhebliche Teile der Biomasse lösten sich von den Trägern ab und der Kohlenstoffabbau kam letztendlich vollständig zum Erliegen, so daß der Versuch abgebrochen werden mußte.

Die Wirkung der unterschiedlichen Trägermaterialien wird verständlich, wenn das Adsorptionsverhalten von Biomasse und Trägern in den verwendeten Reaktoren näher betrachtet wird. Bei Verwendung der suspendierten Biomasse stellte sich ein Gleichgewicht zwischen der Bleikonzentration im Medium und der in den Bioflocken ein. Dabei wurde eine maximale Bleikonzentration in der Biomasse von 97 g/kg BTS ermittelt [7. 18]. Da bei diesem Gehalt noch keine Schädigung der Mikroorganismen auftrat, sollten auch noch höhere Konzentrationen möglich sein.

In den Biofilmreaktoren kommt der Träger als zusätzliches Adsorbens hinzu. Wie Abbildung 7.39 zeigt, wurde Blei bis zu einer gewissen Beladungsgrenze des Trägers zu mehr als 90 % vom Trägermaterial aufgenommen. Erst danach wurden nennenswerte

Mengen des Schwermetalles durch die Mikroorganismen adsorbiert. Für Anthrazit wurde diese Beladungsgrenze des Trägers bei einer Gleichgewichtskonzentration von ca. $3 \text{ mgPb}^{2+}/\text{l}$ erreicht. Allerdings lag diese maximale Beladung bei lediglich $2,7 \text{ mg/g}$ Träger und somit nur bei 10% der erwarteten Beladung für den unbewachsenen Träger.

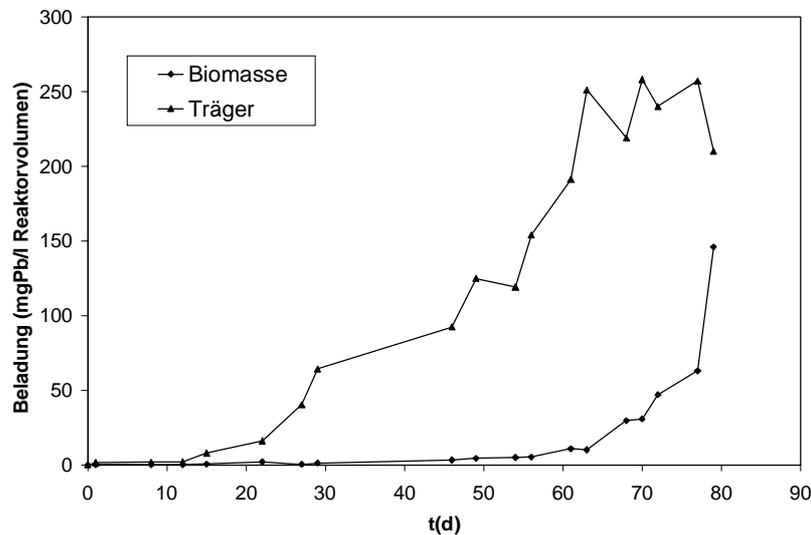


Abbildung 7.39: Adsorbierte Bleimengen von Träger und Biomasse bei kontinuierlicher Prozeßführung und Anthrazit H als Trägermaterial.

Die Wechselwirkung mit dem aufwachsenden Biofilm führte bei Anthrazit offensichtlich zu einer Einschränkung der Adsorptionsfähigkeit des Trägers für die Blei-Ionen. Die nachfolgende überwiegende Bindung des Schwermetalles in der Biofilmmatrix führte wie im Belebtschlammssystem zu keiner Beeinträchtigung der Abbauleistung.

Eine solche Einschränkung der Adsorption trat bei Verwendung des Trägers WOFATIT nicht ein, so daß relativ schnell Beladungen von mehr als 5 mg/g Träger erreicht wurden. Bei dieser Beladung wurde eine zunehmende Schädigung der Biomasse erkennbar, die letztlich zum Ausfall des gesamten Systems führte. Als Ursache dieses Verhaltens kommt eine Anreicherung toxischer Schwermetallkonzentrationen an der Grenzfläche zwischen Träger und Biofilm in Betracht, die dann zu Zellschäden und einer Ablösung des Biofilmes führte. Ähnliche Wirkungen des Trägers wurden bereits in Abschn. 7.1.3. für Arsenverbindungen beschrieben. Dies läßt den Schluß zu, daß bei simultaner adsorptiv-biologischer Behandlung das Adsorptionsverhalten des Trägers einer sehr sorgfältigen Optimierung bedarf. Diese kann nur für den jeweiligen Einzelfall erfolgen.

In Bezug auf die adsorptive Elimination des Schwermetalles Blei besitzt der Träger offensichtlich eine untergeordnete Bedeutung und diente in erster Linie als Aufwuchsmedium für den sich entwickelnden Biofilm. Eine hohe Adsorptionskapazität wirkt im Gegenteil eher nachteilig, weil dabei lokal toxische Konzentrationen erreicht

werden können. Vorteile des Biofilmes gegenüber frei suspendierter Biomasse hinsichtlich der Resistenz gegen die toxische Wirkung des Bleis waren nicht erkennbar, weil auch die suspendierten Organismen eine hinreichende Toleranz gegenüber dem Schwermetall aufwiesen.

Im Gegensatz zu den dargestellten Leistungen für Blei wurde Kupfer in den untersuchten Systemen mit deutlich geringerer Effizienz adsorbiert. Hier zeigte das verwendete Biofilmsystem mit Anthrazit als Träger hinsichtlich des erzielbaren Adsorptionsgrades auch deutliche Vorteile gegenüber frei suspendierter Biomasse (Abbildung 7.40).

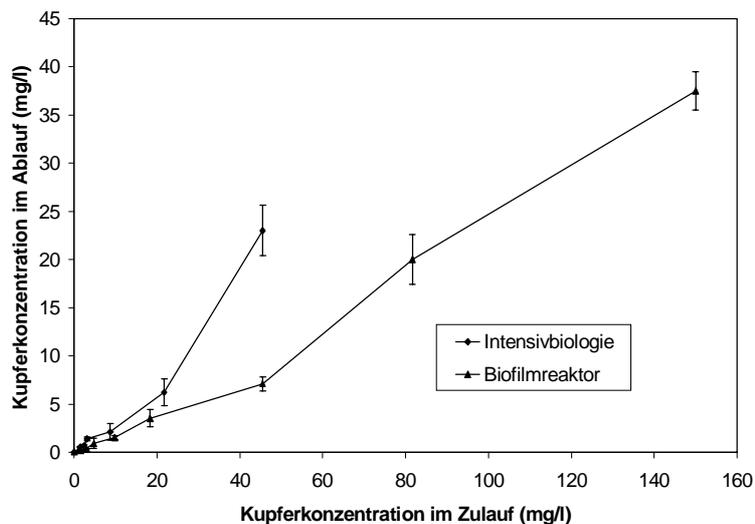


Abbildung 7.40: Verhältnis von Zu- und Ablaufkonzentration bei der Biosorption von Kupfer in kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren mit freier bzw. immobilisierter Biomasse [7. 28].

Von größerer Bedeutung ist jedoch das erzielte Prozeßverhalten in Bezug auf den Abbau der organischen Verbindungen. Der CSB-Abbau wurde bei Verwendung suspendierter Mikroorganismen bereits durch Kupferkonzentrationen von weniger als 1,5 mg/l signifikant beeinträchtigt. Eine Kupferkonzentration von 2,5 mg/l führte bei einer Raumbelastung für Kupfer von lediglich 0,9 mg/l*d bereits zu einer Verminderung der CSB-Abbauleistung von 12 % (Abbildung 7.41). Oberhalb von 25 mgCu/l*d erfolgte eine vollständige Hemmung des CSB-Abbaus. Im Gegensatz dazu wurde der Abbau organischer Verbindungen im Biofilmreaktor auch bei Kupferbelastungen von mehr als 50 mg/l*d nur geringfügig beeinträchtigt. Selbst bei einer Belastung von 60 mg/l*d (Kupferkonzentration im Zulauf 150 mg/l) verringerte sich die Abbauleistung für CSB nur um 10 % (Abbildung 7.41).

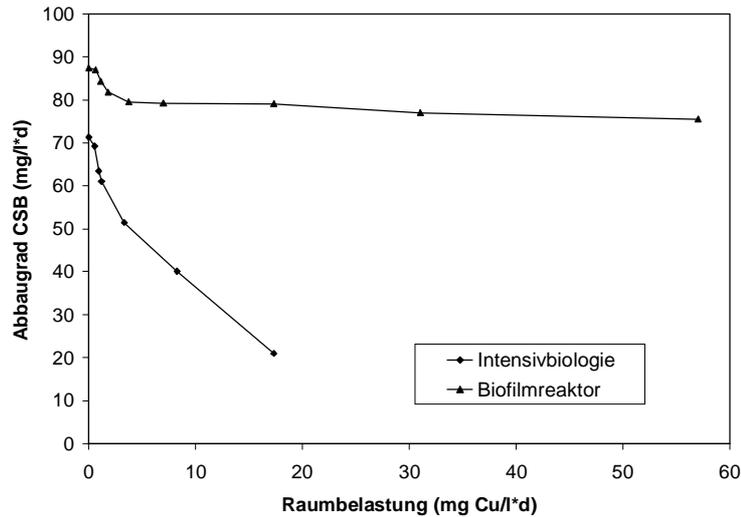


Abbildung 7.41: Einfluß der Kupfermenge in Zulauf auf den CSB-Abbau in kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren mit suspendierter bzw. oberflächenimmobilisierter Biomasse (Träger Anthrazit H).

Obwohl sich suspendierte Organismen und Biofilmkonsortien hinsichtlich ihrer Resistenz gegenüber dem Schwermetall erheblich unterscheiden, konnte für die entsprechenden isolierten Organismen ein solcher Unterschied nicht festgestellt werden. Wurden die Biofilmpopulationen von den Trägern abgetrennt und in Batchversuchen als Suspension kultiviert, so wurde eine Empfindlichkeit gegenüber Kupfer festgestellt, die mit der von Organismen aus dem Suspensionsreaktor nahezu identisch war (Abbildung 7.42).

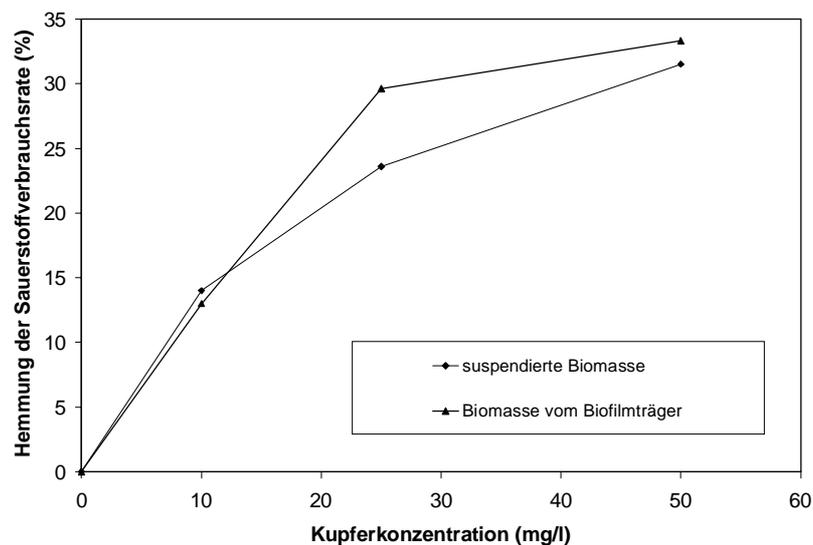


Abbildung 7.42: Hemmung der Stoffwechselaktivität von Organismen aus einem Suspensionsreaktor bzw. einem Biofilmreaktor durch Kupfer. Als Kontrolle diente die Sauerstoffverbrauchsrate einer kupferfreien Kultur [7. 28]

Die maximal erreichbare Akkumulation von Kupfer konnte in den kontinuierlichen Versuchen nicht ermittelt werden. Entsprechende Resultate aus Batchversuchen lassen jedoch Konzentrationen von bis zu 100 mg/gBTS erwarten [7. 28], was eine Wiederverwertung der akkumulierten Kupfermengen möglich erscheinen läßt.

Anhand der bisher vorliegenden Ergebnisse können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

1. Eine gleichzeitige Elimination von Schwermetallen und organischer Fracht mittels Biofilmtechnologie ist prinzipiell möglich. Deutliche Vorteile gegenüber Verfahren mit suspendierter Biomasse ergeben sich vor allem bei der Elimination stark toxischer Schwermetalle, wie z.B. Kupfer.
2. Bei entsprechend optimierter Prozeßführung lassen sich hohe Eliminationsgrade sowohl für die organische Fracht, wie auch für die Schwermetalle gewährleisten. Die Einhaltung der meist sehr niedrigen Grenzwerte für die Schwermetalle gelingt jedoch nur bei geringen Zulaufkonzentrationen (< 50 mg/l für Pb und < 3 mg/l für Cu)
3. Die erreichbaren Schwermetallgehalte in der Biomasse lassen eine Verwertung der angereicherten Metalle zu. Als limitierend für die Akkumulation erwies sich jedoch das Verhältnis von Schwermetallkonzentration und der Konzentration organischer Verbindungen. Mit zunehmender organischer Fracht erfolgt eine verstärkte Abscherung von Biofilmteilen. Der Aufwuchs von Biomasse limitiert damit den erzielbaren Schwemetallgehalt [7. 18]. Als untere Grenze für die CSB- und Metallfracht kann unter dem Aspekt einer verwertbaren Metallakkumulation ein Verhältnis von CSB- und Metallfracht von ca. 100:1 angesetzt werden, was die Einsetzbarkeit des Verfahrens in gewisser Weise begrenzt.

7.6 Einsatz von Biofilmtechnologien bei der biologischen Stickstoffelimination

Neben organisch gebundenem Kohlenstoff gehört Stickstoff zu den Hauptkomponenten in Abwässern kommunalen aber auch industriellen Ursprungs. Die Hauptfracht wird dabei in der Mehrzahl der Fälle durch den Eintrag von Ammonium verursacht.

Die Elimination von Ammonium erfolgt seit vielen Jahren erfolgreich auf biologischem Wege mittels Nitrifikation und Denitrifikation. Die dabei eingesetzten Verfahren gehören heute zum Stand der Technik. Dennoch besteht, nicht zuletzt vor dem Hintergrund neuer Erkenntnisse über die beteiligten mikrobiellen Stoffwechselreaktionen, ein wachsender Bedarf nach optimierten Technologien mit höheren Leistungen. Dabei sind die angestrebten Optimierungsziele für die einzelnen Reaktionen recht unterschiedlich.

Nitrifizierende Systeme sollten vor allem eine hohe Prozeßstabilität auch bei hoher CSB-Fracht und unter der Wirkung von bakterientoxischen Verbindungen gewährleisten. Gegenwärtig verwendete konventionelle Technologien mit suspendierter Biomasse gestatten auf Grund der erheblichen Unterschiede in den Wachstumsgeschwindigkeiten von autotrophen Nitrifikanten und heterotrophen Organismen meist nur geringe Raum-Zeit-Ausbeuten für organische Verbindungen [7. 1].

Denitrifizierende Systeme sind auf Grund der großen Vielfalt verfügbarer Denitrifizierer meist recht stabil. Für den Gesamtprozeß der N-Elimination eher nachteilig sind jedoch die für eine effektive Denitrifikation notwendigen anoxischen Bedingungen, die eine aufwendige räumliche Trennung dieses Prozesses von der aeroben Nitrifikation erforderlich machen. Im Labormaßstab sind bisher mehrere leistungsfähige Denitrifizierer mit höherer Sauerstofftoleranz beschrieben worden [7. 53, 7. 68]. Durch die Etablierung solcher Organismen in technischen Anlagen könnte eine erhebliche Verringerung des verfahrenstechnischen Aufwandes für den Gesamtprozeß erreicht werden. In solchen Systemen wäre dann auch eine gezielte Kombination von konventionellen Reaktionen der N-Elimination mit bisher wenig untersuchten Mechanismen, wie aerober Deammonifikation oder heterotropher Nitrifikation denkbar [7. 56].

7.6.1 Leistungen und Grenzen der biologischen Stickstoffelimination mit Biofilmverfahren

7.6.1.1 Die Nitrifikation

Das in vielen Abwässern anfallende Ammonium wird unter aeroben Bedingungen durch mikrobielle Oxidation in Nitrat überführt. Der dabei ablaufende Prozeß ist die Nitrifikation. Daran sind vor allem zwei Gruppen von Mikroorganismen (*Nitrosomonas*, *Nitrobacter*) beteiligt, die Ammonium zunächst in Nitrit (Gleichung 7.2) und in einem folgenden Schritt in Nitrat umwandeln (Gleichung 7.3).



Neben den bekannten C-autotrophen Nitrifizierern der Gruppen *Nitrosomonas* und *Nitrobacter* sind auch verschiedene heterotrophe Organismen, darunter wahrscheinlich alle Denitrifizierer zur Nitrifikation befähigt.

Obwohl die beschriebenen Nitrifikationsraten der heterotrophen Organismen allgemein 10^4 - bis 10^5 -fach niedriger liegen, als die der autotrophen Nitrifikanten, kann die heterotrophe Nitrifikation unter entsprechenden Bedingungen dennoch einen beachtlichen Beitrag zur Nitrifikationskapazität einer Belebtschlammpopulation leisten. Solche Bedingungen entstehen z.B. bei hohen C-Angeboten, niedrigen Sauerstoffkonzentrationen und geringem Schlammalter [7. 81], aber auch dann, wenn die autotrophe Nitrifikation durch Inhibitoren gehemmt wird [7. 56].

Ein Nachteil der autotrophen Nitrifikation ist die geringe Wachstumsgeschwindigkeit der entsprechenden Organismen. Diese wird für *Nitrosomonas* mit durchschnittlich 0,76/d und für *Nitrobacter* mit durchschnittlich 1,04/d angegeben [7. 3] und liegt damit ca. 10fach niedriger als die der meisten heterotrophen Bakterien. Entsprechend groß ist die Gefahr, daß Nitrifikanten bei hohen BSB-Frachten aus dem System verdrängt werden. Deshalb ist der Einsatz von Biofilmtechnologien als verfahrenstechnische Alternative zu konventionellen Belebtschlammssystemen bei nitrifizierenden Anlagen besonders naheliegend. Die Ansiedlung der Nitrifikanten im Biofilm verhindert eine schnelle Auswaschung der Organismen auch bei hohen hydraulischen Belastungen. Zusätzlich bietet der Biofilm aber auch einen gewissen Schutz gegenüber toxischen Verbindungen und anderen Streßfaktoren der Umwelt, wie starken pH-Änderungen. Diese Schutzfunktion des Biofilmes ist gerade für Nitrifikanten von erheblicher Bedeutung, weil diese Organismen gegenüber vielen toxischen Verbindungen eine deutlich höhere Sensitivität aufweisen, als die Mehrzahl der heterotrophen Arten (vgl. Tabelle 7.1) [7. 56]. Tatsächlich hat sich auch eine Vielzahl verfahrenstechnischer Lösungen unter Verwendung von Aufwuchsflächen für Biofilme am Markt etabliert. Dabei überwiegen solche Systeme mit festen Einbauten, die vor allem nach verfahrenstechnischen Gesichtspunkten, wie Strömungsverhalten und Oberflächenverfügbarkeit optimiert wurden.

Für viele Anwendungen von Interesse ist die Leistungsfähigkeit von nitrifizierenden Biofilmsystemen bei hohen BSB-Frachten. Konventionelle Systeme sind durch die geringen Wachstumsraten der Nitrifikanten auf BSB-Abbauleistungen weit unter der Leistungsgrenze für den Kohlenstoffabbau limitiert. Nach den Empfehlungen der ATV liegt die Obergrenzen der Schlammbelastung bei kommunalem Abwasser für eine vollständige Nitrifikation und eine Temperatur von 17°C bei 0,4 kg/kgTS*d [7. 3].

Auch in Biofilmpopulationen konkurrieren Nitrifikanten und heterotrophe Organismen um Substrat und Raum. Substratlimitation entsteht dabei vor allem durch den begrenzt verfügbaren Sauerstoff.

Durch Besiedelung der oberflächennahen Schichten des Biofilmes mit heterotrophen Organismen kann ein zusätzlicher Populationsdruck auf die obligat aeroben Nitrifikanten entstehen. Ergebnisse von Modellrechnungen und die Untersuchungen realer Systeme liefern jedoch recht unterschiedliche und teils unerwartete Resultate. Verschiedene Biofilmmodelle kommen übereinstimmend zu dem Ergebnis, daß schnell wachsende Organismen die oberflächennahen Schichten des Biofilms dominieren, während langsam wachsende, wie die Nitrifikanten, in den tieferen Schichten angetroffen werden sollten [7. 83]. Diese theoretischen Annahmen wurden von mehreren Autoren experimentell bestätigt [7. 61, 7. 78]. Anhand dieser Überlegungen kann erwartet werden, daß in Biofilmsystemen, wie auch bei Verwendung suspendierter Biomasse, eine effektive Nitrifikation nur unterhalb einer bestimmten Höchstbelastung für CSB möglich ist. Limitierend wäre dann jedoch nicht der Austrag der langsam wachsenden Organismen, sondern es sollte oberhalb einer bestimmten Leistungsgrenze die Dicke der anwachsenden heterotrophen Biofilmschicht die Sauerstoffversorgung der Nitrifikanten, und damit die Nitrifikationsgeschwindigkeit limitieren. Für extreme Dicken der heterotrophen Biofilmschicht von ca. 150 µm konnten Tjihuis et al. [7. 79] diese Annahme experimentell bestätigen. Die aus der Modellrechnung vorhergesagte 90%ige Verringerung der Nitrifikationsleistung war auch im Experiment meßbar. Andere Untersuchungen zeigen jedoch teils erhebliche Abweichungen von den theoretischen Annahmen. So fanden van Benthum et al. [7. 80] in ihren Experimenten statt der erwarteten 50%igen Abnahme der spezifischen Nitrifikationsleistung durch die Bildung einer heterotrophen Biofilmschicht sogar eine Zunahme der Nitrifikation um 50%. Bei eigenen Untersuchungen zur Ammoniumelimination mittels Nitrifikation aus Deponiesickerwasser wurde mit einem Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor eine stabile Nitrifikation selbst bei TOC Raumbelastungen von mehr als 4 gTOC/l*d (ca. 10 g CSB/l*d) festgestellt [7. 47]. Darüber hinaus konnte mit einem Festbettreaktor die vollständige Nitrifikation selbst dann noch gewährleistet werden, wenn die Leistungsgrenze hinsichtlich der CSB-Elimination bereits deutlich überschritten wurde [7. 47]. Wie Abbildung 7.43 verdeutlicht, wurden mittels Biofilmtechnologie auch wesentlich höhere Eliminationsleistungen erreicht, als mit einer zweistufigen konventionellen Belebtschlammanlage, obwohl die limitierte Belastbarkeit der Intensivbiologie durch ein zu geringes Schlammalters in diesem Fall keine Rolle spielte [7. 47]. Ein Austrag von Nitrifikanten mit dem Überschußschlamm kam als Erklärung für die geringere Nitrifikationsleistung im Belebtschlammssystem gegenüber dem Biofilm nicht in Betracht, weil kein Überschußschlamm gebildet wurde.

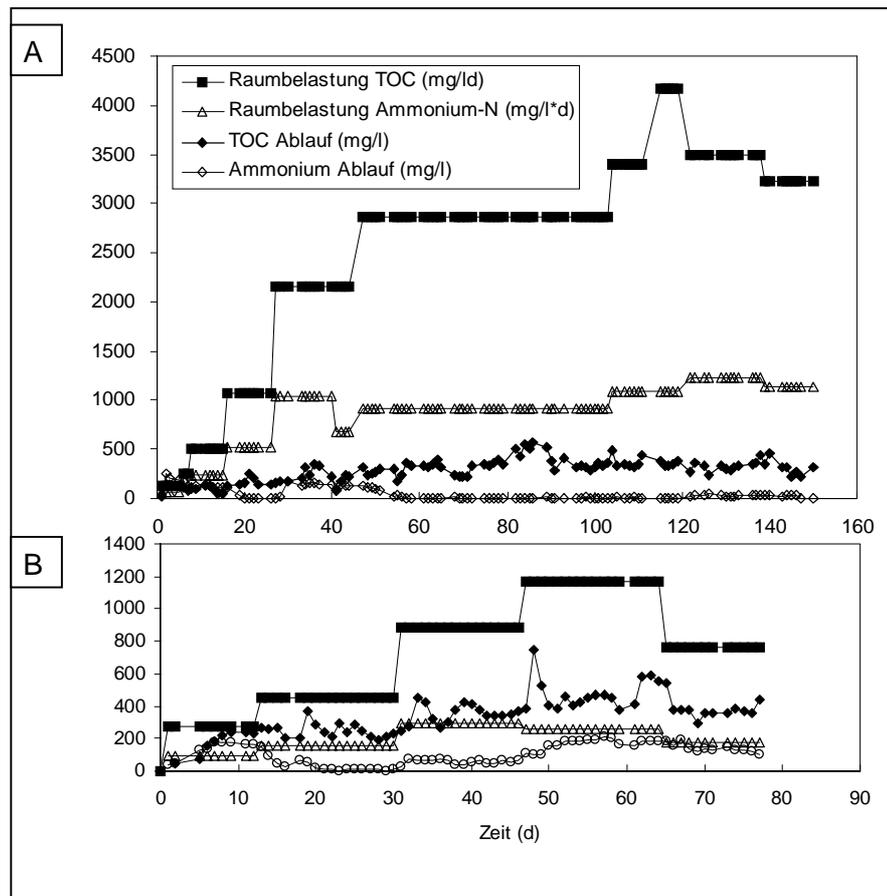


Abbildung 7.43: Elimination von organischer Fracht (gemessen als TOC) und Ammonium aus Deponiesickerwasser in einem Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor (A) und in einem zweistufigen Belebtschlammreaktor (B). Zulaufkonzentration TOC: 1492 mg/l, Ammonium: 720mg/l [7. 47]

Wie die dargestellten Beispiele verdeutlichen, lassen sich die tatsächlich erzielbaren Leistungen von Biofilmreaktoren mit den gegenwärtig verfügbaren Modellen nicht immer mit hinreichender Zuverlässigkeit beschreiben. Die teils erheblichen Abweichungen von den theoretischen Annahmen lassen den Schluß zu, daß für die erhöhte Nitrifikationsleistung der Biofilmsysteme neben der Einflußnahme auf die Wachstumsgeschwindigkeiten der Organismen und der Konkurrenz um Substrate noch andere Mechanismen verantwortlich sein müssen, für die gegenwärtig noch keine hinreichende Erklärung gegeben werden kann. Eine mögliche Ursache dafür wäre die verschiedentlich diskutierte erhöhte Stoffwechselleistung immobilisierter Organismen gegenüber frei suspendierten [7. 5]. Jedoch kann über die eigentlichen Ursachen dieses meßbaren Effektes wiederum nur spekuliert werden. Gerade für Sickerwasser aus Deponien, aber auch für industrielle Abwässer kann jedoch auch eine erhöhte Resistenz gegenüber osmotischen Belastungen und bakterientoxischen Wirkungen diskutiert

werden. Desweiteren muß zumindest für einige Systeme das Zusammenwirken konventioneller Mechanismen, wie der autotrophen Nitrifikation und Denitrifikation mit bisher wenig untersuchten Reaktionen, wie der anoxischen Oxidation von Ammonium [7. 30] in Betracht gezogen werden.

Trotz einer Reihe deutlicher Vorteile ist der Einsatz von Biofilmen für die Nitrifikation nicht ganz unproblematisch. Wie Untersuchungen verschiedener Autoren belegen, sind die autotrophen Nitrifizierer überwiegend recht hydrophil und besitzen ausgeprägte Elektronendonoreigenschaften. Demzufolge ist ihre Anlagerung an vielen technisch verbreiteten Trägermaterialien thermodynamisch nicht favorisiert [7. 77]. Aus thermodynamischer Sicht empfehlen sich deshalb vor allem hydrophile Trägermaterialien mit nur geringen negativen Oberflächenpotentialen oder mit Elektronenakzeptoreigenschaften. Tatsächlich wurden in unseren Untersuchungen auch sehr gute Resultate bei Verwendung von entsprechenden Tongranulaten erzielt [7. 75]. Wie das bereits oben dargestellte Beispiel verdeutlicht, haben sich auch Aktivkohlen bei der Etablierung von Nitrifikanten in Biofilmpopulationen bei gleichzeitiger hoher Kohlenstoffbelastung bewährt. Dagegen wurden mit den gleichen Substraten bei Verwendung von thermodynamisch weniger favorisierten Polystyrenträgern (vgl. Tab. 6.1) erheblich geringere Nitrifikationsleistungen erreicht (Tabelle 7.13).

Tabelle 7.13: Nitrifikationsleistungen von Biofilmpopulationen bei Verwendung unterschiedlicher Trägermaterialien. Substrat: Deponiesickerwasser; Ammoniumkonzentration im Zulauf 470 mg/l.

Raumbelastung		Restkonzentration Ammonium (mg/l)		
TOC (mg/l*d)	NH ₄ (mg/l*d)	Träger KS10	Träger EP 63	Träger AD41
253	146	32,7	5,9	11,0
506	324	17,8	6,7	13,8
759	439	130	20,1	14,4
1050	608	keine stabile Abbauleistung erzielbar		
162	94	55,6	36,7	21,5
325	188	109	101	27

Die Verwendung der oberflächenmodifizierten Modellträger verdeutlicht den Einfluß der Oberflächenstruktur auf die erzielbare Nitrifikationsleistung. In Laborversuchen stieg diese

zunächst erwartungsgemäß mit zunehmend positiverem Oberflächenpotential an. Zusätzlich beachtenswert ist die Tatsache, daß nach einer Störung des Gesamtsystems (hier durch Überlastung) mit den thermodynamisch weniger optimalen Systemen auch nach längeren Zeiträumen von mehreren Wochen die ursprüngliche Leistungsfähigkeit der Nitrifikation nicht wieder erreicht wurde. Die Nitrifikanten werden offensichtlich aus suboptimalen Biofilmsystemen vergleichsweise leicht verdrängt und eine nachfolgende Neuansiedlung der Organismen wird durch den vorhandenen Biofilm erschwert. Vergleichbare Effekte wurden auch im Anschluß an starke pH-Änderungen registriert.

Die dargestellten Resultate zeigen, daß mittels Biofilmtechnologie stabile nitrifizierende Systeme auch bei hohem Kohlenstoffangebot etabliert werden können. Jedoch sollte dabei ein Träger gewählt werden, der eine Optimierung unter thermodynamischen Gesichtspunkten zuläßt.

7.6.1.2 Die Denitrifikation

Die Eliminierung von Nitrat aus wäßrigen Medien kann mit hoher Effektivität mikrobiell mittels Denitrifikation erfolgen. Die dabei ablaufende Reaktion ist in Gleichung 7.4 dargestellt.



Da sehr viele Organismen zur Denitrifikation befähigt sind, läßt sich dieser Prozeß allgemein mit hoher Prozeßstabilität auch im technischen Maßstab realisieren. Als Problem muß jedoch gelegentlich die Akkumulation toxischer Mengen des Zwischenproduktes Nitrit angesehen werden. Für diese Anreicherung von Nitrit kommen verschiedene Ursachen in Betracht. Dazu gehört u.a. ein unzureichendes Angebot geeigneter Elektronendonatoren [7. 46]. Aber auch zu hohe Sauerstoffkonzentrationen können bei ungeeigneter Populationsstruktur eine Akkumulation von Nitrit bedingen [7. 52]. Bereits geringe Sauerstoffkonzentrationen zwischen 0,1 und 0,5 mg/l führen bei vielen Denitrifizierern zu einer signifikanten Inhibierung der Nitritreduktion [7. 7, 7. 53]. Andererseits sind auch Organismen bekannt, die selbst bei Sauerstoffkonzentrationen von bis zu 6 mg/l noch hohe Denitrifikationsraten ohne nennenswerte Akkumulation von Nitrit erreichen. Der bekannteste Repräsentant dieser Gruppe ist der ursprünglich als *Thioshaera pantotropha* beschriebene *Paracoccus denitrificans* [7. 68].

Ähnliche Eigenschaften wurden für einen von uns isolierten *Pseudomonas* Stamm (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* F10) festgestellt [7. 53]. Mit diesem Stamm wurde der Versuch unternommen, aus einer begrenzten Anzahl von Repräsentanten verschiedener Gruppen von Nitratreduzierern (*Pseudomonas pseudoalcaligenes* F10, *Bacillus niacini* W0 und *Staphylococcus spec.* W1) eine Modellpopulation zu erzeugen, die auch unter höheren Sauerstoffpartialdrücken zu einer effektiven Denitrifikation ohne signifikante Nitritakkumulation befähigt ist. Dazu wurden kontinuierlich betriebenen Modellreaktoren zwei unterschiedliche Trägermaterialien zugesetzt, die anhand ihres Adsorptionsverhaltens für die verwendeten Organismen (vgl. Tab. 5.6) einen entweder stabilisierenden (Träger SZ30) oder destabilisierenden Effekt (Träger EP63) auf das denitrifizierende System ausüben sollten. Wie Abbildung 7.44 verdeutlicht, wurden die erwarteten Wirkungen prinzipiell experimentell bestätigt. Während bei Verwendung des Trägers EP63 (Abbildung 7.44 B) im Vergleich zur trägerfreien Kontrolle bei verringerter Gesamt-N-Elimination eine erhebliche Akkumulation von Nitrit zu verzeichnen war, wurde nach Zusatz von SZ 30 (Abbildung 7.44 C) zunächst kein Nitrit im Ablauf des Systems nachgewiesen. Allerdings verminderte sich mit zunehmender Versuchszeit zunächst die Gesamt-N-Elimination. Nach ca. 10 Tagen setzte schließlich auch eine Akkumulation von Nitrit ein. Die erwartete gezielte Anreicherung von *P. pseudoalcaligenes* konnte also nur kurze Zeit aufrecht erhalten werden. Die Ursache dieser Abweichung der tatsächlichen Populationsentwicklung von den theoretischen Annahmen anhand physiko-chemischer Parameter ist vor allem in der besonderen Oberflächenstruktur von *B. niacini* zu sehen. Wie bereits in Abschn. 5.1.2.1.2.1 dargestellt, bilden diese Organismen spezifische Polysaccharide, die nicht nur die Adhäsion an den Träger vermitteln, sondern danach wesentlich an der Ausbildung der extrazellulären Matrix beteiligt sind. Damit besitzt *B. niacini* offensichtlich bei der Anlagerung an Oberflächen einen Selektionsvorteil gegenüber *P. pseudoalcaligenes* und kann letzteren schrittweise aus der Biofilmpopulation verdrängen. Da eine Reihe von Organismen zur Bildung extrazellulärer Polymere befähigt ist, muß mit ähnlichen Effekten auch in natürlichen Biofilmpopulationen gerechnet werden. Es ist demzufolge nicht zu erwarten, daß Organismen wie *P. pseudoalcaligenes* F10 durch einfache Optimierung des Systems Biofilm-Träger-Substrat so in einer Biofilmpopulation etabliert werden können, daß sie gegenüber anderen Organismen mit vergleichbarem Substratspektrum eine dominierende Rolle spielen. Um stabile und sauerstofftolerante Populationen von Denitrifizierern zu erstellen muß entsprechend über andere verfahrenstechnische Lösungen, wie z.B. eine Einschlußimmobilisierung geeigneter Organismen nachgedacht werden.

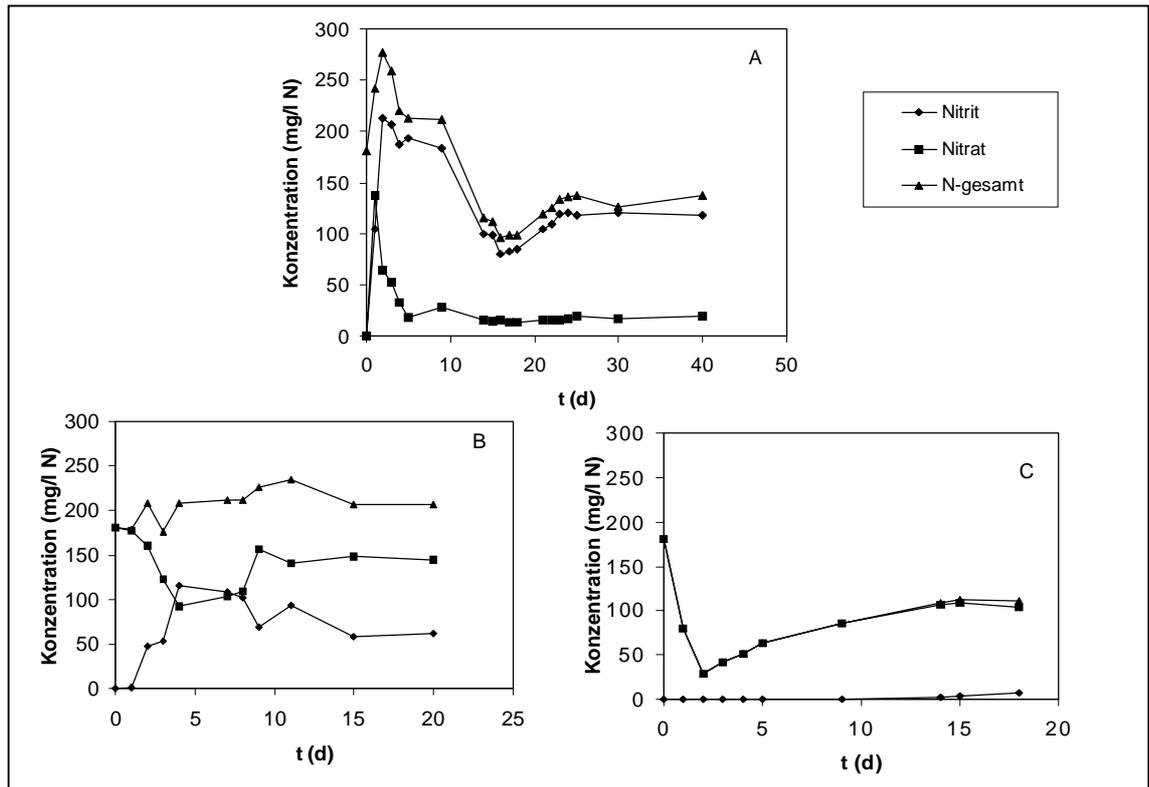


Abbildung 7.44: Einfluß unterschiedlicher Trägermaterialien auf die Denitrifikation in einer Modellpopulation aus *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F10, *Bacillus niacini* W0 und *Staphylococcus spec.* W1 [7. 53]. Kultivierungsbedingungen: C/N-Verhältnis 2.5:1, Hydraulische Verweilzeit 5 d. A: Trägerfreie Kontrolle, B: Träger EP63 und C: Träger SZ30.

7.6.2 Einsatz trägerfixierter Nitrifikanten für die Messung von Nitrifikationsinhibitoren

Die Nitrifikation ist neben dem Abbau organischer Kohlenstoffverbindungen eine der Hauptfunktionen biologischer Kläranlagen. Deshalb ist die Aufrechterhaltung einer ausreichenden Nitrifikationskapazität für den Betrieb der Anlagen von erheblicher Bedeutung. Eine besondere Überwachung der Nitrifikation ist vor allem deshalb notwendig, weil verschiedene spezifische Nitrifikationsinhibitoren und zahlreiche bakterientoxische Substanzen die Nitrifikation häufig schon bei Konzentrationen irreversibel schädigen, bei denen die Wirkungen auf die Mehrzahl der heterotrophen Organismen noch kaum wahrnehmbar sind (vgl. Tab. 7.1).

Die besondere Problemstellung bei der Messung der Nitrifikationshemmung ergibt sich aus den sehr unterschiedlichen Wirkungsmechanismen verschiedener Inhibitoren. Neben direkter Hemmung von Enzymen der Nitrifikation spielen auch Inhibitoren mit Wirkungen auf Atmungskettenenzyme, Entkoppler oder Wirkstoffe mit einem breiten

Wirkspektrum eine Rolle. Zusätzlich kann die Wirkung der Substanzen durch Transportprozesse limitiert werden. In vielen Fällen wird der tatsächliche inhibitorische Effekt im kontinuierlichen Prozeß erheblich von der vorhandenen Flora der heterotrophen Organismen beeinflusst, die einige der zugesetzten Wirkstoffe mit teils sehr hoher Geschwindigkeit adsorbieren oder abbauen. Deshalb lassen Resultate aus diskontinuierlichen Tests, wie dem nach EN ISO 9509, bei Verwendung standardisierter Laborpopulationen nur sehr begrenzte Aussagen über die tatsächlich zu erwartenden Wirkungen zu. Bessere Aussagen sind von Messungen mit realen Populationen zu erwarten, wie sie bei Betriebsüberwachungen üblicherweise verwendet werden. Jedoch geben diskontinuierliche Messungen jeweils nur Aussagen über die Wirkung einer bestimmten Substanzkonzentration, soweit diese im realen System auch tatsächlich erreicht wird. Zuverlässige Rückschlüsse aus diskontinuierlichen Tests auf die Wirkung einer bestimmten zugeführten Fracht sind deshalb streng genommen nur für biologisch nicht abbaubare Substanzen möglich. Für die Bewertung der Mehrzahl der nitrifikantentoxischen Verbindungen sind für den tatsächlichen Effekt die inhibitorische Wirkung und die biologische Abbaubarkeit unter den Bedingungen der realen mikrobiellen Population gleichermaßen zu berücksichtigen. So kann beispielsweise die 75 % Hemmschwelle der Nitrifikation für den Inhibitor Phenol mit ca. 5 mg/l angegeben werden. Dennoch werden von spezialisierten Populationen Phenole im Maßstab von mehreren g/l verwertet, ohne daß eine Beeinträchtigung der Nitrifikation beobachtet wurde. Auf Grund der hohen Abbaugeschwindigkeiten werden in realen Systemen bei störungsfreiem Betrieb keine toxischen Konzentrationen erreicht. Auftretende Störungen können jedoch gerade bei hohen Belastungen mit nitrifikantentoxischen Verbindungen innerhalb kurzer Zeit zu einer nachhaltigen Schädigung der Nitrifikanten führen. On line Meßsysteme können deshalb in solchen Anlagen eine erhebliche Verbesserung der Betriebssicherheit gewährleisten. Dabei spielt vor allem der Zeitfaktor eine erhebliche Rolle. Während diskontinuierliche Labormethoden ein Ergebnis nach ca. 20-30 h präsentieren, müssen Entscheidungen im kontinuierlichen Betrieb meist schon nach ein bis zwei Stunden getroffen werden, wenn nachhaltige Schäden verhindert werden sollen. Entsprechend wurden in der Vergangenheit mehrere Systeme für die kontinuierliche Überwachung der Nitrifikation entwickelt. Die meisten der bisher verfügbaren Geräte verwenden hoch angereicherte Populationen von Nitrifikanten. Ein wesentlicher Nachteil solcher Systeme besteht darin, daß sie die tatsächliche Populationsdynamik im Reaktor nicht berücksichtigen. Das Meßsystem reagiert damit im allgemeinen wesentlich empfindlicher, als das reale System, was im Einzelfall zu einer erheblichen Überbewertung der Wirkung zugeführter Frachten führen kann. Gleichzeitig werden die Organismen während der

Messung toxischer Verbindungen selbst geschädigt und werden deshalb bei den meisten Systemen nach jeder Messung verworfen und durch neue ersetzt.

Eine mögliche Alternative für den Einsatz suspendierter Organismen ist die direkte Immobilisierung von Nitrifikanten im Meßsystem. Die Prinzipskizze eines solchen Meßgerätes, welches bereits für den technischen Einsatz erprobt wird, ist in Abbildung 7.1 dargestellt.

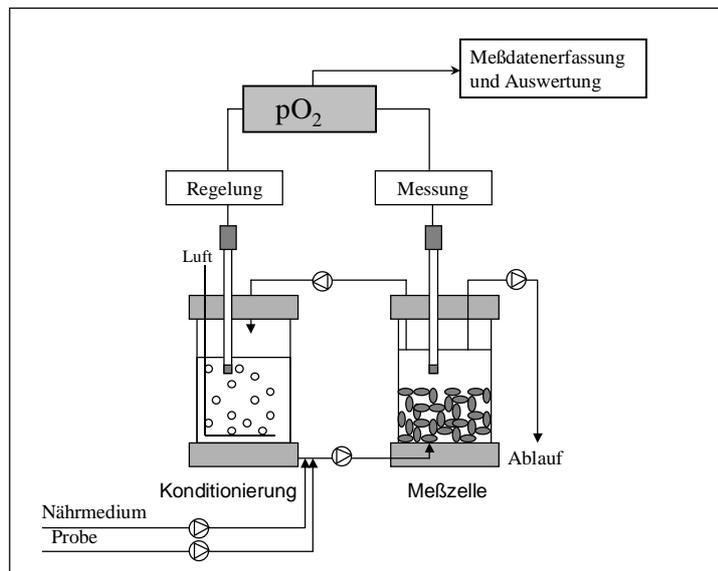


Abbildung 7.45: Prinzipskizze der Meßanordnung für die Bestimmung der Nitrifikationshemmung

Das Meßsystem besteht aus einer Meßzelle, in der eine nitrifizierende Population auf der Grundlage der realen Biomasse der zu überwachenden Anlage auf einem Biofilmträger etabliert wird. Die Optimierung dieses mikrobiellen Konsortiums erfolgt durch kontinuierliche Versorgung mit einem synthetischen Nährmedium, welches vor allen der Anreicherung einer hohen Nitrifikantendichte dient, und gleichzeitiger Zugabe des realen Substrates der zu überwachenden Anlage.

Die Dosierung des Anteiles an realem Abwasser kann dabei sowohl kontinuierlich oder auch pulswise erfolgen. Dieses Wasser dient gleichzeitig als Meßgut. Über das Verhältnis von synthetischem und realem Wasser, sowie die zugeführte Substratmenge können die Empfindlichkeit des Systems, wie auch das Verhältnis von Nitrifikanten und heterotrophen Organismen beeinflusst werden. Anhand von Messungen mit Allylthioharnstoff, einem spezifischen Inhibitor für die Nitrifikation, wurde ein spezifischer Anteil der Nitrifikation am Gesamtsauerstoffverbrauch von durchschnittlich 50 % ermittelt. Dieser Wert entspricht somit einer vollständigen Nitrifikationshemmung. Aus höheren Hemmungen des Sauerstoffverbrauches kann entsprechend geschlossen werden, daß

der jeweilige Wirkstoff neben der Nitrifikation auch die heterotrophen Organismen beeinträchtigt.

Durch die hohe Variabilität des Meßsystems kann das Verhalten in einer realen Anlage über weite Bereiche simuliert werden. Eine separat angeordnete Regelzelle sorgt für eine gleichbleibende Sauerstoffversorgung der Meßzelle. Als Meßgröße für die Wirkung von Inhibitoren wird die Änderung der Sauerstoffverbrauchsrate in der Meßzelle erfaßt und ausgewertet. Abbildung 7.46 zeigt eine charakteristische Kalibrationskurve bei Auswertung über den Parameter dpO_2/dt . Alternativ ist auch eine Berechnung über die maximale Peakhöhe möglich.

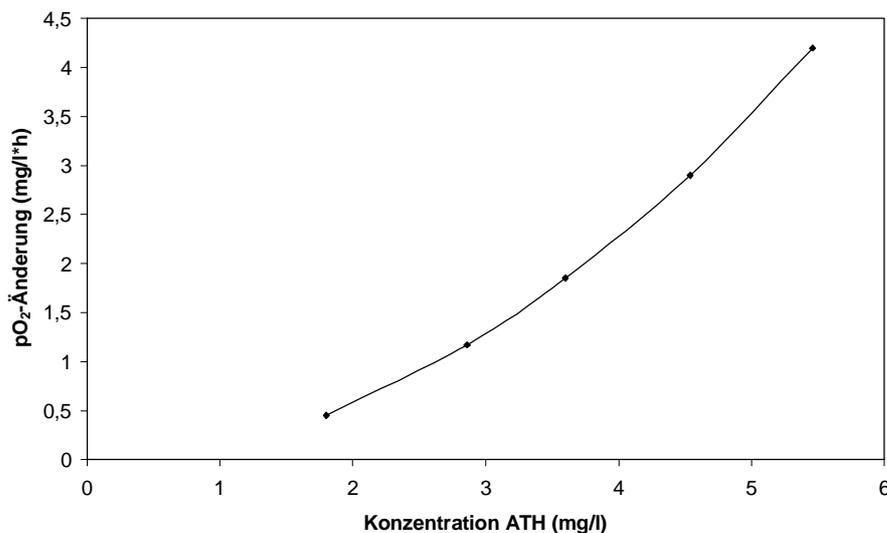


Abbildung 7.46: Kalibrationskurve des Meßsystems über den Parameter dpO_2/dt .
Testsubstanz: N-Allyl-Thioharnstoff.

Die Messung der Nitrifikantentoxizität mit einem quasi kontinuierlichen Meßsystem zeigte in unseren Untersuchungen gegenüber Verfahren mit frei suspendierter Biomasse einige wesentliche Vorteile vor allem hinsichtlich der Prozeßstabilität und Empfindlichkeit bei Verwendung realer Proben. In Laborexperimenten war mit dem dargestellten Meßsystem eine sichere Auswertung nitrifikantentoxischer Effekte innerhalb von 2 Stunden möglich. Nach ca. 3 h war in den meisten Fällen daß Maximum der Wirkung erreicht und nach weiteren 3-4 h war die Sauerstoffverbrauchsrate auf ihr Ausgangsniveau zurückgekehrt (Abbildung 7.47). Lediglich bei extremen Konzentrationen waren längere Erholungszeiten erforderlich. So wurde die Nitrifikation in Suspensionskultur durch Cumolhydroperoxid (CHP) bei einer Konzentration oberhalb von 20 mg/l vollständig und irreversibel inhibiert. Auch mit dem hier dargestellten Meßsystem auf der Grundlage trägerfixierter Organismen verringerte sich bei dieser CHP-Konzentration die Sauerstoffverbrauchsrate um ca. 90%.

Dies weist darauf hin, daß bei dieser Konzentration neben der Nitrifikation bereits auch ein Teil der heterotrophen Organismen beeinträchtigt wurde. Trotz dieser erheblichen Belastung kehrte die Nitrifikation innerhalb von ca. 9 h auf das ursprüngliche Niveau zurück. Bei 500 mg CHP/l waren 20 h für die Rückkehr auf das Ausgangsniveau notwendig (Abbildung 7.47). Selbst bei dieser hohen Konzentration trat jedoch keine dauerhafte Schädigung des Meßsystems ein.

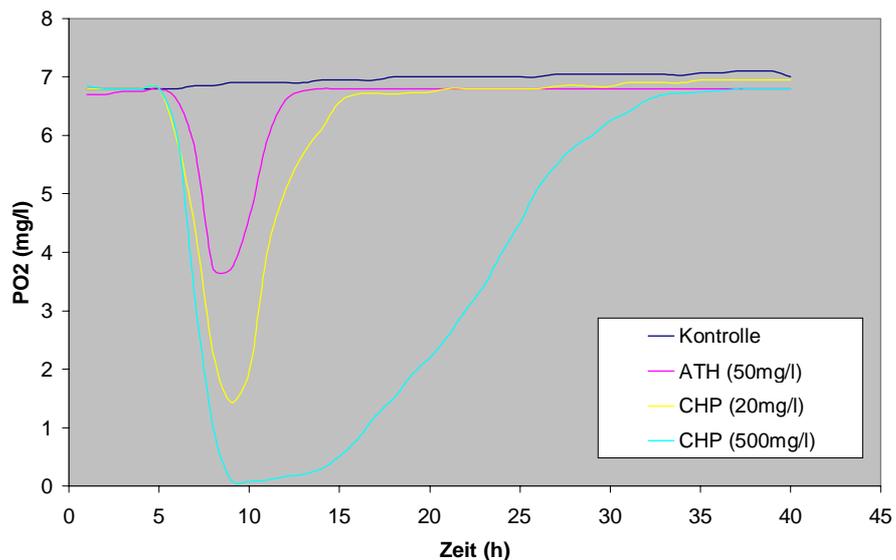


Abbildung 7.47: Wirkung von Inhibitoren der Nitrifikation auf den Sauerstoffverbrauch einer immobilisierten nitrifizierenden Population. Verwendete Testsubstanzen: ATH (n-Allylthioharnstoff, spezifischer Inhibitor der Nitrifikation), CHP (Cumolhydroperoxid, unspezifischer Inhibitor). Die Substanzen wurden jeweils als Puls von 10 min in den angegebenen Konzentrationen dosiert.

Dies belegt, daß auch bei extremen Konzentrationen toxischer Verbindungen ausreichend Nitrifikanten im Biofilm überleben, um innerhalb kurzer Zeit die Leistungsfähigkeit der Population wieder herzustellen. Die Prozeßstabilität bei Verwendung immobilisierter Mikroorganismen war damit mehr als 20 mal höher als mit suspendierten Kulturen.

In den bisherigen Laborversuchen wurden die Vorteile immobilisierter Nitrifikanten gegenüber Suspensionskulturen hinsichtlich Prozeßstabilität und Zuverlässigkeit der Aussagen auch an realen Proben im Prinzip belegt. Jedoch sind für dieses System noch weitere Untersuchungen insbesondere zur Optimierung der Datenauswertung und Quantifizierung erforderlich, um die Voraussetzungen für eine technische Anwendung zu schaffen.

8. Zusammenfassung

Biofilme entstehen überall dort, wo Mikroorganismen sich an Grenzflächen anlagern und dort wachsen. Sie sind in der Natur ubiquitär und stellen die wahrscheinlich häufigste Form mikrobiellen Lebens auf der Erde dar.

Allein ihr Vorkommen auch unter so extremen Bedingungen, wie heißen Quellen, Säure- und Laugebädern oder selbst auf Oberflächen von UV-Strahlern und radioaktiven Materialien verdeutlicht, daß Biofilme gegenüber dem Leben in planktonischer Form gewisse Vorzüge aufweisen. Diese Vorzüge können mit Hilfe von Biofilmtechnologien gezielt für den Abbau von Umweltschadstoffen genutzt werden.

Die Vorteile der Biofilmtechnologien gegenüber Verfahren mit suspendierten Mikroorganismen ergeben sich zunächst aus der Abkopplung der Aufenthaltszeit der Organismen von der hydraulischen Verweilzeit des Substrates. Dadurch können auch langsam wachsende Bakterienarten, von denen viele zu besonderen Abbauleistungen befähigt sind, in geeigneten Systemen etabliert werden. Weiterhin bietet der Biofilm durch seine räumliche Struktur zahlreiche Möglichkeiten für die Ausbildung spezialisierter Biofilmkonsortien, die durch die konzertierte Aktion verschiedener Organismenarten den Abbau auch von persistenten Verbindungen realisieren. Schließlich können mit Hilfe der Biofilmtechnologie auch nichtbiologische Wirkmechanismen, wie Adsorption und chemisch-katalytische Prozesse in den Abbauprozess eingekoppelt werden, wodurch das Spektrum der abbaubaren Verbindungen nochmals erweitert werden kann.

Bei der Optimierung von Biofilmsystemen ist ein kompliziertes Gefüge aus unterschiedlichen Einflußfaktoren zu beachten. Dabei kommt dem Substrat eine Schlüsselrolle zu. Die Zusammensetzung des Substrates bestimmt einerseits wesentlich die Zusammensetzung der mikrobiellen Population. Sie nimmt darüber hinaus jedoch auch Einfluß auf die Biofilmstruktur (vgl. Abschn. 7.3.3.) und setzt die Rahmenbedingungen für die technologische Gestaltung des Gesamtsystems (vgl. Abschn. 7). Die jeweils optimalen Rahmenbedingungen müssen dabei für jedes System neu definiert werden.

Für die Gestaltung optimierter Biofilmsysteme stehen verschiedene Parameter, wie pH-Wert, Sauerstoffpartialdruck, Substratkonzentration bzw. die hydraulische Verweilzeit des Substrates, Scherkräfteinflüsse zur Gestaltung der Biofilmdicke u.a. zur Verfügung. Ein wesentlicher Einflußfaktor auf das Gesamtsystem ist dabei der Biofilmträger selbst. Seine Wirkungen reichen dabei von der bloßen Bereitstellung einer Aufwuchsfläche für die Mikroorganismen bis hin zur Einflußnahme auf mikrobielle Abbauprozesse und die direkte Beteiligung an Abbaureaktionen. Entsprechend unterschiedlich sind die Zielfunktionen bei der Auswahl des Biofilmträgers zu definieren:

Relativ geringe Anforderungen an den Träger werden dort gestellt, wo mindestens für Spezialisten biologisch gut abbaubare Substrate vorliegen. Dies gilt auch dann, wenn diese Verbindungen selbst toxische Eigenschaften aufweisen, wie am Beispiel methylierter Phenole gezeigt (vgl. Abschn. 7.1.2). In solchen Systemen dient der Träger vor allem als Aufwuchsfläche für die Mikroorganismen. Vorzüge bieten hier Trägermaterialien, die feste adsorptive Bindungen zu den Bakterienoberflächen ermöglichen. Sie verringern die Ablösung und damit den Austrag der Organismen aus dem System. Ebenso bieten Vertiefungen und Makroporen auch weniger fest gebundenen Arten einen Schutz gegen den Angriff äußerer Scherkräfte. Durch den Einsatz adsorptionsfähiger Träger wird zusätzlich eine deutliche Erhöhung der Prozeßstabilität insbesondere gegenüber Stoßbelastungen erzielt. Dies gilt vor allem bei hohen Schlammbelastungen und toxischen Substraten, weil hier die Schwelle zu schädigenden Stoffkonzentrationen besonders schnell überschritten wird. Solange die biologische Leistungsfähigkeit der mikrobiellen Population jedoch nicht dauerhaft überschritten wird, erfolgt in solchen Systemen keine Akkumulation von Verbindungen auf dem Trägermaterial. Ein Trägeraustausch ist entsprechend normalerweise nicht erforderlich.

Eine etwas andere Situation ergibt sich, wenn das Substrat neben abbaubaren Verbindungen auch solche enthält, die bakterientoxische Eigenschaften aufweisen und biologisch nicht abgebaut werden. Ein solches Beispiel wurde in Abschn. 7.1.3. für das gleichzeitige Auftreten von Phenolen und arsenhaltigen Verbindungen dargestellt. In solchen Fällen kommt dem Biofilmträger neben seiner Rolle als Aufwuchsmedium für Mikroorganismen zusätzlich die Funktion eines Adsorbens für die nicht biologisch abbaubaren toxischen Komponenten zu. Die Optimierung des Gesamtsystems muß also neben der biologischen Abbauleistung auch die adsorptive Komponente berücksichtigen. Im Gegensatz zur oben dargestellten Situation ist hier ein kontinuierlicher Austausch eines Teils der Träger zwingend erforderlich.

Bei der Etablierung von Spezialisten für den Abbau bestimmter Verbindungen oder auch bei der selektiven Etablierung bestimmter Abbauwege ist die Kenntnis der Wechselwirkungen von Träger, Mikroorganismen und den zu verwertenden Substraten eine wesentliche Voraussetzung (vgl. Abschn. 6). Dabei kann die thermodynamische Betrachtung wichtige Informationen liefern. Wie in Abschn. 5.2.1 gezeigt, unterliegen auch die Ausbildung und Struktur des reifen Biofilmes in gewisser Weise den Gesetzen der Thermodynamik. Dabei sind unabhängig von den nachweisbaren Einflüssen unterschiedlicher thermodynamischer Kenngrößen auf den Adsorptionsprozeß an sich, für die selektive Gestaltung mikrobieller Populationen offensichtlich vor allem die elektrostatischen Wechselwirkungen von Interesse (vgl. Abschn. 5.1.2.1 bzw. Abschn. 6).

In realen Systemen ist dabei jedoch weniger das Optimum für die Wechselwirkung mit einer einzelnen Organismengruppe, als vielmehr die Diskriminierung zwischen den Eigenschaften verschiedener Gruppen von Bedeutung. Eine solche Diskriminierung gelingt um so leichter, je stärker das Spektrum an verwertbaren Substraten z.B. durch eine konventionelle unspezifische Vorbehandlung begrenzt werden kann. Die Möglichkeiten der Einflußnahme auf die Zusammensetzung auch übersichtlicher Modellpopulationen können jedoch im Einzelfall erheblich eingeschränkt werden, und zwar dadurch, daß einzelne Organismen z.B. durch Synthese von extrazellulären Polymeren ihre adhäsiven Eigenschaften und auch die der Biofilmoberfläche signifikant verändern. Solche Organismen können dann gerade in Biofilmen und auch entgegen thermodynamischen Annahmen die Population dominieren (vgl. Abschn. 7.6.1.2).

Bei der Etablierung von Abbaupotentialen für biologisch schwer oder nicht abbaubare Problemsubstanzen dient der Träger nicht nur als Aufwuchsmedium für die Mikroorganismen, sondern er kann auch in vielfältiger Weise selbst in den Abbauprozess eingreifen. Dabei können Wechselwirkungen von Substrat und Träger gezielt für die Beeinflussung des mikrobiellen Abbauprozesses genutzt werden. Unter anderem wurde für den Abbau von Huminstoffen (vgl. Abschn. 7.2) ein signifikanter Einfluß der Trägerstruktur auf die Spaltung der Polymerstruktur des Substrates festgestellt, die anhand unserer Untersuchungen auf eine direkte Wechselwirkung von Substrat und Trägermatrix zurückgeführt wird.

Durch Verwendung katalytisch aktiver Trägermaterialien ist auch die Kopplung des biologischen Abbaus mit chemischen Reaktionen möglich. Wie am Beispiel organischer Peroxide gezeigt (vgl. Abschn. 7.3), eröffnet die simultane Kombination der biologischen mit chemisch-katalytischen Wirkmechanismen die Möglichkeit auch solche Verbindungen vollständig zu eliminieren, die aufgrund ihrer gleichzeitigen hohen Persistenz und Toxizität von den Mikroorganismen selbst nicht abgebaut werden können.

Die dargestellten Leistungen von ausgewählten Biofilmsystemen übersteigen in vieler Hinsicht deutlich die Leistungsfähigkeit konventioneller Systeme mit suspendierten Organismen. Dies gilt sowohl im Hinblick auf erreichbare Raum-Zeit-Ausbeuten, wie auch für das verwertbare Substratspektrum. Jedoch können nach wie vor viele Details der dabei ablaufenden Prozesse nur in groben Umrissen beschrieben werden, so daß deren Klärung weiteren Forschungen vorbehalten bleibt.

9. Literaturverzeichnis

Abschnitt 1:

1. 1 Alves, M.M.; Pereira, A.; Novais, J.M.; Polanco, F.F. und M. Mota (1999): A new device to select microcarriers for biomass immobilization: Application to an anaerobic consortium. *Water Environ. Res.* 71, 209-217
1. 2 Arcangeli, J.-P. und E. Arvin (1995): Biodegradation rates of aromatic contaminants in biofilm reactors. *Water Sci. Technol.* 31, 117-128
1. 3 Bernhardt, D. und H. Diekmann (1991): Degradation of dioxane, tetrahydrofuran and other cyclic ethers by an environmental *Rhodococcus* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36, 120-123
1. 4 Brower, J.B. und C.C. Barford (1997): Biological fixed-film systems. *Water Environment Research* 69, 487-498
1. 5 Characklis W.G.; Mc Feters, G.A. und K.C. Marshall (1990): Physiological ecology in biofilm systems. In: W.G. Characlis and K.C. Marshall (Hrsg.): *Biofilms*. John Wiley, New York; 341-394
1. 6 Donaldson; T.L.; Strandberg; G.W.; Hewitt; J.D.; Shields; G.S. und R.M. Worden (1987): Biooxidation of coal gasification wastewaters using fluidized-bed bioreactors. Treatment of municipal wastewaters by the fluidized-bed bioreactor process. Final report, May 1982-April 1986. *Environ. Prog.* 6, 205-211
1. 7 Flemming, H.-C. (1992): Biofilme und Wassertechnologie Teil2: Unerwünschte Biofilme - Phänomene und Mechanismen. *GWF Wasser - Abwasser* 133, 119-129
1. 8 Foley, I. und P. Gilbert (1996): Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling* 10, 331-346
1. 9 Gaelli; R. (1987): Biodegradation of dichloromethane in waste water using a fluidized bed bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27, 206-213
1. 10 Hamilton, W.A. (1987): Biofilms: microbial interactions and metabolic activities. In: M. Fletcher, T.R.G. Gray und G.G. Geesey (Hrsg.): *Ecology of microbial environment*. Cambridge Univ. Press, 361-385
1. 11 Heitkamp, M. A.; Adams, W. J. und V. Camel (1993): Evaluation of five biocarriers as supports for immobilized bacteria: comparative performance during high chemical loading, acid shocking, drying and heat shocking. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1013-1023
1. 12 Holladay, D.W.; Hancer, C.W. und C.D. Scott (1978): Biodegradation of phenolic waste liquids in stirred tank, packed bed, and fluidized-bed bioreactors. *J. Water Pollut. Control Fed.* 50, 2573-2589
1. 13 Imai, A.; Onuma, K.; Inamori, Y. und R. Sudo (1995): Biodegradation and adsorption in refractory leachate treatment by the biological activated carbon fluidized bed process. *Water Res.* 29, 687-694

1. 14 Kim, B.R. (1986): Adsorption, desorption, and bioregeneration in an aerobic, granular activated carbon reactor for the removal of phenol. *J. Env. Eng.* 108, 269-277
1. 15 Kuljian, A. H. Jr.; Van Meter, P. A.; Fifield, Ch. D. und J.O. Thaler (1995): Remedial biodegradation of low organic strength cooling water using carbon fluidized bed reactor. *Proc. Ind. Waste Conf.* 499, 465-80
1. 16 Møller, S.; Sternberg, C.; Andersen, J.B.; Christensen, B.B.; Ramos, J.L.; Givskov, M. und S. Molin (1998) In situ gene expression in mixed-culture biofilms, Evidence of metabolic interactions between community members. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 721-732.
1. 17 Neufeld, R. N.; Niaki, S.; Badali, Ch.; Liu, P.K. T. und D. Powers (1994): Activated biofilm removal of low concentrations of Toluene. *Water Environ. Res.* 66, 899-903
1. 18 Suidan; M.T.; Pfeffer; J.T. und G.F. Nakhla (1988): Anaerobic expanded-bed GAC reactor for the treatment of biologically inhibiting wastes generated during coal and petroleum distillation. *Proceedings of the 5. international symposium, Bologna (IT), 22-26 May 1988.*
1. 19 Stronach, S.M.; Diaz-Baez, M.C.; Rudi, T. und J.N. Lester (1987): Factors affecting Biomass attachment during startup and operation of anaerobic fluidized beds. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 611-620.
1. 20 Swain, A., Waterhouse, K.V., Venables, W.A., Callely, A.G. and S.E. Lowe (1991) Biochemical studies of morpholine catabolism by an environmental mycobacterium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35, 110-114.

Abschnitt 2:

2. 1 Costerton, J. W. und Z. Lewandowski (1995): Microbial Biofilms. In: *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 711-745
2. 2 Flemming, H.-C. (1991): Biofilme und Wassertechnologie Teil 1: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. *GWF Wasser – Abwasser* 132, 197-207

Abschnitt 3:

3. 1 Alsopp, D. und K.J. Seal (1986): *Introduction to biodeterioration.* E. Arnold, London
3. 2 Andrews, G. und Trapasso, R. (1995): The optimal design of fluidized bed bioreactors. *J. Water Polut. Control Fed.* 57, 443-450
3. 3 Angell, P. und A.H.L. Chamberlein (1991): The role of extracellular products in copper colonisation. *Int. Biodeterior.* 27, 135-143
3. 4 Blenkinsopp, S.A. und J.W. Costerton (1991): Understanding bacterial biofilms. *Tibtech*9, 138-143
3. 5 Bock, E.; Ahlers, B und C. Meyer (1989): Biogene Korrosion von Beton- und Naturstein durch Salpetersäure bildende Bakterien. *Bauphysik* 11, 141-144

3. 6 Breitenbücher, K. (1994): Hochleistung durch mehr Biomasse. Umwelt-Technologie 5, 372-374
3. 7 Brower, J.B. und C.C. Barford (1997): Biological fixed-film systems. Water Environment Research 69, 487-498
3. 8 Busscher, H.J. und H.C. van der Mei (1997): Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Adv. Dent. Res. 11, 24-32
3. 9 Caccavo Jr., F.; Schamberger, P.C.; Keiding, K. und P.H. Nielsen (1997): Role of hydrophobicity in adhesion of the dissimilatory Fe(III)-reducing bacterium *Shewanella alga* to amorphous Fe(III) oxide. Appl. Environ. Microbiol. 63,3837-3843
3. 10 Cameron, J.A.; Bunch, C.L. und S.J. Huang (1988): Microbial degradation of synthetic polymers. In: Houthon, D.R.; Smith, R.N. und H.O.W. Egging (Hrsg.): Biodeterioration 7, Elsevier Appl. Sci., New York, 553-561
3. 11 Cecen, F. und I.E. Gönenc (1995): Criteria for nitrification and denitrification of high-strength wastes in two upflow submergend filters. Water Environ. Res. 67, 132-142
3. 12 Characklis W.G.; Mc Feters, G.A. und K.C. Marshall (1990): Physiological ecology in biofilm systems. In: Characklis, W.G. und K.C. Marshall (Hrsg.): Biofilms. John Wiley, New York; 341-394
3. 13 Characklis W.G. und K.C. Marshall (1990): Biofilms: a basis for an interdisciplinary approach. In: Characklis, W.G. und K.C. Marshall (Hrsg.): Biofilms. John Wiley, New York; 1-16
3. 14 Christensen B.E. und W.G. Characklis (1990): Physical and chemical properties of Biofilms. In: Characklis, W.G. und K.C. Marshall (Hrsg.): Biofilms. John Wiley, New York; 93-130
3. 15 Cohen, Y. und E. Rosenberg (Hrsg.)(1989): Microbial mats. Physiological ecology of benthic microbial communities. Am. Soc. Microbiol., Washington.
3. 16 Colturi, T.F. und K.J. Kozelski (1984): Corrosion and Biofouling control in a cooling tower system. Mat. Perform. 23, 43-47
3. 17 Cooper, P.F. und D.H.V. Wheeldon (1980): Fluidized and expanded bed reactors for waste water treatment. Wat. Pollut. Control 79, 286-306
3. 18 Costerton, J.W.; Cheng, K.J.; Geesey, G.G.; Ladd, T.I. ; Nickel, J.C.; Dasgupta, M. und T.J. Marrie (1987): Bacterial biofilms in nature and disease. Ann. Rev. Microbiol. 41, 435-464
3. 19 Costerton, J.W.; Irwin, R.T. und K.J. Cheng (1993): Practical measure to control device-related bacterial infections. Int. J. Artif. Organs 16, 765-770v
3. 20 Costerton, J. W. und Z. Lewandowski (1995): Microbial Biofilms. Ann. Rev. Microbiol. 49, 711-745
3. 21 Dalmacija, B.; Tamas, Z.; Miskovic, D.; Karlovic, E. und O. Petrovic (1992): The biosorption of selected pesticides from water by biologically activated carbon. Water Sci. Technol. 26, 1991-1994

3. 22 Dalethoft, E. und P. Thulin (1997): The use of the Kalnes suspended carrier process in treatment of waste water from the forest industry. *Water Sci. Technol.* 35, 123-127
3. 23 Dowling, N.J.E.; Brooks, S.A.; Phelps, T.J. und D.C. White (1991): Synergistic corrosion of pipe-line steel by obligately anaerobic bacteria. In: N.J.E. Dowling, M.M. Mittelman und J.C. Danco (Hrsg.): *Microbial influenced corrosion and biodeterioration*. Univ. of Tennessee, Knoxville, TN 37932-2567, 3.1-3.12
3. 24 Eckhardt, F.E.W. (1985): Solubilization, transport and deposition of mineral cations by microorganisms – efficient rock weathering agents. In: J.I. Drever (Hrsg.): *The chemistry of weathering*. D. Reidel Publ., 161-173
3. 25 Ehrler, P.; Glöckler, R.; Erken, M. und G. Ritter (1987): Unterstützung der aeroben biologischen Abwasserreinigung durch Braunkohlenkoks. *Korresp. Abwasser* 34, 129-134
3. 26 Enders, I. (1992): Vergleichende Untersuchungen zur Eliminierung von Schwermetallen aus einem Modellwasser durch biologisch-grenzflächenchemische Behandlung in der Wirbelschicht und durch ein konventionelles Belebtschlammssystem. Diplomarbeit, Technische Hochschule Köthen
3. 27 Erken, M. und Ritter, G. (1987): Betriebserfahrungen mit dem Einsatz von Braunkohlenkoksstaub in Belebtschlammmanlagen. *Wochenblatt f. Papierfabrikation* 115, 810-814
3. 28 Fitch, M.W.; Pearson, N.; Richards, G. und J.G. Burken (1998) Biological fixed film systems. *Water Environ. Res.* 70, 495-518
3. 29 Fiebig, R. und Dellweg, H. (1985): Comparison between the process performance of an USAB-Reactor and an USAB-Fixed Film-Combination with an acetic acid enrichment culture. *Biotechnol. Lett.* 7/85, 487-492
3. 30 Flemming, H.-C. (1991): Biofilme und Wassertechnologie Teil 1: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. *GWF Wasser – Abwasser* 132, 197-207
3. 31 Flemming, H.-C. (1992): Biofilme und Wassertechnologie Teil2: Unerwünschte Biofilme - Phänomene und Mechanismen. *GWF Wasser - Abwasser* 133, 119-129
3. 32 Flemming, H.-C. (1994): Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen. *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft* 129, Oldenburg Verlag, München.
3. 33 Flemming, H.-C. (1996): Biofouling and microbially influenced corrosion (MIC) – an economical and technical overview. In: Heitz, E.; Sand, W. und H.-C. Flemming (Hrsg.): *Microbial deterioration of materials*. Springer, Heidelberg, 5-14
3. 34 Flemming, H.-C. (1994): Struktur und Eigenschaften von Biofilmen. 17. DECHEMA Jahrestagung, 27.-29.4.99, Wiesbaden, Conference proceedings Bd. I, 360-363
3. 35 Foley, I. und P. Gilbert (1996): Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling* 10, 331-346

3. 36 Frischmuth, A.; Weppen, P. und W.D. Deckwer (1991): Quecksilberentfernung aus wäßrigen Medien durch aktive mikrobielle Prozesse. *BioEngineering* 7, 38-47
3. 37 Garrido, J.M.; Van Benthum, W.A.J.; Van Losdrecht, M.C.M. und J.J. Heijnen (1997): Influence of dissolved oxygen concentration on nitrite accumulation in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 168-173
3. 38 Gauthier, V.; Redercher, S. und J.-C. Block (1999): Chlorine inactivation of *Sphingomonas* cells attached to goethite particles in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 355-357
3. 39 Giwercman, B.; Jensen, E.T.; Hoiby, N.; Kharazmi, A. und J.W. Costerton (1991): Induction of $[\beta]$ -lactamase production in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother* 35, 1865-1868
3. 40 Godia, F. und C. Sola (1995): Fluidized-bed bioreactors. *Biotech. Prog.* 11. 479-497
3. 41 Hahn, J. und P. Haug (1986): Traces of Archebacteria in ancient sediments. *System. Appl. Microbiol.* 7, 178-183
3. 42 Heitkamp, M. A.; Adams, W. J. und V. Camel (1993): Evaluation of five biocarriers as supports for immobilized bacteria: Comparative performance during high chemical loading, acid shocking, drying and heat shocking. *Environ. Toxicol. Chem.* 12, 1013-1023
3. 43 Imai, A.; Onuma, K.; Inamori, Y. und R. Sudo (1995): Biodegradation and adsorption in refractory leachate treatment by the biological activated carbon fluidized bed process. *Water Res.* 29, 687-694
3. 44 Höke, H. und D.C. Hempel (1990): Biologischer Abbau komplexer Gemische stickstoffhaltiger Aromaten in einem Teerraffinerieabwasser. *GWF Wasser - Abwasser* 131, 660-663
3. 45 Jones, K. und S.B. Bradshaw (1996): Biofilm formation by the Enterobacteriaceae: A comparison between *Salmonella enteritidis*, *Escherichia coli* and a nitrogen-fixing strain of *Klebsiella pneumoniae*. *J. Appl. Bacteriol.* 80, 458-464
3. 46 Keim, P.; Luerweg, M.; Aivasidis, A. und C. Wandrey (1989): Entwicklung der Wirbelschichttechnik mit dreidimensional kolonisierbaren Trägermaterialien aus makroporösem Glas am Beispiel der anaeroben Abwasserreinigung. *Korresp. Abwasser* 36, 675-687
3. 47 Klein, J.; Brauckhoff, S.; Patalas, N.; Rennings-Schäfer, J.P. und S. Schacht (1991): Abbau aromatischer Kohlenwasserstoffe in Prozeßwässern durch an Aktivkohle immobilisierte Mikroorganismen. *GWF Wasser - Abwasser* 31, 654-659
3. 48 Krumbein, W.E. (1987): Microbial interactions with mineral materials. In: Houghton, D.R.; Smith, R.N. und H.O.W. Eiggins (Hrsg.): *Biodeterioration* 7, Elsevier, London, 78-100
3. 49 Kuljian, A. H. Jr.; Van Meter, P. A.; Fifield, Ch. D. und J.O. Thaler (1995): Remedial biodegradation of low organic strength cooling water using carbon fluidized bed reactor. *Proc. Ind. Waste Conf.* 499, 465-80

3. 50 Lapin-Scott, H.M. und J.W. Costerton (1989): Bacterial biofilms and surface fouling. *Biofouling* 1. 323-342
3. 51 LeChevallier, M.W.; Cawton, D.C.; und R.G. Lee (1988): Inactivation of biofilm bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 54, 2492-2499
3. 52 LeChevallier, M.W. (1990): Coliform regrowth in drinking water: A review. *J. AWWA* 82 (11), 74-86
3. 53 Liu, X.; Roe, F.; Jesaitis, A. und Z. Lewandowski (1998): Resistance of biofilms to the catalase inhibitor 3-Amino-123-triazole. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 156-162
3. 54 Martiensen, M.; Schulze, R. und J. Simon (1995): Capacities and limits of three different technologies for the biological treatment of leachate from solid waste landfill sites. *Acta Biotechnol.* 15, 269-276
3. 55 Martiensen, M.; Simon, J. (1996): Effect of activated carbon on the biological treatment of oil water emulsions. *Acta Biotechnol.* 16, 247-255
3. 56 Martiensen, M. (1999): Simultaneous catalytic detoxification and biodegradation of organic peroxides during the biofilm process. *Biodegrad.* im Druck
3. 57 MacDonald, D.V. (1990): Denitrification by fluidized biofilm reactors. *Water Sci. Technol.* 22, 451-461
3. 58 Mittelmann, M.C. (1991): Bacterial growth and biofouling control in purified water systems. In: Flemming H.C. und Geesey, G.G. (Hrsg.): *Biofouling and biocorrosion in industrial waste water systems.* Springer, Heidelberg, 113-134
3. 59 Morin, P.; Camper, A.; Jones, W.; Gatel, D. und J.C. Goldman (1996): Colonization and disinfection of biofilms hosting coliform-colonized carbon fines. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4428-4432
3. 60 Morin, M. und A.K. Kamper (1997): Attachment and fate of carbon fines in simulated drinking water distribution system biofilms. *Water Res.* 31, 399-410
3. 61 Morper, M. und P. Fürst (1991): Biologische Schwermetallentfernung aus Abwässern der Leiterplatten- und Galvanikindustrie in Anlagen nach dem Metex-Verfahren. *Berichte aus Technik und Wissenschaft* 66, 40-42
3. 62 Mouhri, K.; Marsot, P.; Pelletier, E.; Loudiki, M. und R. Saint-Louis (1995): Effects of tributyltin chloride on the growth and metabolism of the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bohlin). *Oceanol. Acta* 18, 363-370
3. 63 Newman, R.C.; Webster, B.J. und R.G. Kelly (1991): The electrochemistry of SBR corrosion and related inorganic phenomena. *Iron and Steel Inst. of Japan* 31, 201-213
3. 64 Neufeld, R. N.; Niaki, S.; Badali, Ch.; Liu, P.K. T. und D. Powers (1994): Activated biofilm removal of low concentrations of Toluene. *Water Environ. Res.* 66, 899-903
3. 65 Nicoletta, C.; Di Felice, R. und M. Rovatti (1997): Biomass concentration in fluidized bed biological reactors. *Water Res.* 31, 936-940

3. 66 Pantke, M. und G. Patuska (1984): Mikrobiologische Schadensanalyse an Grenzwertgebern für Heizöltanks. *Amts- und Mitt.-Bl. Bundesanst. Materialf.* 14, 329-332
3. 67 Rao, T.S.; Nancharaiah, Y.V. und K.V.K.Nair (1998): Biocidal efficacy of Monochloramine against biofilm bacteria. *Biofouling* 12, 321-332
3. 68 Rajagopal, S.; Venugopalan, V.P.; Nair, K.V.K. und J. Azariah (1995): Response of green mussel *Perna viridis* L. to chlorine in the context of power plant biofouling control. *Mar. Freshwater behav. Physiol.* 25, 261-274
3. 69 Ridgeway, H.F. (1988): Microbial adhesion and biofouling of reverse osmosis membranes. In: Parekh, B.S. (Hrsg.) *Reverse osmosis technology*. Marcel Dekker, New York, Basel, 429-488
3. 70 Rogers, J. und C.W. Keevil (1992): Immunogold and fluorescein immunolabeling of *Legionella pneumophila* within an aquatic biofilm visualized by using episcopic differential interference contrast microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 58; 2326-2330
3. 71 Sand, W.; Ahlers, B.; Krause-Kupsch, T.; Meinke, M.; Krieg, E.; Dierks, M; Sameluck, F. und E. Bock (1989): Mikroorganismen und ihre Bedeutung für die Zerstörung von mineralischen Baustoffen. *Z. Umweltchem. Ökotox.* 3, 155-165
3. 72 Sand, W. und E. Bock (1991): Biodeterioration of ceramic materials by biogenic acids. *Int. Biodeterior.* 27, 175-183
3. 73 Schopf, J.W.; Hayes, J.M. und M.R. Walter (1993): Evolution on earth's earliest ecosystems; recent progress and unsolved problems. In: J.W. Schopf (Hrsg.): *Earth's earliest biosphere*, Princeton Univ. Press, New Jersey, 361-384
3. 74 Schreyer, H.B und R.W.Coughlin (1999): Effects of stratification in a fluidized bed bioreactor during treatment of metalworking wastewater. *Biotechnol. Bioeng.* 63, 129-139
3. 75 Specchia, V. und A. Gianetto (1984): Powdered activated carbon in an activated sludge treatment plant. *Water Res.* 18, 133-137
3. 76 Suidan; M.T. und G.F. Nakhla (1988): Anaerobic fluidized-bed treatment of hazardous wastes. In: . Omenn, G.S. (Hrsg.): *Environmental biotechnology: reducing risks from environmental chemicals through biotechnology*. Plenum Press. New York, 295-306
3. 77 Stecker, Astrid (1994): Leistungen unterschiedlicher Methoden für die Bestimmung der Biomasse auf porösen Trägermaterialien. Diplomarbeit Universität Halle
3. 78 Steward, P. und J.B. Raquepas (1995): Implications of reaction diffusion theory for the disinfection of microbial biofilms by reactive antimicrobial agents. *Chem. Eng. Sci.* 50, 3099-3104
3. 79 Tjihuis, L; Hijman, B.; van Loosdrecht, M.C.M. und J.J.Heijnen (1996): Influence of detachment, substrate loading and reactor scale on the formation of biofilms in airlift reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 7-17
3. 80 Van Lith, C.; Leson, G. und R. Michelsen (1997): Evaluating design options for biofilters. *J.Air Waste Manage. Assoc.* 47, 37-44

- 3. 81 Ward, D.M.; Weller, R.; Shiea, J.; Castenholz, R.W. und Y. Cohen (1989): Hot spring microbial mats: anoxygenic and oxygenic mats of possible evolutionary significance. In: Y Cohen und E. Rosenberg (Hrsg.): Microbial mats. Acad. Soc. Microbiol., Washington, 3-15
- 3. 82 Wilken, R.D.; Kuballa, J. und J. Jantzen (1994): Organotins: their analysis and assessment in the Elbe river system, Northern Germany. Fres. J. Anal. Chem. 350, 77-84
- 3. 83 Wisst, S.; Sternad, W und W.Trösch (1998): Praxiserfahrungen an Festbett-Umlaufreaktoren. BioWorld 3 (3), 10-13
- 3. 84 Zobell, C.E. (1943): The effect of solid surfaces upon bacterial activity. J. Bacteriol. 46, 39-56

Abschnitt 4:

- 4. 1 Boley, A.; Haider, G. und W.-R. Müller (1995): Verfahren zur Denitrifikation von Wasser in Aquarien und Kreislaufanlagen zur Fischintensivhaltung. 15. DECHEMA-Jahrestagung, Münster, 213-214, Conference Proceedings
- 4. 2 Bonkhoff, K.; Haegel, F. H.; Thiele, P.; Subklew, G.; Gerheim, J.; Muckenheim, Th. und L. Webb (1996): Soil reclamation by mircoemulsions. From extraction to microbial treatment. Biol. Abwasserreinig. 1996 (7), 123-114
- 4. 3 Debus, O. (1993): Aerober Abbau von flüchtigen Abwasserinhaltsstoffen in Reaktoren mit membrangebundenen Biofilmen. Dissertation TU Hamburg Harburg. Hamburger Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft 12
- 4. 4 Fitch, M.W.; Pearson, N.; Richards, G. und J.G. Burken (1998) Biological fixed film systems. Water Environ. Res. 70, 495-518
- 4. 5 Hashimoto, S. und K. Furukawa (1987): Immobilization of activated sludge by PVA-boric acid method. Biotechnol. Bioeng. 30, 52-59
- 4. 6 Keim, P.; Luerweg, M.; Aivasidis, A. und C. Wandrey (1989): Entwicklung der Wirbelschichttechnik mit dreidimensional kolonisierbaren Trägermaterialien aus makroporösem Glas am Beispiel der anaeroben Abwasserreinigung. Korresp. Abwasser 36, 675-687
- 4. 7 Matsumura, M.; Yamamoto, T.; Wang, P.; Shinabe, K. and K. Yasuda (1997): Rapid nitrification with immobilized cell using macro-porous cellulose carrier. Water Res. 31, 1027-1034
- 4. 8 Ng, Y.-C.; Berry, J.M. und M. Butler (1996): Optimization of physical parameters for cell attachment and growth on macroporous microcarriers. Biotechnol. Bioeng. 50, 627-635
- 4. 9 Okada, F.; Shimomura, T.; Uchiyama, H. und O. Yagi (1995): Continuous biodegradation of trichloroethylene by *Methylocystis sp. M* in a membrane bioreactor. Soil Environ. 2 , 1067-1010
- 4. 10 Okos, M. R.; Choi, H. J. und B.Y. Tao (1995): Enhancement of secondary metabolite production by immobilized *Gossypium arboreum* cells. Biotechnol. Prog. 11, 306-311

4. 11 Salter, G.J.; Kell, D.P.; Ash, L.A.; Adams, J.M.; Brown, A.J. und R. James (1990): Hydrodynamic deposition: a novel method of cell immobilization. *Enzyme Microbiol. Technol.* 12, 419-430
4. 12 Sumino, T.; Ootake, Y und H. Nakamura (1987): Nitrogen removal with the use of microorganisms immobilized in polyacrylamide. *J. Wat. Waste* 29, 735-741
4. 13 Sumino, T.; Nakamura, H.; Mori, N.; Kawaguchi, J. und M. Tada (1992a): Immobilization of nitrifying bacteria in porous pellets of urethane gel for removal of ammonium nitrogen from waste water. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 556-560
4. 14 Sumino, T.; Nakamura, H.; Mori, N. und J. Kawaguchi (1992b): Immobilization of nitrifying bacteria by polyethylene glycol prepolymer. *J. Ferment. Technol.* 66, 235-240
4. 15 Tramper, J. und A.W.A. de Man (1986): Characterization of *Nitrobacter agilis* immobilized in carrageenan. *Enzyme Microb. Technol.* 8, 472-476

Abschnitt 5:

5. 1 Arvaniti, A.; Karamanos, N.K.; Dimitracopoulos, G. und E.D. Anastassiou (1994): Isolation and characterization of a Novel 20-kDa sulfated polysaccharide from the extracellular slime layer of *Staphylococcus epidermidis*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 308, 432-438
5. 2 Beveridge, T.J.; Makin, S.A.; Kadurugamuwa, J.L. und Z. Li (1997): Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiol. Rev.* 20, 291-303
5. 3 Bayer, E.A.; Shoham, Y.; Tormo, J. und R. Lamed (1996): The Cellulosome: A cell surface organelle for the adhesion to and degradation of cellulose. In: Fletcher, M (Hrsg.): *Bacterial Adhesion: Molecular and ecological diversity*. Wiley -Liss, New York, 155-182
5. 4 Bellon-Fontain, M.N.; Mozes, N.; van der Mei, H.C.; Slolema, J.; Cerf, O.; Rouxhet, P.G. und H.J. Busscher (1990) : A comparison of thermodynamic approaches to predict the adhesion of dairy microorganisms to solid substrata. *Cell Physiol.* 17, 93-106
5. 5 Bellon-Fontaine, M-N.; Rault, J. und C.J. van Oss (1996): Microbial adhesion to solvents: a novel method to determine the electron-donor/electron-acceptor or Lewis acid-base properties of microbial cells. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 7, 47-53
5. 6 Bittner, T. und H.M. Muir (1962): A modified uronic carbazole reaction. *Analyt. Biochem.* 4, 330-334
5. 7 Busscher, H.J.; Bos, R. und H.C. van der Mei (1995): Initial microbial adhesion is a determinant for the strength of biofilm adhesion. *FEMS microbiol. Lett.* 128, 229-234
5. 8 Busscher, H.J.; van de Belt-Gritter, B; van der Mei, H.C. (1995): Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity. 1. Zeta potentials of hydrocarbon droplets. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 5, 111-116

5. 9 Busscher, H.J.; van Hoogmoed, C.G.; Geertsema-Doornbusch, G.I.; van der Kuijl-Booij, M. und H.C. van der Mei (1997): *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida spp.* on silicone rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3810-3817
5. 10 Busscher, H.J. und H.C. van der Mei (1997): Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv. Dent. Res.* 11, 24-32
5. 11 Busscher, H.J.; Sjoelma, J. und H.C. van der Mei (1990): Relative importance of surface free energy as a measure of hydrophobicity in bacterial adhesion to solid surfaces In: Doyle, H.J. und M. Rosenberg (Hrsg.): *Microbial cell surface hydrophobicity*. Amerikan Society for Microbiol., Washington DC, 335-359
5. 12 Busscher, H.J. und A.H. Weerkamp (1987): Specific and non-specific interactions in bacterial adhesion to solid substrata. *FEMS Microbiol. Rev.* 46, 165-173
5. 13 Characklis, W.G. (1990): Microbial fouling. In: W.G. Characklis und K.C. Marshall (Hrsg.): *Biofilms*, John Wiley, New York, 523-584
5. 14 Cammarota, M.C. und G.L. Sant'Anna Jr. (1998): Metabolic blocking of exopolysaccharide synthesis: effects on microbial adhesion and biofilm accumulation. *Biotechnol. Lett.* 20, 1-4
5. 15 Costerton, J. W. und Z. Lewandowski (1995): Microbial Biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 711-745
5. 16 Cowan, M.M.; Van der Mei, H.C.; Rouxhet, P.G.; und H.J. Busscher (1992): Physicochemical and structural investigations of the surface of some anaerobic subgingival bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 1326-1334
5. 17 Christensen, B.E. (1989): The role of extracellular polysaccharides in biofilms. *J. Biotechnol.* 10, 181-202
5. 18 Dalton, H.M.; Poulsen, L.K.; Halasz, P.; Angles, M.L.; Goodman, A.E. und K.C. Marshall (1994): Substratum-induced morphological changes in a marine bacterium and their relevance to biofilm structure. *J. Bacteriol.* 176, 6900-6906
5. 19 Davies, D.G. und G.G. Geesey (1995): Regulation of the alginate biosynthesis gene *algC* in *Pseudomonas aeruginosa* during biofilm development in continuous culture. *Appl Environ. Microbiol.* 61, 860-867
5. 20 De Beer, D.; Stoodley, P. und Z. Lewandowski (1994): Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 636-641
5. 21 DeMaagd, R.A.; Rao, A.S.; Mulders, I.H.M.; Roo, L.G. ; van Loosdrecht, M.C.M.; Wijffelman, C.A. und B.J.J. Lugtenberg (1989): Isolation and characterization of mutants of *Rhizobium leguminosarium* bv. *viciae* 248 with altered lipopolysaccharides: Possible role of surface charge or hydrophobicity in bacterial release from the infection thread. *J. Bacteriol.* 171, 1143-1150
5. 22 Doyle, R.J. (1994): Introduction to lectins and their interactions with microorganisms. In: Doyle, R.J. und M. Slifkin: *Lectin-Microorganism interactions*. Marcel Dekker, Inc. New York, Basel, Hong Kong

5. 23 Doyle, R.J und I. Ofek (1995): Adhesion of microbial pathogens. *Methods in Enzymol.* 253, 542-550
5. 24 Durham, D.R.; Marshall, L.C.; Miller, J.G. und A.B.Chmurny (1994): Characterization of inorganic biocarriers that moderate system upsets during fixed-film biotreatment processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3329-3335
5. 25 Ellen R.P. und R.A. Burne (1996): Conceptual advances in research on the adhesion of bacteria to oral surfaces. In: Fletcher, M (Hrsg.): *Bacterial Adhesion: Molecular and ecological diversity.* Wiley - Liss, New York, 201-247
5. 26 Fett, W.F.; Osman, S.F. und M.F. Dunn (1989): Characterization of exopolysaccharides produced by plant-associated fluorescent pseudomonads. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 579-583
5. 27 Flemming, H.-C. (1991): *Biofilme und Wassertechnologie Teil 1: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen.* GWF Wasser – Abwasser 132, 197-207
5. 28 Fletcher, M. (1996): Bacterial attachment in aquatic environments: A diversity of surfaces and adhesion strategies. In: Fletcher, M (Hrsg.): *Bacterial Adhesion: Molecular and ecological diversity.* Wiley - Liss, New York, 1-24
5. 29 Figueroa, L.A. und J.A. Silverstein (1989): Ruthenium red adsorption method for measurement of extracellular polysaccharides in sludge flocs. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 941-947
5. 30 Gehrke, T.; Telegdi, J.; Thierry, D. und W. Sand (1998): Importance of extracellular polymeric substances from *Thiobacillus ferrooxidans* for bioleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 2743-2747
5. 31 Giese, Jr., R.F. und C.J. van Oss (1996): Surface and electrokinetic properties of clays and other mineral particles, untreated and treated with organic or inorganic cations. *Dispersion Science and Technol.* 17, 527-547
5. 32 Gjaltema, A.; van der Marel, N.; van Loosdrecht, M.C.M. und J.J. Heijnen (1997): Adhesion and biofilm development on suspended carriers in airlift reactors: Hydrodynamic conditions versus surface characteristics. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 880-889
5. 33 Goldstein, I.J.; Hughes, R.C.; Monsigny, M.; Osawa, T. und N. Sharon (1980): What should be called a lectin? *Nature* 66, 285-291
5. 34 Grasso, D.; Smets, B.F.; Strevett, K.A.; Machinist, B.D.; van Oss, C.J.; Giese, R.F. und W. Wu (1996): Impact of physiological state on surface thermodynamics and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Env. Sci. Technol.* 30, 3604-3608
5. 35 Grobber; G.J.; van Casteren, W.H.M; Schols H.A.; Oosterveld. A.; Sala, G. ; Smith, M.R.; Sikkema, J. und de Bont, J.A.M. (1997): Analysis of the exopolysaccharides produced by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* NCFB 2772 grown in continuous culture on glucose and fructose. *Appl Microbiol Biotechnol* 48, 516-521
5. 36 Groenink, J.; Veerman, E.C.I.; Zandvoort, M.S.; van der Mei, H.C.; Bussher, H.J. und A.V. N. Amerongen (1998): The interaction between saliva and *Actinobacillus*

actinomycescomitans influenced by the Zeta potential. Antony van Leeuwenhoek 73, 279-288

5. 37 Guoqiang, D.; Kaul, R. und B. Mattiasson (1992): Immobilization of *Lactobacillus casei* cells to ceramic material pretreated with polyethylenimine. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37, 305-310
5. 38 Habash, M.B.; van der Mei, H.C.; Reid, G. und H.J. Busscher (1997): Adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to silicone rubber in a parallel plate chamber in the absence and presence of nutrient broth. Microbiol. 143, 2569-2574
5. 39 Hancock, I.C. (1991): Microbial cell surface architecture. In: Mozes, N.; Handley, P.S.; Busscher, H.J. und P.G. Rouxhet (Hrsg.): Microbial cell surface analysis. VCH Publishers Inc. New York
5. 40 Handley, P.S. (1991): Detection of cell surface carbohydrate components. In: Mozes, N.; Handley, P.S.; Busscher, H.J. und P.G. Rouxhet (Hrsg.): Microbial cell surface analysis. VCH Publishers Inc. New York
5. 41 Hood, M.A. und J.M. Schmidt (1996): The examination of *Seliberia stellata* exopolymers using lectin assays. Microb. Ecol. 31, 281-290
5. 42 Hunt, A.P und J.D. Parry (1998): The effect of substratum roughness and river flow rate on the development of a freshwater biofilm community. Biofouling 12, 287-303
5. 43 Jaspers, E. und J. Overmann (1997): Separation of bacterial cells by isoelectric focusing, a new method for analysis of complex microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3176-3181
5. 44 Kelley, J.I.; Turng, B.-F.; Williams, H.N. und M.L. Baer (1997): Effects of temperature, salinity, and substrate on the colonization of surfaces in situ by aquatic *Bdellovibrios*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 84-90
5. 45 Langille, S.E. und R.M. Weiner (1998): Spatial and temporal deposition of *Hyphomonas* strain VP-6 capsules involved in biofilm formation. Appl. Environ. Microbiol. 64, 2906-2913
5. 46 LaPaglia, C. und P.L. Hartzell (1997): Stress-induced production of biofilm in the hyperthermophile *Archaeoglobus fulgidus*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3158-3163
5. 47 Larkin, J.M. und Nelson, R. (1987): Mechanism of attachment of swarm cells of *Thiotrix nivea*. J. Bact. 169, 5877-5879
5. 48 Lawrence, J.R.; Delaquis, P.J.; Korber, D.R. und D.E. Caldwell (1987): Behavior of *Pseudomonas fluorescens* within the hydrodynamic boundary layers of surface microenvironments. Microb. Ecol. 14, 1-14
5. 49 Lemoine, J.; Chirat, F.; Wieruszkeski, J.-M.; Strecker, G.; Favre, N. und J.R. Neeser (1997): Structural characterization of the exocellular polysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* SFi39 and SFi12. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3512-3518
5. 50 Loeb, G.I. und R.A. Neihof (1975) Marine conditioning films. in: R.E. Baier (Hrsg.): Applied chemistry at protein interfaces. Am. Chem. Soc., Washington, 319-335

5. 51 Marshall, K.C. und A.E. Goodman (1994): Effects of adhesion on microbial cell physiology. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2, 1-7
5. 52 Marshall, K.C.; Stout, R. und R. Mitchell (1971): Mechanisms of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 68, 337-348
5. 53 Martienssen, M. (1999): Ursachen für die Bildung fadenförmiger Organismen in der ZAB des Industriestandortes Leuna. Interner Forschungsbericht Leuna Werke AG
5. 54 Martienssen M. und S. Schübb (1998): Der Einfluß geladener Oberflächen bei der Anreicherung und Selektion von Mikroorganismen für den Abbau methylierter Phenole. *GWF Wasser-Abwasser* 139, 214-219
5. 55 Martienssen, M. und R. Schöps (1997): Biological treatment of leachate from solid waste landfill sites- Alterations in the bacterial community during the denitrification process. *Water Res.* 31, 1164-1170
5. 56 Martienssen M., Schöps, R. (1999): Population dynamics of denitrifying bacteria in a model biocommunity. *Water Res.* 33, 639-646
5. 57 Martienssen, M.; Reichel, O. und U.Kohlweiyer (1999): Impact of environmental conditions to surface properties of bacteria from different origin. *Biodegradation*, im Druck
5. 58 Martienssen, M. (1999): Simultaneous catalytic detoxification and biodegradation of organic peroxides during the biofilm process. *Water Res.* im Druck
5. 59 Massol-Deya, A.A.; Weller, R.; Rios-Hernandez, L.; Zhou, J.-Z.; Hickey, R.F. und J.M. Tiedje (1997): Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 270-276
5. 60 Millsap, K.W.; Reid, G.; van der Mei, H.C. und H.J. Busscher (1997): Cluster analysis of genotypically characterized *Lactobacillus* species based on physicochemical cell surface properties and their relationship with adhesion to hexadecane. *Can J. Microbiol.* 43, 284-291
5. 61 McCormick, C.A.; Harris, J.E.; Jay, A.J.; Ridout, M.J.; Colquhoun, I.J. und V.J. Morris (1996): Isolation and characterization of a new extracellular polysaccharide from an *Acetobacter* species. *J. Bacteriol.* 81, 419-424
5. 62 McEldowney, S. und M. Fletcher (1986a): Variability of the Influence of physicochemical factors affecting bacterial adhesion to polystyrene substrata. *Appl. Environ. Microbiol.* 52, 460-465
5. 63 McEldowney, S. und M. Fletcher (1986b): The effect of growth conditions and surface characteristics of aquatic bacteria on their attachment to solid surfaces. *J. Gen. Microbiol.* 132, 513-523
5. 64 Møller, S.; Korber; D.R.; Wolfaardt; G.M.; Molin; S. und D.E. Caldwell (1997): Impact of nutrient composition on a degradative biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2432-2438
5. 65. Mozes, N. und P.G. Rouxhet (1987): Methods for measuring hydrophobicity of microorganisms. *J. Microbiol. Methods* 6, 99-112

5. 66 Mozes, N; Marchal, F.; Hermesse, M.P.; Van Haecht, J.L.; Reuleaux, L.; A.J. Leonhard und P.G. Rouxhet (1987): Immobilization of microorganisms by adhesion: Interplay of electrostatic and nonelectrostatic interactions. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 439-450
5. 67 Neumann, A.W.; Absolom, D.R.; Francis, D.W. und C.J. van Oss (1980): Conversion tables of contact angles to surface tensions. *Separation and purification Methods* 9, 69-163
5. 68 Nelson, C.H.; Robinson, J.A. und W.G. Characklis (1985): Bacterial adsorption to smooth surfaces. *Biotechnol. Bioeng.* 30, 439-450
5. 69 Pelletier, C.; Bouley, C.; Cayuela, C.; Bouttier, S.; Bourlioux, P. und M.-N. Bellon-Fontaine (1997): Cell Surface Characteristic of *Lactobacillus casei subsp. casei*, *Lactobacillus paracasei subsp. paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1725-1731
5. 70 Pratt-Terpstra, I.H. ; Weerkamp, A.H. und H.J. Busscher (1989): Microbial factors in a thermodynamic approach of oral streptococcal adhesion to solid substrata. *J. Coll. Interf. sci.* 129, 568-574
5. 71 Poindexter, J.S. (1981): The Caulobacters: ubiquitous unusual bacteria. *Microb. Rev.* 45, 123-179
5. 72 Quintero, E.J., Busch, K. and Weiner, R.M. (1998): Spatial and temporal deposition of adhesive extracellular polysaccharide capsule and fimbriae by *Hyphomonas* strain MHS-3. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1246-1255
5. 73 Quintero, E.J. und R. M. Weiner (1995): Evidence for the adhesive function of the expolysaccharide of *Hyphomonas* strain MH-3 in its attachment to surfaces. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1897-1903
5. 74 Rasmussen, K. und Z. Lewandowski (1998): Microelectrode measurements of local mass transport rates in heterogeneous biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 302-309
5. 75 Reid, G.; Bialkowska-Hobrzanska, L.; van der Mei, H.C. und H.J. Busscher (1999): Correlation between genetic, physico-chemical surface characteristics and adhesion of four strains of *Lactobacillus*. *Colloid and Surfaces B: Biointerfaces* 13, 75-81
5. 76 Rosenberg, M.(1984): Bacterial adherence to hydrocarbons: Role in bacterial adhesion. *FEMS Microbiol. Lett.* 22, 289-295
5. 77 Rutter, P.R. und B. Vincent (1980): The adhesion of microorganisms to surfaces: Physicochemical aspects. in: Berceley, R.C.W.; Lynch, J.M.; Melling, J.; Rutter, P.R. und B. Vincent (Hrsg.): *Microbial adhesion to surfaces*, Ellis Horwood, Chichester, U.K., 79-93
5. 78 Schembri, M.A. und P. Klemm (1998): Heterobinary adhesins based on the *Escherichia coli* FimH fimbrial protein. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1628-1633
5. 79 Schneider, R.P.; Chadwick, B.R.; Jankowski, J. und I. Acworth (1994): Modification of substratum physicochemistry by material adsorbed from groundwater – Analysis by contact angles and relevance to microbial adhesion. *Geomicrobiol. J.* 14, 151-172

5. 80 Schneider, R.P. und K.C. Marshall (1994): Retention of the Gram-negative marine bacterium SW8 on surfaces - effects of microbial physiology, substratum nature and conditioning films. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2, 387-396
5. 81 Schuster, C.; Kötz, J.; Jaeger, W. und W.M. Kulicke (1996): Wechselwirkungen zwischen Klärschlammteilchen und Polyelektrolyten. *Chem.-Ing.-Tech.* 68, 980-984
5. 82 Sherbet, G.V. und M.S. Lakshmi (1973): Characterisation of *Escherichia coli* cell surface by isoelectric equilibrium analysis. *Biochim. Biophys. Acta* 298, 50-58
5. 83 Sjölema, J.; Busscher, H.J. und A.H. Weerkamp (1988): Deposition of oral Streptococci and polystyren latices onto glass in a parallel plate flow cell. *Biofouling* 1, 101-112
5. 84 Stelmack, P.L., Gray, M.R. und M.A. Pickard (1999): Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 163-168
5. 85 Stenström, Th.-A. und S. Kjelleberg (1985): Fimbriae mediated nonspecific adhesion of *Salmonella typhimurium* to mineral particles. *Arch. Microbiol.* 143, 6-10
5. 86 Stoffels, M.; Amann, R.; Ludwig, W.; Hekmat, D. und K.-H. Schleifer (1998): Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreactor degrading aromatic compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 930-939
5. 87 Stone-Masui, J. und A. Watillon (1975): Characterization of surface charge on polystyren Latices. *J. Colloid Interf. Sci.* 52, 479-503
5. 88 Suci, P.A.; Frolund, B.; Quintero, E.J.; Weiner, R.M. und G.G. Geesey (1995): Adhesive extracellular polymers of *Hyphomonas MHS-3*: Interaction of polysaccharides and proteins. *Biofouling* 9, 95-114
5. 89 Teixeira, P.; Azeredo, J.; Oliveira, A. und E. Chibowski (1998): Interfacial interactions between nitrifying bacteria and mineral carriers in aqueous media determined by contact angle measurements and thin layer wicking. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12, 69-75
5. 90 Toren, A.; Landau, L.; Kushmaro, A.; Loya, Y. und E. Rosenberg (1998): Effect of temperature on adhesion of *Vibrio* strain AK-1 to *Oculina patagonica* and on coral bleaching. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 1379-1384
5. 91 Van den Hul, H.J. und J.W. Vanderhoff (1972): The characterization of latex particle surfaces by ion exchange and conductometric titration. *Electroanal. Chem. Interf. Electrochem.* 37, 161-182
5. 92 Van der Mei, H.C.; Bos, R. und H.J. Busscher (1998): A reference guide to microbial cell surface hydrophobicity based on contact angles. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 11, 213-221
5. 93 Van der Mei, H.C.; Cowan, M.M.; Genet, M.J.; Rouxhed, P.G. und H.J. Busscher (1992): Structural and physicochemical surface properties of *Serratia marcescens* strain. *Can. J. Microbiol.* 38, 1033-1041

5. 94 van der Mei, H.C.; van de Belt-Gritter, B; Busscher, H.J (1995): Implications of microbial adhesion to hydrocarbons for evaluating cell surface hydrophobicity. 2. Adhesion mechanism. *Colloids and surfaces B: Biointerfaces* 5, 117-126
5. 95 Van der Mei, H.C. ; Weerkamp, A.H. und H.J. Busscher (1987): Physico-chemical surface characteristics and adhesive properties of *Streptococcus salivarius* strains with defined cell surface structures. *FEMS Microbiol. Lett.* 40, 15-19
5. 96 Vandevivere, P. und D.L. Kirchman (1993): Attachement stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3280-3286
5. 97 Van Haecht, J.L.; De Bremaeker, M. und P.G. Rouxhet (1984): Immobilization of yeast by adhesion to a support without use of a chemical agent. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 221-227
5. 98 Van Loosdrecht, M.C.M; Lyklema, J.; Norde, W.; Schraa, G. und A.J.B. Zehnder (1987): The role of bacterial cell wall hydrophobicity in adhesion. *Appl. Environ. Microbiol.* 53, 1893-1897
5. 99 Van Loosdrecht, M.C.M; Lyklema, J.; Norde, W. und A.J.B. Zehnder (1989): Bacterial adhesion: A physicochemical approach. *Microb. Ecol.* 17, 1-15
5. 100 Van Loosdrecht, M.C.M; Lyklema, J.; Norde, W. und A.J.B. Zehnder (1990): Influence of interfaces on microbial activity. *Microbiological Reviews* 54, 75-87
5. 101 Van Loosdrecht, C.M.; Norde, W.; Lyklema, J. und A.J.B. Zehnder (1990): Hydrophobic and electrostatic parameters in bacterial adhesion. *Aquat. Sci.* 52, 103-114
5. 102 Van Oss, C.J.; Chaudhury M.K. und R.J. Good (1988): Interfacial Lifshitz –van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chem. Rev.* 88, 927-941
5. 103 Van Oss, C.J. (1995): Hydrophobicity of biosurfaces - origin, quantitative determination and interaction energies. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 5, 91-110
5. 104 Van Pelt, A.W.J.; Weerkamp, A.H.; Uyen, M.H.W.J.C.; Busscher, H.J.; de Jong, H.P. und J. Arends (1985): Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1270-1275
5. 105 Volkering, F.; Breure, A.M. und W.H. Rulkens (1997): Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8, 401-417
5. 106 Wagner, M. ; Amann, R.; Lemmer, H. und K.-H. Schleifer (1993): Probing activated sludge with oligonucleotides specific for proteobacteria: Inadequacy of culture-dependent methods for describing microbial community structure. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 1520-1525
5. 107 Williams, T.M.; Unz, R.F. und J.T. Doman (1987): Ultrastructure of *Thiotrix* spp. und „type 021N“ bacteria. *Appl. Environ. Microb.* 53, 1560-1570
5. 108 Wincek, K.M. und M. Fletcher (1995): Bacterial adhesion to hydroxyl- and methyl-terminated alkanethiol self-assembled monolayers. *J. Bacteriol.* 177, 1959-1966

5. 109 Wolfaardt, G.M.; Lawrence, J.R.; Roberts, R.D.; Caldwell, S.J. und S.J. Callidwell (1994): Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 434-446
5. 110 Wrangstadh, M.; Szewzyk, U.; Östling, J. und S. Kjelleberg (1990): Starvation-specific formation of a peripheral exopolysaccharide by a marine *Pseudomonas* sp. strain S9. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 2065-2072
5. 111 Zellner, G.; Macario, A.J.L. und E.C. de Macario (1996): Microbial subpopulations in the biofilm attached to the substratum and in the free flocs of a fixed-bed anaerobic bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 443-449
5. 112 Zita, A. und M. Hermansson (1997): Effects of bacterial cell surface structures and hydrophobicity on attachment to activated sludge flocs. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 1168-1170

Abschnitt 6:

6. 1 Busscher, H.J. und H.C. van der Mei (1995): Use of flow chamber devices and image analysis methods to study microbial adhesion. *Methods Enzym.* 253, 455-477
6. 2 Busscher, H.J.; van Hoogmoed, C.G.; Geertsema-Doornbusch, G.I.; van der Kuijl-Booij, M. und H.C. van der Mei (1997): *Streptococcus thermophilus* and its biosurfactants inhibit adhesion by *Candida* spp. on silicone rubber. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3810-3817
6. 3 Busscher, H.J. und H.C. van der Mei (1997): Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv. Dent. Res.* 11, 24-32
6. 4 Durham, D.R.; Marshall, L.C.; Miller, J.G. und A.B. Chmurny (1994): Characterization of inorganic biocarriers that moderate system upsets during fixed-film biotreatment processes. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 3329-3335
6. 5 Ellen R.P. und R.A. Burne (1996): Conceptual advances in research on the adhesion of bacteria to oral surfaces. In: Fletcher, M (Hrsg.): *Bacterial Adhesion: Molecular and ecological diversity*. Wiley-Liss, New York, 201-247
6. 6 Fantroussi, S.E.; Mahillon, J.; Naveau, H. und S.N. Agathos (1997): Introduction and PCR detection of *Desulfomonile tiedjei* in soil slurry microcosms. *Biodegradation* 8, 125-133
6. 7 Gjaltema, A.; van der Marel, N.; van Loosdrecht, M.C.M. und J.J. Heijnen (1997): Adhesion and biofilm development on suspended carriers in airlift reactors: Hydrodynamic conditions versus surface characteristics. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 880-889
6. 8 Jaspers, E. und J. Overmann (1997): Separation of bacterial cells by isoelectric focusing, a new method for analysis of complex microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3176-3181

6. 9 Heitkamp, M.A.; Adams, W.J. und V. Camel (1993) : Evaluation of five biocarriers as supports for immobilized bacteria: comparative performance during high chemical loading, acid shocking, drying and heat shocking. *Env. Toxicol. Chem.* 12, 1013-1023
6. 10 Koch, B.; Ostermann, M.; Hoeke, H. und D.C. Hempel (1991): Sand and activated carbon as biofilm carriers for microbial degradation of phenols and nitrogen-containing aromatic compounds. *Water Res.* 25, 1-8
6. 11 Lücking, F. und M. Jank (1997): Verfahren zur feststoffkatalysierten oxidativen Elimination organischer Wasserinhaltsstoffe. DE 19548743
6. 12 Martiensen M. und S. Schübb (1998): Der Einfluß geladener Oberflächen bei der Anreicherung und Selektion von Mikroorganismen für den Abbau methylierter Phenole. *GWF Wasser-Abwasser* 139, 214-219
6. 13 Martiensen, M. und J. Simon (1996): Effect of activated carbon on the biological treatment of oil-water emulsions. *Acta Biotechnologica* 16, 247-255
6. 14 Martiensen, M.; Schulze, R. und J. Simon (1995) : Capacities and limits of three different technologies for the biological treatment of leachate from solid waste landfill sites. *Acta Biotechnologica* 15, 269-276
6. 15 Massol-Deya, A.A.; Weller, R.; Rios-Hernandez, L.; Zhou, J.-Z.; Hickey, R.F. und J.M. Tiedje (1997): Succession and convergence of biofilm communities in fixed-film reactors treating aromatic hydrocarbons in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 270-276
6. 16 Rijnaarts, H.H.M.; Norde, W.; Bouwer, E.J.; Lyklema, J. und A.J.B. Zehnder (1993): Bacterial adhesion under static and dynamic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 3255-3265
6. 17 Rutter, P. und B. Vincent (1988): Attachment mechanism in the surface growth of Organisms. In: Bazin, M.J. und Prosser, J.I (Hrsg.) : CRC series in mathematical models in microbiology, physical models in microbiology. Vol.II. CRC Press, Boca Raton, FL, 87-107.
6. 18 Schübb, S. (1996): Einfluß der Trägerstruktur auf den biologischen Abbau von Aromaten des Phenoltyps mit dem Wirbelschicht-Biofilm-Verfahren. Diplomarbeit TU Magdeburg
6. 19 Stelmack, P.L.; Gray, M.R. und M.A. Pickard (1999): Bacterial adhesion to soil contaminants in the presence of surfactants. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 163-168
6. 20 Van Pelt, A.W.J.; Weerkamp, A.H.; Uyen, M.H.W.J.C.; Busscher, H.J.; de Jong, H.P. und J. Arends (1995): Adhesion of *Streptococcus sanguis* CH3 to polymers with different surface free energies. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1270-1275
6. 21 Zellner, G.; Macario, A.J.L. und E.C. de Macario (1996): Microbial subpopulations in the biofilm attached to the substratum and in the free flocs of a fixed-bed anaerobic bioreactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46, 443-449

Abschnitt 7

7. 1 anonym (1996): Aufbereitung von Kühlschmier-Emulsionen und Entfettungsbädern. Wasser, Luft und Boden '96 (3), S. 72-74
7. 2 Allgemeine Rahmen- Verwaltungsvorschrift über Mindestanforderungen an das Einleiten von Abwasser in Gewässern. BAnz Nr. 233b vom 11. Dezember 1992
7. 3 ATV (Hrsg.) (1985): Lehr- und Handbuch der Abwassertechnik, Bd. IV: Biologisch, chemische und weitergehende Abwasserreinigung. Ernst & Sohn Verlag, Berlin
7. 4 ATV (Hrsg.) (1985): Lehr- und Handbuch der Abwassertechnik, Bd. VII: Industrieabwässer mit anorganischen Inhaltsstoffen. Ernst & Sohn Verlag, Berlin
7. 5 Audic, J.M.; Faup, G.M. und Navarro, J.M. (1984): Specific activity of *Nitrobacter* through attachment on granular media. Water Res. 18, 745-750
7. 6 Beudert, G.; Kuebler, P.; Schmid, K. und H.H. Hahn (1993): Versuche zur Bodenwäsche einschließlich biologischer Behandlung der hierbei anfallenden Feinkornfraktion. Kluwer Academic Publishers. London, 1405-1406
7. 7 Blasczyk, M. (1992): Comparison of denitrification by *Paracoccus denitrificans*, *Pseudomonas stutzeri* and *Pseudomonas aeruginosa*. Acta Microbiol. Pol. 41, 203-210
7. 8 Blenkinsopp, S.A. und J.W. Costerton (1991): Understanding bacterial biofilms. Tibtech9, 138-143
7. 9 Breitenbücher, K. (1994): Hochleistung durch mehr Biomasse. Umwelt-Technologie 5, 372-374
7. 10 Büyüksönmez, F.; Hess, T.F.; Crawford, R.L.; Paszynski, A. und R.J. Watts (1999): Optimization of simultaneous chemical and biological mineralization of perchlorethylene. Appl. Environ. Microbiol. 65, 2784-2788
7. 11 Dahn, W. (1993): Verfahren zur Sickerwasserbehandlung. AbfallwirtschaftsJournal 5 (1), 38-48
7. 12 De Beer, D.; Srinivasan, R. und P.S. Stewart (1994): Direct measurement of chlorine penetration into biofilms during disinfection. Appl. Environ. Microbiol. 60, 4339-4344
7. 13 De Beer, D.; Stoodley, P. und Z. Lewandowski (1994): Liquid flow in heterogeneous biofilms. Biotechnol. Bioeng. 44, 636-641
7. 14 Debus, O.; Krebs, H. und L. Hemmerling (1993): Combined biological and chemical oxidation of the leachate of an industrial site in an experimental plant. Contaminated soil '93, 1377-1380
7. 15 Denne, A. und E. Ecker (1987): Untersuchungen zur Sickerwasserbehandlung. In: Thome-Kozmiensky, K.J. (Hrsg.): Technik Altlasten. EF-Verlag für Energie und Umwelttechnik, Berlin, 649-656
7. 16 Ehrler, P.; Glöckler, R.; Erken, M. und G. Ritter (1987): Unterstützung der aeroben biologischen Abwasserreinigung durch Braunkohlenkoks. Korresp. Abwasser 34, 129-134

7. 17 Enders, I. (1991): Kombinierte Grenzflächenchemisch-Biologische Behandlung in der Wirbelschicht. Ingenieurarbeit Technische Hochschule Köthen
7. 18 Enders, I. (1992): Vergleichende Untersuchungen zur Elimination von Schwermetallen aus einem Modellwasser durch biologisch-grenzflächenchemische Behandlung in der Wirbelschicht und durch ein konventionelles Belebtschlammssystem. Diplomarbeit Technische Hochschule Köthen
7. 19 Etzensperger, M.; Thoma, S.; Petrozzi, S. und I.J. Dunn (1989): Phenol degradation in a three-phase biofilm fluidized sand bed reactor. *Bioprocess Eng.* 4, 175-181
7. 20 Etzold, M.; Hoogveldt, J.; Kufner, B. und E.A. Stadlbauer (1991): Pulsgetriebener Schlaufenreaktor. *Fachz. Lab.* 35, 1076-1081
7. 21 Foley, i. und P. Gilbert (1996): Antibiotic resistance of biofilms. *Biofouling* 10, 331-346
7. 22 Frischmuth, A.; Weppen, P. und W.D. Deckwer (1991): Quecksilberentfernung aus wäßrigen Medien durch aktive mikrobielle Prozesse. *BioEngineering* 7, 38-47
7. 23 Gidakos, E.; Köhling, A. und R.-E. Schmitt (1989): Entsorgung von Öl-in-Wasser-Emulsionen durch Elektroagulation. *Chem.-Ing.-Tech.* 61, 443-448
7. 24 Gjaltema, A.; van der Marel, N.; van Loosdrecht, M.C.M. und J.J. Heijnen (1997): Adhesion and biofilm development on suspended carriers in airlift reactors: Hydrodynamic conditions versus surface characteristics. *Biotechnol. Bioeng.* 55, 880-889
7. 25 Ghosh, T.K. und E.L. Tollefson, E.L. (1986): Continuous process for recovery of sulfur from natural gas containing low concentrations of hydrogen sulfide. *Can. J. Chem. Eng.* 64, 960-968
7. 26 Haase, B. und G. Tjarks (1994): Modellversuche zur mikrobiologischen Behandlung PAK-kontaminierter Waschrückstände. *TerraTech* 3, 26-27
7. 27 Haase, B.; Render, M. und J. Luhede (1990): Reinigung hochkontaminierter Böden mittels Waschverfahren. *Chem.-Ing.-Tech.* 62, 674-675
7. 28 Heidecke, S. (1993): Vergleichende Untersuchungen zur Biosorption von Kupfer durch freie und trägerfixierte Mikroorganismen. Ingenieurarbeit, Ingenieurschule für Chemie Berlin
7. 29 Heijnen, J.J.; Mulder, A.; Weltevrede, R.; Hols, P.H. und H.L.J.M. van Leeuwen (1990): Large-scale anaerobic/aerobic treatment of complex industrial waste water using immobilized biomass in fluidized bed and air-lift suspension reactors. *Chem. Eng. Technol.* 13, 202-208
7. 30 Hippen, A.; Helmer, C.; Scholten, E.; Kunst, S.; Diekmann, H.; Rosenwinkel, K.-H. und C.F. Seyfried (1998): Neue Möglichkeiten der Stickstoffelimination bei Abwässern mit niedrigem C/N-Verhältnis: Aerobe Deammonifikation. *Korresp. Abwasser* 45, 2287-2293
7. 31 Holladay, D.W.; Hancer, C.W.; Scott, C.D (1978): Biodegradation of phenolic waste liquids in stirred tank, packed bed, and fluidized-bed bioreactors. *J. Water Pollut. Control Fed.* 50, 2573-2589

7. 32 Hubele, C. (1985): Adsorption und biologischer Abbau von Huminstoffen in Aktivkohlefiltern. *Wasserchemie Karlsruhe* 27, 1-156
7. 33 Imai, A.; Iwami, N.; Matsushige, K.; Inamori, Y. und R. Sudo (1995): Removal of refractory organics and nitrogen from landfill leachate by the microorganism-attached activated carbon fluidized bed process. *Water Res.* 27, 143-145
7. 34 Imai, A.; Onuma, K.; Inamori, Y. und R. Sudo (1995): Biodegradation and adsorption in refractory leachate treatment by the biological activated carbon fluidized bed process. *Water Res.* 29, 687-694
7. 35 Jafvert, C.T. (1991): Sediment- and saturated-soil-associated reactions involving an anionic surfactant (Dodecylsulfate). 2. Partition of PAH compounds among phases. *Environ. sci. Technol.* 25, 1039-1045
7. 36 Kim, S.H. und M. Pirbazari (1989): Bioactive adsorber model for industrial waste water treatment. *J. Environ. Eng.* 115, 1235-12341
7. 37 Kindzierski, W.B.; Gray, M.R.; Fedorak, P.M. und S.E. Hrudey (1992): Activated carbon and synthetic resins as support material for methanogenic phenoldegrading consortia - comparison of surface characteristics and initial colonization. *Water Environ. Res.* 64, 766-775
7. 38 Klopp, R. und P. Koppe (1991): Über die Grenzen der biologischen CSB-Elimination in kommunalen Kläranlagen. *Korresp. Abwasser* 38, 201-207
7. 39 Koch, B.; Ostermann, M.; Hoeke, H. und D.C. Hempel (1991): Sand and activated carbon as biofilm carriers for microbial degradation of phenols and nitrogen-containing aromatic compounds. *Water Res.* 25, 1-8
7. 40 Kühne, Ch. und M. Martienssen (1990): Kombinierte Adsorptiv-Biologische Behandlung hochkontaminierter Grundwässer. Interner Forschungsbericht Leuna Werke AG
7. 41 Lai, M.-S.; Weber, A.S. und J.N. Jensen (1995): Oxidation of simazine: Biological oxidation of simazine and its chemical oxidation byproducts. *Water Environ. Res.* 67, 347-354
7. 42 Lehman, D. (1997): Untersuchungen zum Einfluß unterschiedlicher Trägermaterialien auf den mikrobiellen Abbau von natürlichen und synthetischen Huminstoffen. Diplomarbeit, Staatliche Studienakademie Dresden
7. 43 Li, A.Y. L. und F.A. DiGiano (1983): Availability of sorbed substrate for microbial degradation on granular activated carbon. *J. WATER POLLUT. CONTROL FED.* 55, 392-398
7. 44 Link, J.; Gilbert, E. und S.H. Eberle (1989): Untersuchungen über die Art und Menge der Reststoffe in den Abläufen biologischer Kläranlagen. *Vom Wasser* 72, 349-370
7. 45 Lücking, F. und M. Jank (1997): Verfahren zur feststoffkatalysierten oxidativen Elimination organischer Wasserinhaltsstoffe. DE 19548743
7. 46 Martienssen, M.; Simon, J. und R. Schulze (1997): Untersuchungen zum Einsatz von aufbereiteter Kfz-Kühlerflüssigkeit als H-Donator bei der biologischen Sickerwasserbehandlung. *Korresp. Abwasser* 44, 1622-1627

7. 47 Martienssen, M.; Schulze, R. und J. Simon (1995): Capacities and limits of three different technologies for the biological treatment of leachate from solid waste landfill sites. *Acta Biotechnol.* 15, 269-276
7. 48 Martienssen, M. und J. Simon (1996): Effect of activated carbon on the biological treatment of oil water emulsions. *Acta Biotechnol.* 16, 247-255
7. 49 Martienssen, M. und J. Simon (1997): Reinigung von Abwasser aus Emulsionsspaltanlagen durch kombinierten Einsatz von biologischer Behandlung und chemischer Na₂O₂-Oxidation. *Korresp. Abwasser* 44, 110-114
7. 50 Martienssen, M. (1997): Verfahren zur mechanisch-mikrobiologischen Reinigung kontaminierter Böden. *DE 197 44 376*
7. 51 Martienssen, M. (1998) Untersuchungen zum biologischen Abbau und zur Wirkung auf die Nitrifikation von ausgewählten Substanzen. Interner Forschungsbericht Leunawerke AG
7. 52 Martienssen, M. und R. Schöps (1997): Biological treatment of leachate from solid waste landfill sites - Alterations in the bacterial community during the denitrification process. *Water Res.* 31, 1164-1170
7. 53 Martienssen, M. und R. Schöps (1999): Population dynamics of denitrifying bacteria in a model biocommunity. *Water Res.* 33, 639-646
7. 54 Martienssen, M. und O. Reichel (1998): Untersuchungen zur Optimierung eines Verfahrens zur Reinigung von Grundwasser der MSB Schwandorf durch kombinierte adsorptiv-biologische Behandlung. Interner Forschungsbericht, MSB Schwandorf
7. 55 Martienssen, M. und M. Gründl (1999): Einsatz trägerfixierter Mikroorganismen zur Eliminierung von PAH und Mineralölkohlenwasserstoffen aus kontaminierten Böden. *Chem.-Ing.-Tech.* 71, 624-628
7. 56 Martienssen, M. (1999): Änderungen der Belebtschlammzusammensetzung einer Industriekläranlage unter dem Einfluß von Inhibitoren der Stickstoffelimination. *Korrespondenz Abwasser im Druck*
7. 57 Martienssen, M. (2000): Simultaneous catalytic detoxification and biodegradation of organic peroxides during the biofilm process. *Water Res.* im Druck
7. 58 Michaelis, W. (1989): Structural studies of marine and riverine humic matter by chemical degradation. *The science of the total environment* 81/82
7. 59 Møller, S.; Korber, D.R.; Wolfaardt, G.M.; Molin, S. und D.E. Caldwell (1997): Impact of nutrient composition on a degradative biofilm community. *Appl. Env. Microbiol.* **63**, 2432-2438
7. 60 Morper, M. und P. Fürst (1991): Biologische Schwermetallentfernung aus Abwässern der Leiterplatten- und Galvanikindustrie in Anlagen nach dem Metex-Verfahren. *Berichte aus Technik und Wissenschaft* 66, 40-42
7. 61 Okabe, S.; Hiratia, K.; Ozawa, Y. und Y. Watanabe (1996): Spatial microbial distributions of nitrifiers and heterotrophs in mixed-population biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 50, 24-35

7. 62 Pearl, H.W. (1980): Attachment of microorganisms to living and detrital surfaces in freshwater systems. In: Bitton G. und K.C. Marshall (Hrsg.): Adsorption of microorganisms to surfaces. John Wiley & Sons, New York, 1-5
7. 63 Pirbazari, M.; Voice, T.C. und W.J. Weber jr. (1990): Evaluation of biofilm development on various natural and synthetic media. Hazard. Waste Hazard. Mat. 7, 239-250
7. 64 Pitter, P. und J. Chudoba (1990): Biodegradability of organic substances in the aquatic environment. CRC Press, Boca Raton, Ann Arbor, Boston
7. 65 Raatz, S.; Katzer, S. und G. Härtel (1996): Spalten von W/O-Emulsionen mit Ultraschall und Ultrafiltration. Wasser, Luft und Boden '96 (11-12), 29-32
7. 66 Reichel, O. und M. Martienssen (1999): Untersuchungen zum Einfluß von Trägerstrukturen auf den biologischen Abbau von Inhaltsstoffen des Grundwassers vom Standort MSB Müllkraftwerk Schwandorf. Interner Forschungsbericht
7. 67 Reinert, G.; Schuster, E.; Schneider, M. und D. Bryniok (1996): Biologische Reinigung von Bodenwaschschlämmen: Neue Perspektiven durch eine Verfahrensinnovation. TerraTech 5, 55-57
7. 68 Robertson, L.A.; van Niel, E.W.J.; Torremans, R.A.M. und J.G. Kuenen (1988): Simultaneous nitrification and denitrification in aerobic chemostat cultures of *Thiosphaera pantotropha*. Appl. Environ. Microbiol. 157, 535-537
7. 69 Röhricht, M.; Daginnus, K.; Fahr, C.; Pralle, K.; Weppen, P. und W.-D. Deckwer (1990): Biosorber zur Entfernung von giftigen Schwermetallen. BioTec '90 (7), 59-63
7. 70 Shi, J.; Zhao, X.; Hickey, R. F. Und T.C. Voice (1995): Role of adsorption in granular activated carbon-fluidized bed reactors. Water Environ. Res. 67, 302-309
7. 71 Schmid, K. und G. Hahn (1995): Entwicklung eines Verfahrens zur biologischen Behandlung von Feinkornextrakten aus der Bodenwäsche bei Kohlenwasserstoff-Altlasten. Altlasten-spektrum 4(2), 94-101
7. 72 Speccia, V. und A. Gianetto (1984): Powdered activated carbon in an activated sludge treatment plant. Water. Res. 18, 133-137
7. 73 Spinti, M.; Zhuang, H. und E.M. Trujillo (1995): Evaluation of immobilized biomass beads for removing heavy metals from waste water. Water Environ. Res. 67, 943-952
7. 74 Stecker, A. (1994): Vergleichende Untersuchungen unterschiedlicher Methoden für die Bestimmung des Biomassegehaltes von porösen Trägermaterialien. Diplomarbeit Universität Halle, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät.
7. 75 Schulze, R.; Martienssen, M. und J. Simon (1993): Modellversuche zur Ermittlung der Eignung ausgewählter Technologien für die biologische Behandlung von Sickerwasser der Deponie Halle-Lochau. Interner Forschungsbericht Abfallwirtschaft Lochau GmbH.

7. 76 Schüpp, S. (1996): Einfluß der Trägerstruktur auf den biologischen Abbau von Aromaten des Phenoltyps mit dem Wirbelschicht-Biofilm-Verfahren. Diplomarbeit TU Magdeburg, Fakultät Maschinenbau
7. 77 Teixeira, P.; Azeredo, J.; Oliveira, R. und E. Chibowski (1998): Interfacial interactions between nitrifying bacteria and mineral carriers in aqueous media determined by contact angle measurements and thin layer wicking. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 12, 69-75
7. 78 Tjihuis, L.; Hijman, B.; van Loosdrecht, M.C.M. und J.J. Heijnen (1996): Influence of detachment, substrate loading and reactor scale on the formation of biofilms in airlift reactors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 45, 7-17
7. 79 Tjihuis, L.; Rekswinkel, E.; van Loosdrecht, M.C.M. und J.J. Heijnen (1994): Dynamics of population and biofilm structure in the biofilm airlift suspension reactor for carbon and nitrogen removal. *Water Sci. Technol.* 29, 377-384
7. 80 Van Benthum, W.A.J.; van Loosdrecht, M.D.M. und J.J. Heijnen (1997): Control of heterotrophic layer formation on nitrifying biofilms in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 397-405
7. 81 Van Niel, E.W.J.; Arts, P.A.M.; Wesselink, B.J.; Robertson, L.A. und J.G. Kuenen (1993): Competition between heterotrophic and autotrophic nitrifiers for ammonia in chemostat cultures. *FEMS Microbiol. Ecology* 102, 109-118
7. 82 Volkering, F.; Breure, A.M. und W.H. Rulkens (1997): Microbiological aspects of surfactant use for biological soil remediation. *Biodegradation* 8, 401-417
7. 83 Wanner O. und P. Reichert (1996): Mathematical modeling of mixed-culture biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 49, 172-184
7. 84 Welender, U. und T. Henrysson (1998): Degradation of organic compounds in a municipal landfill leachate treated in a suspended-carrier biofilm process. *Water Env. Res.* 70, 1236-1241
7. 85 Wolfaardt, G.M.; Lawrence, J.R.; Robarts, R.D.; Caldwell, S.J. und D.E. Caldwell (1994): Multicellular organization in a degradative biofilm community. *Appl. Env. Microbiol.* **60**, 434-446

10. Abbildungen

Abbildung 4.1: Die grundlegenden Prinzipien für die Immobilisierung von Mikroorganismen	
A: Oberflächenimmobilisierung	
B: Immobilisierung in porösen Matrices	
C: Mikrobielles Zellaggregat	
D: Einschlußimmobilisierung bzw. Zellrückhaltung durch Barrieren	
E: Hydrodynamische Zellrückhaltung	14
Abbildung 5.1: Verlauf der Biofilmbildung in 4 Phasen (nach van Lossdrecht et al. [5. 100]).	18
Abbildung 5.2: Wechselwirkungen zwischen Bakterien und Oberflächen in ihrer Abhängigkeit vom Abstand der wechselwirkenden Partner zueinander	21
Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der Änderung der Gibbssche Energie bei der Annäherung eines Partikels an eine plane Oberfläche.	
A: $G_E \gg G_V$, B: $G_E > G_V$, C: $G_E < G_V$	
G_E : elektrostatische Komponente, G_V : Van der Waals Komponente, G_{tot} : resultierende Gibbssche Energie,	
H: kürzeste Entfernung zwischen den wechselwirkenden Partnern	24
Abbildung 5.4: Die Beziehung zwischen den wirksamen Kräften und dem Kontaktwinkel bei der Ausbreitung eines Wassertropfens auf einer ebenen Oberfläche	26
Abbildung 5.5: Korrelation zwischen der Adsorption von Mikroorganismen an eine hydrophobe Oberfläche und ihrer Hydrophobizität (Kontaktwinkelmessung) bzw. ihrer Adsorption an Hexadekan (MATH-Test). [5. 57]	33
Abbildung 5.6: Das Meßprinzip der Partikelelektrophorese. V_L : Flüssigkeitsstrom. V_P : Relativgeschwindigkeit der Partikel in verschiedenen Zonen der Meßzelle	34
Abbildung 5.7: Zetapotentialkurven denitrifizierender Organismen aus einer Modellanlage zur Stickstoffelimination aus Sickerwasser [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$	37
Abbildung 5.8: Zetapotentialkurven von Organismen aus einer Modellanlage zur Eliminierung von Phenol und Kresolen bzw. Xylenolen [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$	38
Abbildung 5.9: Zetapotentialkurven von Organismen aus einer Industriekläranlage, die vornehmlich Kohlenwasserstoffe und Alkylsulfonate, aber auch aliphatische Amine eliminiert [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$	39
Abbildung 5.10: Variabilität des Zetapotentials der Organismen einer Modellkläranlage in Abhängigkeit von der Betriebszeit der Anlage. A: Zetapotentialverteilung zu Versuchsbeginn und nach 15 Tagen Betriebsdauer. B: Zeitliche Änderung der Halbwertsbreiten der Zetapotentialverteilung während der Adaption.	39

Abbildung 5.11: Zetapotentialkurven von Organismen mit unterschiedlichem Substratspektrum [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$	40
Abbildung 5.12: Zetapotentialkurven von Organismen, die zur Spaltung von Etherstrukturen befähigt sind. [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei $\leq 5\%$	41
Abbildung 5.13: Titrationskurven für zwei ausgewählte Organismen (<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> F10, <i>Pseudomonas spec.</i> BT)	45
Abbildung 5.14: Potentiometrische Differenztitrationskurven verschiedener denitrifizierender Organismen. Die dargestellten Kurven zeigen den Durchschnitt von 3 unabhängigen Messungen bei einer Standardabweichung von $\leq 3\%$.	46
Abbildung 5.15: Adsorption von <i>Pseudomonas spec.</i> BT an verschiedene Modellträger. Die Ladungsträgerdichte der Organismen ist gering und überwiegend durch anionische Gruppen geprägt. Verwendete Träger: EP 63: Polystyren unmodifiziert, KS10: Polystyren anionisch (modifiziert mit $-\text{SO}_3^-$), SZ 30: Polystyren kationisch (modifiziert mit Trimethylammoniumgruppen). Die Struktur der eingesetzten Modellträger, sowie die Methoden werden im Abschn. 6 (Tabelle 6.1) erläutert.	47
Abbildung 5.16: Adsorptionsverhalten von <i>Pseudomonas spec.</i> BT. in Abhängigkeit vom pH-Wert und die Differenztitrationkurve der Organismen. Die Änderung der Anzahl der adsorbierten Organismen steht in guter Übereinstimmung mit der Dissoziation der geladene Gruppen der Bakterienoberfläche.	48
Abbildung 5.17: Adsorption von <i>Bacillus niacini</i> W0 an verschiedene Modellträger. Die Ladungsträgerdichte der Organismen ist vergleichsweise hoch und durch anionische und kationische Gruppen geprägt. EP 63: Polystyren unmodifiziert, KS10: Polystyren anionisch (modifiziert mit $-\text{SO}_3^-$), SZ 30: Polystyren kationisch (modifiziert mit Trimethylammoniumgruppen). Die Struktur der eingesetzten Modellträger, sowie die Methoden werden im Abschn. 6 (Tabelle 6.1) erläutert.	48
Abbildung 5.18: Strukturen von Kristallviolett und Orange II	49
Abbildung 5.19: Bestimmung oberflächengebundener Polysaccharide. Korrelation von Phenol-Schwefelsäure-Methode und halbquantitativer Bestimmung durch Adsorption von Ruthenium Red.	54
Abbildung 5.20: Korrelation zwischen der Adsorptionskapazität von Mikroorganismen für Ruthenium Red und der Adsorption der Organismen an Hexadekan.	54
Abbildung 5.21: Korrelation zwischen der Adsorptionskapazität von Mikroorganismen für Ruthenium Red und der Hydrophobizität bestimmt durch Kontaktwinkelmessung.	55

Abbildung 5.22: Anordnung lokal synthetisierter Polysaccharide auf der Oberfläche von <i>Bacillus niacini</i> W0. A: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme nach Markierung mit WGA-Gold-Konjugat. EPS durch Feil markiert. Der Balken entspricht 1µm B: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme nach Färbung mit Ruthenium Red. Der Balken entspricht 1µm C: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme nach Färbung mit WGA-Texas-Red Konjugat D: Schematische Darstellung der Anordnung der Polysaccharid-cluster auf der Bakterienoberfläche gemäß Bild C.	59
Abbildung 5.23: Einfluß von Wachstumsstadium und verschiedenen Substraten auf das Zetapotentialprofil von <i>Pseudonocardia sulfidoxydans</i> K1 [5. 57]. Die dargestellten Potentialkurven zeigen den Durchschnitt aus 6 Messungen mit 2 unabhängig gewachsenen Kulturen. Die Standardabweichung lag jeweils bei ≤5%	68
Abbildung 5.24: Einfluß der Kultivierung mit unterschiedlichen Substraten auf die Zetapotentialkurve von <i>Pseudomonas acidovorans</i> Ca50 in Abhängigkeit von der Dauer der Kultivierung.	69
Abbildung 5.25: Verteilung der Organismen von <i>Pseudomonas acidovorans</i> Ca50 im pH-Gradienten der Isoelektrischen Focussierung. Die Anzucht der in Mineralmedium (1,4-Chlornitrobenzol) gewachsenen Bakterien in Nährbouillon führte über einen längeren Zeitraum zu einer deutlichen Zunahme der Variabilität hinsichtlich des isoelektrischen Punktes der Organismen.	69
Abbildung 5.26: Gehalte an Oberflächenglycosiden von <i>Bacillus niacini</i> W0 bei unterschiedlichen Kulturbedingungen. Die Zellen wurden in Standard I Nährbouillon bis zur mittleren log. Phase angezogen, abzentrifugiert und zum Zeitpunkt t0 in die angegebenen unterschiedlichen Kulturmedien überführt.	70
Abbildung 5.27: Bildung extrazellulärer Polysaccharide durch <i>Bacillus niacini</i> unter denitrifizierenden Bedingungen. A: 30 min nach Beginn der anoxischen Inkubation, B: nach 1 h, C: nach 3 h. Fluoreszenzfärbung mit WGA-Texas-Red-Konjugat	72
Abbildung 5.28: Polysaccharidgehalte in der Biofilmmatrix von Biofilmkonsortien auf unterschiedlichen Trägermaterialien. Die Angaben beziehen sich auf die meßbaren Neutralzucker nach Extraktion (Bestimmung mittels Phenol-Schwefelsäure-Methode). Die Biomassegehalte wurden aus dem Anteil an Lipidphosphaten berechnet.	80
Abbildung 5.29 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Biofilmentwicklung auf Trägermaterialien mit unterschiedlichen Oberflächenstrukturen	81
Abbildung 5.30: Änderungen des Gehaltes an Neutralzuckern unter der Einwirkung von unterschiedlichen Konzentration an Wasserstoffperoxid. Dargestellt sind die relativen Änderungen in Bezug auf eine unbehandelte Kontrolle.	82
Abbildung 6.1: Wirkprinzip der Parallelplattenkammer zur Bestimmung der Adsorption von Bakterien an innere Oberflächen	85
Abbildung 6.2: Adsorption von Mikroorganismen an unterschiedliche Modellträger in einer luftgetragenen bzw. einer flüssigkeitsdurchströmten Wirbelschicht (15 cm/min). A: <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> F10 B: <i>Bacillus niacini</i> W0	86

Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der verwendeten Laborbiofilmreaktoren [6. 12]	90
Abbildung 6.4: HPLC-Chromatogramm von Substraten und Zwischenprodukten aus dem Abbau von 3,4-Dimethylphenol [6. 12]. A: Träger KS10 beimpft mit Organismen aus dem Belebtschlamm 1, B: Träger KS10 beimpft mit Organismen aus dem Belebtschlamm 2, C. Träger KS10 beimpft mit einer Bodensuspension. D: Belebtschlammreaktor beimpft mit Belebtschlamm1.	91
Abbildung 6.5: Mikrotitrationskurven der Stämme PheA1, isoliert aus einem Biofilm von Träger KS10 und PheB2 aus einem Belebtschlammsystem.	92
Abbildung 6.6: Zetapotentialkurven ausgewählter Repräsentanten von zwei Reaktoren für den Abbau von 3,4,-Dimethylphenol. (PheA1: Biofilmreaktor mit Träger KS 10; PheB2: trägerfreie Intensivbiologie)[6. 12]	92
Abbildung 7.1: Adsorptionsisothermen der organischen Inhaltsstoffe des untersuchten Grundwassers bezogen auf CSB.	101
Abbildung 7.2: Adsorptionsisothermen der organischen Inhaltsstoffe des untersuchten Grundwassers bezogen auf die Summe phenolischer Verbindungen (Kupplungsfähige Stoffe als Phenoläquivalente).	102
Abbildung 7.3: Adsorptionsisothermen von ausgewählten Trägermaterialien für Phenol bzw. Veratrol.	104
Abbildung 7.4: Abbauleistungen (A) und Biomassenentwicklung (B) von Biofilm-Wirbelschicht-Reaktoren mit unterschiedlichen Trägern. Substrat Phenol.	105
Abbildung 7.5: Abbauleistungen (A) und Biomassenentwicklung (B) von Biofilm-Wirbelschicht-Reaktoren mit unterschiedlichen Trägern. Substrat Veratrol.	106
Abbildung 7.6: Abbauleistung eines Wirbelschicht-Biofilm-Reaktors mit WGA als Trägermaterial bei der Eliminierung der organischen Fracht aus einem realen Grundwasser. A: Ablaufkonzentration. B: Änderung der Abbaurrate in Abhängigkeit von der Raumbelastung	108
Abbildung 7.7: Einfluß von Zusätzen pulverisierter Aktivkohle auf den Abbau organischer Inhaltsstoffe eines phenol- und arsenhaltigen Grundwassers. Verwendete Aktivkohle: CHEMVIRON 313W	112
Abbildung 7.8: Aluminiumgehalte unterschiedlicher Aktivkohlen [7. 66].	113
Abbildung 7.9: Gehalte unterschiedlicher Aktivkohlen an ausgewählten Schwermetallen [7. 66].	113
Abbildung 7.10: Zetapotentiale verschiedener Aktivkohlen im physiologischen pH-Bereich [7. 66].	114
Abbildung 7.11: Adsorption der organischen Wasserinhaltsstoffe an verschiedenen Aktivkohlen unter Gleichgewichtsbedingungen.	114
Abbildung 7.12: Einfluß verschiedener Aktivkohlen auf die Eliminierung organischer Wasserinhaltsstoffe im Batchversuch.	115
Abbildung 7.13: Biomassegehalt auf unterschiedlichen Trägermaterialien nach 5 Tagen in Batchkultur, ermittelt aus der Menge extrahierbarer DNA [7. 66, 7. 74]	116
Abbildung 7.14 Epifluoreszenzbilder der bewachsenen Aktivkohlen. Färbung: DAPI (intakte Zellen - blau)/Sytox Green (Zellen mit gestörter Zellintegrität – grün) A: Norit B: Chemviron C: Lurgi D: Silcarbon	117

Abbildung 7.15: Aufwuchsverhalten von Mikroorganismen auf SILCARBON TH 90 G während der kontinuierlichen Behandlung von arsenhaltigem Grundwasser. Der Feil kennzeichnet die Belebtschlammflocke.	118
Abbildung 7.16: Abbau organischer Grundwasserinhaltsstoffe durch zweistufige biologisch-adsorptive Behandlung im kontinuierlichen Betrieb. Träger: 1% Hydradin SC44-1.	120
Abbildung 7.17: Abbau organischer Grundwasserinhaltsstoffe durch zweistufige biologisch-adsorptive Behandlung im kontinuierlichen Betrieb. Träger: 0.5% Hydradin SC44-1.	120
Abbildung 7.18: Abbau organischer Grundwasserinhaltsstoffe durch zweistufige biologisch-adsorptive Behandlung im kontinuierlichen Betrieb. Träger: 0.1% Hydradin SC44-1.	121
Abbildung 7.19: Leistungen einer zweistufigen biologisch-adsorptiven Grundwasserbehandlung unter optimierten Bedingungen (Träger Hydradin SC 44-1, Trägermenge im Reaktor 1 %, Schlammalter 12 d) im Technikumsmaßstab (Reaktorvolumen: 1,2 m ³) [7. 54]	122
Abbildung 7.20: Einfluß unterschiedlicher Trägermaterialien auf den Abbau der Huminsäurefraktion aus Deponiesickerwasser im Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor. Trägermaterial Polystyrol-DVB-Kopolymerisat underivatisiert (EP63), anionisch (KS10), kationisch (AD41, SZ30, SL30) oder gemischt funktionalisiert (SN36) (vgl. Tab. 6.1)	125
Abbildung 7.21: Adsorptionsverhalten von Huminsäure, isoliert aus Deponiesickerwassr (A) und kommerziell verfügbarer Huminsäure (B) an unterschiedlichen Trägermaterialien (zur Struktur der Träger vgl. Tab. 6.1).	125
Abbildung 7.22: Abbau von Huminsäure (Fluka) durch immobilisierte Mikroorganismen im Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor (Träger AD41) (A) und Entwicklung der immobilisierten Biomasse (B) in Abhängigkeit von der Raumbelastung.	126
Abbildung 7.23: Einfluß unterschiedlicher Trägermaterialien auf den Abbaugrad von Huminsäure im Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor. Raumbelastung 9,8 mg/l*d	127
Abbildung 7.24: Einfluß der Stickstoffversorgung auf den Abbaugrad von Huminsäure in Wirbelschicht-Reaktoren mit unterschiedlichen Trägermaterialien (Raumbelastung 9,8 mg/l*d).	128
Abbildung 7.25: Abbau von kommerzieller Huminsäure (Fluka) durch suspendierte Mikroorganismen, die vorher aus Biofilmreaktoren mit unterschiedlichen Trägern isoliert wurden.	128
Abbildung 7.26: Charakteristische Strukturen von Huminsäuren aus (A) Süßwasser und (B) Meerwasser [7. 58].	129
Abbildung 7.27: Adsorption und Spaltung von organischen Peroxiden an verschiedenen Aktivkohlen	132
Abbildung 7.28: Einfluß einer vorgeschalteten CHP-Spaltung mittels Aktivkohle auf die Abbauleistung eines Belebtschlammreaktors [7. 57]. Zulaufkonzentration TOC: 2089 mg/l, Peroxide: 300 mmol/l	133
Abbildung 7.29: Abhängigkeit der Abbauleistung von der Raumbelastung beim Abbau organischer Inhaltsstoffe eines CHP-haltigen Abwassers im Biofilmreaktor mit granulierter Aktivkohle als Trägermaterial. Zulaufkonzentration TOC: 2089 mg/l, Peroxide: 300 mmol/l	134
Abbildung 7.30: Abhängigkeit der Abbauleistung von der Raumbelastung beim Abbau organischer Inhaltsstoffe eines CHP-haltigen Abwassers im Biofilmreaktor mit Pulveraktivkohle als Trägermaterial. Zulaufkonzentration TOC: 2089 mg/l, Peroxide: 300 mmol/l	135

Abbildung 7.31	Epifluoreszenzbild von Belebtschlammflocken und Biofilmen unter den Einfluß unterschiedlicher Peroxidkonzentrationen. A: Belebtschlammflocke bei sequenzieller Prozeßführung, d.h. ohne direkte Einwirkung von Peroxiden (Färbung DAPI/Sytox Green) B: Belebtschlammflocke bei simultaner Peroxidspaltung mit Pulveraktivkohle ((Färbung DAPI/Sytox Green) C: Negativfärbung einer Belebtschlammflocke aus dem selben Reaktor wie B (Färbung Oregon Green) D: Belebtschlammflocke aus dem selben Reaktor wie B, jedoch 8 Tage nachdem Peroxide aus dem Zulauf entfernt wurden (Färbung DAPI/Sytox Green)	138
Abbildung 7.32:	Änderung des Neutralzuckerghaltes von Belebtschlammflocken nach Zusatz unterschiedlicher Konzentrationen von CHP. Dargestellt wird der relative Gehalt gegenüber einer CHP- freien Kontrolle.	139
Abbildung 7.33:	Einfluß von Pulveraktivkohle auf den biologischen Abbau der organischen Inhaltsstoffe aus Abwasser einer Emulsionsspaltanlage in der zweiten Stufe der biologischen Behandlung. Der Anteil an Pulverkohle im System zu den entsprechenden Versuchsphasen ist in % angegeben. Bis zum 55. Versuchstag wurde der Überschußschlammaustrag durch Zugabe von Aktivkohle WPX (200mg/l Zulaufvolumen) ausgeglichen. Danach wurde die Zugabe auf 100 mg/l bzw. 50mg/l reduziert [7. 48].	142
Abbildung 7.34:	Eliminierung von PAH aus einem realen kontaminierten Boden während der Bodenwäsche (Laborsimulation) [7. 55]. Verteilung von PAH (Summe 16 PAH nach EPA) zwischen Grobkorn, Schluff und Biofilmcarriern .	144
Abbildung 7.35:	Einfluß von modifizierten Polyurethancarriern auf die Anreicherung von PAH (Summe 16 PAH nach EPA) in der Schluff-Fraktion während der Bodenwäsche [7. 55].	145
Abbildung 7.36:	Abbaugeschwindigkeiten von PAH (Summe 16 PAH nach EPA) bei mehrmaliger Beladung von modifizierten Polyurethanträgern. Die erneute Beladung der Träger erfolgte jeweils nach Erreichen eines konstanten Restgehaltes [7. 55].	146
Abbildung 7.37:	Adsorptionsverhalten von Blei und Kupfer (als Blei(II)sulfat bzw. Kupfer (II)sulfat) an zwei ausgewählten Trägermaterialien	149
Abbildung 7.38:	Verhältnis von Zu- und Ablaufkonzentration bei der Biosorption von Blei in kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren mit freier bzw. immobilisierter Biomasse [7. 18].	150
Abbildung 7.39:	Adsorbierte Bleimengen von Träger und Biomasse bei kontinuierlicher Prozeßführung und Antrazit H als Trägermaterial.	151
Abbildung 7.40:	Verhältnis von Zu- und Ablaufkonzentration bei der Biosorption von Kupfer in kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren mit freier bzw. immobilisierter Biomasse [7. 28].	152
Abbildung 7.41:	Einfluß der Kupfermenge in Zulauf auf den CSB Abbau in kontinuierlich betriebenen Bioreaktoren mit suspendierter bzw. oberflächenimmobilisierter Biomasse (Träger Anthrazit H).	153
Abbildung 7.42:	Hemmung der Stoffwechselaktivität von Organismen aus einem Suspensionsreaktor bzw. einem Biofilmreaktor durch Kupfer. Als Kontrolle diente die Sauerstoffverbrauchsrate einer kupferfreien Kultur [7. 28]	153

Abbildung 7.43: Elimination von organischer Fracht (gemessen als TOC) und Ammonium aus Deponiesickerwasser in einem Wirbelschicht-Biofilm-Reaktor (A) und in einem zweistufigen Belebtschlammreaktor (B). Zulaufkonzentration TOC: 1492 mg/l, Ammonium: 720mg/l [7. 47]	158
Abbildung 7.44: Einfluß unterschiedlicher Trägermaterialien auf die Denitrifikation in einer Modellpopulation aus <i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i> F10, <i>Bacillus niacini</i> W0 und <i>Staphylococcus spec.</i> W1 [7. 53]. Kultivierungsbedingungen: C/N-Verhältnis 2.5:1, Hydraulische Verweilzeit 5d. A: Trägerfreie Kontrolle, B: Träger EP 63 und C: Träger SZ 30.	162
Abbildung 7.45: Prinzipskizze der Meßanordnung für die Bestimmung der Nitrifikationshemmung	164
Abbildung 7.46: Kalibrationskurve des Meßsystems über den Parameter dpO_2/dt . Testsubstanz: N-Allyl-Thioharnstoff.	165
Abbildung 7.47: Wirkung von Inhibitoren der Nitrifikation auf den Sauerstoffverbrauch einer immobilisierten nitrifizierenden Population. Verwendete Testsubstanzen: ATH (n-Allylthioharnstoff, spezifischer Inhibitor der Nitrifikation), CHP (Cumolhydroperoxid, unspezifischer Inhibitor). Die Substanzen wurden jeweils als Puls von 10 min in den angegebenen Konzentrationen dosiert.	166

11. Tabellen

Tabelle 3.1: Spannweite mikrobieller Existenz in Biofilmen nach Flemming [3. 32]	4
Tabelle 5.1: Oberflächenspannungen der gebräuchlichsten Flüssigkeiten für die Bestimmung der Oberflächenenergie von Bakterien und innerten Oberflächen (mJ/m^2) nach [5. 5 und 5. 92]	27
Tabelle 5.2: Charakteristische Komponenten der Zellwand Gram positiver bzw. Gram negativer Bakterien nach [5. 39].	29
Tabelle 5.3: Spezifität ausgewählter Lectine für verschiedene Strukturkomponenten von Polysacchariden nach [5. 22]	57
Tabelle 5.4: Zusammensetzung des isolierten Polymers von der Zelloberfläche von <i>Bacillus niacini</i> W0	58
Tabelle 5.5: Adsorption von <i>B.niacini</i> an Polystyrolpartikeln mit unterschiedlicher Oberflächenstruktur. Die Struktur der verwendeten Modelträger ist in Abschn. 6 (Tabelle 6.1) dargestellt.	60
Tabelle 5.6: Charakterisierung der Oberflächenstruktur, sowie des adsorptiven Verhaltens der wichtigsten, in dieser Arbeit verwendeten Organismen	62
Tabelle 6.1: Eigenschaften der verwendeten Modellträger	89
Tabelle 7.1: 75% Hemmschwelle ausgewählter Verbindungen für die autotrophe Nitrifikation [7. 51]	96
Tabelle 7.2: Zusammensetzung des verwendeten Grundwassers [7. 40]	100
Tabelle 7.3: Eigenschaften der verwendeten Trägermaterialien	100
Tabelle 7.4: Koeffizienten der Adsorptionsisothermen von CSB und Phenolen an drei unterschiedlichen Trägermaterialien nach dem Freundlich-Modell	102
Tabelle 7.5: Prozeßparameter für den kontinuierlichen Betrieb der verwendeten Wirbelschicht-Biofilm-Reaktoren	103

Tabelle 7.6: Abbauleistungen von 3 Wirbelschichtreaktoren mit unterschiedlichen Trägermaterialien für CSB und Phenole. Raumbelastung: 12,8 kg CSB/m ³ *d	103
Tabelle 7.7: Akkumulation von ausgewählten Substraten 5 h nach einer Erhöhung der Substratkonzentration um 300 % (Zulaufkonzentration im Gleichgewicht 1 g/l, erhöht für 5 h auf 3 g/l)	107
Tabelle 7.8: Zusammensetzung des eingesetzten Grundwassers	111
Tabelle 7.9: pH-Werte und Säurekapazitäten der verwendeten Trägermaterialien [7. 66]	113
Tabelle 7.10: Adsorptionskapazitäten der verwendeten Trägermaterialien für Arsen	114
Tabelle 7.11: Elimination ausgewählter Verbindungen aus Grundwasser durch eine zweistufige biologisch adsorptive Behandlung mit unterschiedlichen Trägermaterialien	119
Tabelle 7.12: Anreicherung ausgewählter Verbindungen aus Grundwasser in verschiedenen Trägermaterialien bei der zweistufigen biologisch adsorptiven Behandlung.	119
Tabelle 7.13: Nitrifikationsleistungen von Biofilmpopulationen bei Verwendung unterschiedlicher Trägermaterialien. Substrat Deponiesickerwasser; Ammoniumkonzentration im Zulauf 470 mg/l.	159

A Anhang

A.1 Verwendete Methoden und Meßverfahren

a) Aufschlußverfahren für die Proteinbestimmung aus Biofilmen

Prinzip: Thermischer Aufschluß unter alkalischen Bedingungen.

Durchführung:

- Probe 3 x mit Leitungswasser spülen (Überstand vorsichtig dekantieren)
Sediment filtrieren, 2 x mit 0.1 M Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 waschen.
- Je 2.5 g Sediment aufnehmen in 20 ml 1 N NaOH, 30 min bei Raumtemperatur inkubieren, anschließend 30 min auf 100 °C erhitzen und sofort im Eisbad abkühlen. Danach zentrifugieren (30 min, 15 000 RPM), Überstand für Proteinbestimmung einsetzen.
- Bei Störungen der Nachweisreaktion: 2 ml Überstand mit 1 ml 20%iger TCA fällen, nach 1 h zentrifugieren (10 min, 15000 RPM), Sediment aufnehmen in 2 ml 0,1M NaOH.

Quelle : Stecker, A. : Diplomarbeit Universität Halle (1994)

b) Adsorption von Alcian Blue an mikrobielle Oberflächen

Prinzip: Anlagerung der farbigen Substanz an saure Oberflächenpolymere und Messung der Extinktionsabnahme im Überstand zur semiquantitativen Bestimmung von polymeren Substanzen der Zelloberfläche.

Durchführung: Probe zentrifugieren, sedimentierte Zellen waschen mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 aufnehmen.
Je 2 ml Zellsuspension mit unterschiedlicher Dichte (maximal 1 g BTS/l) und 100 µl 10 mM Alcian Blue Lösung mischen,
Inkubation 10 min, danach zentrifugieren (10 min, 5 000 RPM)
Bestimmung der Extinktionsabnahme im Überstand bei 606 nm.

Quelle: Labormethode IBT

c) Adsorption von Ruthenium Red an mikrobielle Oberflächen

Prinzip: Anlagerung der farbigen Substanz bevorzugt an saure Oberflächenpolysaccharide und Messung der Extinktionsabnahme im Überstand zur semiquantitativen Bestimmung von polymeren Substanzen der Zelloberfläche.

Durchführung: Probe zentrifugieren, sedimentierte Zellen waschen mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 aufnehmen.
Je 2 ml Zellsuspension mit unterschiedlicher Dichte (maximal 5 g BTS/l) und 200 µl Ruthenium Red Lösung (5 g/l) mischen, Inkubation 3 h, danach zentrifugieren (10 min, 5 000 RPM) Bestimmung der Extinktionsabnahme im Überstand bei 533 nm. Die Resultate sind gegen die Adsorption der entstehenden Oxidationsprodukte bei 734 nm (Ruthenium Braun) und 460 nm (Ruthenium Violett) zu korrigieren.

Quelle: Figueroa, L.A. und J.A. Silverstein: Biotechnol. Bioeng. **33** (1989), 941-947.

d) Adsorption von Kristallviolett an mikrobielle Oberflächen

Prinzip: Anlagerung der kationischen Substanz bevorzugt an anionische Strukturen der Zelloberfläche. Messung der Extinktionsabnahme im Überstand zur semiquantitativen Bestimmung der Kationenkapazität.

Durchführung: Probe zentrifugieren, sedimentierte Zellen waschen mit 10mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0, in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 aufnehmen.
Je 5 ml Zellsuspension mit unterschiedlicher Dichte (maximal 10 gBTS/l) und 10 ml Kristallviolettlösung (20 mMol/l) mischen, Inkubation 2 h, danach zentrifugieren (10 min, 5 000 RPM) Bestimmung der Extinktionsabnahme im Überstand bei 590 nm.

Quelle: Krekeler, C.: Dissertation Technische Universität Braunschweig (1990).

e) **Adsorption von Orange II an mikrobielle Oberflächen**

Prinzip: Anlagerung der anionischen Substanz bevorzugt an kationische Strukturen der Zelloberfläche. Messung der Extinktionsabnahme im Überstand zur semiquantitativen Bestimmung der Anionenkapazität.

Durchführung: Probe zentrifugieren, sedimentierte Zellen waschen mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 7,0 und in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0 aufnehmen.
Je 10 ml Zellsuspension mit unterschiedlicher Dichte (maximal 10 gBTS/l) und 1ml Orange II (20 mMol/l) mischen, Inkubation 1 h, danach zentrifugieren (10 min, 5 000 RPM)
Bestimmung der Extinktionsabnahme im Überstand bei 590 nm.

Quelle: Krekeler, C.: Dissertation Technische Universität Braunschweig (1990).

f) **Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit in Anlehnung an EN ISO 7827**

Prinzip: Direkte Messung des Abbaus organischer Substanzen durch TOC-Messung.

Durchführung:

Versuchsansatz: 2 l Probe (maximal 200 mgTOC/l oder entsprechende Verdünnung mit Leitungswasser)
10 ml Belebtschlamm suspension (je nach Versuchsstellung aus kommunaler Kläranlage oder eigener Stammhaltung, ca. 5 gBTS/l)
Nährsalzkonzentrat für N und P auf eine Endkonzentration C:N:P= 100:5:1
pH-Wert einstellen auf 7.5 mit NaOH oder HCl.

Kontrollansatz: Wie Versuchsansatz + 200 mg/l HgCl.

Zusammensetzung der Nährsalzkonzentrate:

N-Konzentrat: NH_4Cl 30 g auf 1 l aqua dest. (=7,5 mg/ml N)

P-Konzentrat: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ 105 g

KH_2PO_4 15 g

auf 1 l aqua dest. (=14 mgP/ml)

Inkubation: In belüfteten Standzylindern (2l) über 28 d. Der Abbau wird in regelmäßigen Abständen durch Messung des TOC verfolgt. Der Anteil der nicht biologischen Elimination (z.B. durch Strippung) wird aus dem Kontrollansatz ermittelt.

Quelle: EN ISO 7827

g) Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit im respirometrischen Test

Prinzip: Verfolgung des Abbaus organischer Substanzen über den Sauerstoffverbrauch. Im Sapromaten wird der verbrauchte Sauerstoff mittels Druckänderung erfaßt und elektrolytisch nachgebildet. Die dafür notwendige Strommenge dient der Berechnung der Sauerstoffmenge und wird online rechnergestützt erfaßt. Im respirometrischen Test wurde vor allem der Abbau von Reinsubstanzen verfolgt.

Durchführung:

Versuchsansatz: N-Konzentrat: NH_4Cl	30 g auf 1 l aqua dest.	10 ml/l
P-Konzentrat: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	105 g	
KH_2PO_4	15 g	
	auf 1 l aqua dest. pH 7,5	100 ml/l
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g/l	10 ml/l
Spurenelemente*		2 ml/l
Probe (Testsubstanz)		100 mg/l

*Zusammensetzung der Spurenelementelösung:

EDTA	50 g
ZnSO_4	2,2 g
$\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10,8 g
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	5,06 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5 g
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1,1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1,57 g
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,61 g
auf 1l aqua dest.	

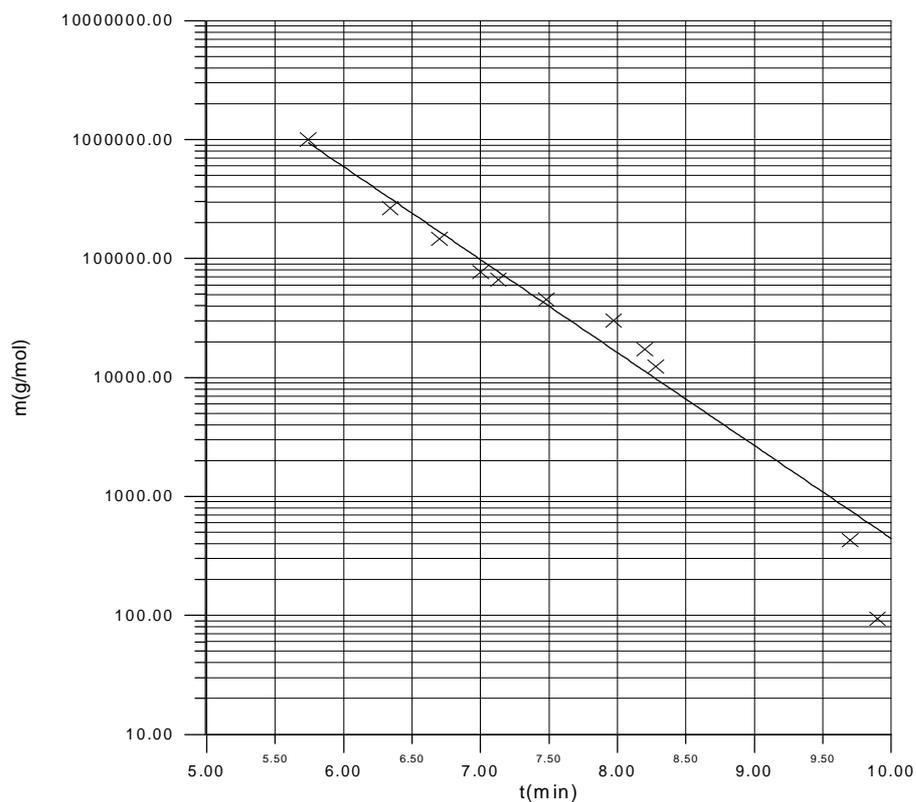
Inkubation: Jeweils 250 ml wurden im Sapromaten bei 25°C über einen Zeitraum von 5 bis 30 Tagen (in Abhängigkeit von der Abbaugeschwindigkeit) inkubiert und der Sauerstoffverbrauch online erfaßt.

Quelle: Labormethode IBT, Spurenelemente nach Arts, P.A.M.; Robertson, L.A. und J.G. Kuenen: FEMS Microbiol. Ecol. **18** (1995), 305-316.

h) Bestimmung der Molekulargewichtsverteilung mittels Gelpermeationschromatographie

Prinzip: Chromatographische Trennung von Makromolekülen nach ihrem stokschen Radius.

Durchführung: Säule und Trennsystem: HPLC System Gold/ Biosep SEC 2000.



A. 1: Eichgerade der verwendeten Trennsäule Biosep SEC 2000 mit Standard-Eichproteinen.

Trennbedingungen: Laufmittel 0,1 M Kaliumphosphat pH 7.0, Flußrate 0,4 ml/min, Detektion DAD (200-500 nm).

Auswertung: Die Auswertung kann auf Grund der DAD-Detektion je nach Fragestellung bei unterschiedlichen Wellenlängen oder über das gesamte Spektrum erfolgen. Vorwiegend wurden 246 nm (Aromaten des Benzoltyps), 274 nm (phenolische Strukturen) und 334nm (chromophore Strukturen der Huminstoffe) für die Auswertung herangezogen.

Quelle: Labormethode IBT nach Herstellerangaben Phenomenex

i) Bestimmung der redoxkatalytischen Aktivität von Trägermaterialien

Prinzip: Katalytische Spaltung von H_2O_2 und Bestimmung der Reaktionsgeschwindigkeit

Durchführung: 100 mg Trägermaterial werden mit 100 ml H_2O_2 (300 mmol/l) inkubiert. Im Abstand von 10 min werden 2 ml Überstand entnommen und der Gehalt an Peroxid jodometrisch gemäß Abschn. bb.6 bestimmt. Aus der Änderung des Peroxidgehaltes wird die katalytische Aktivität des Trägers berechnet.

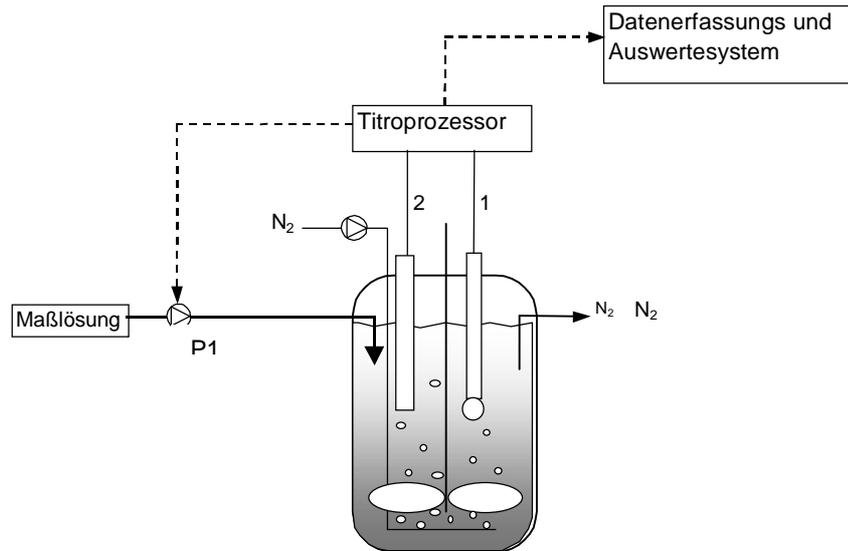
Quelle: Labormethode IBT

j) Charakterisierung der Zelloberflächenladung durch Mikrotitration

Prinzip: Differenztitration einer mikrobiellen Suspension und Auswertung der Volumen-Potentialkurve.

Durchführung: Zellen ernten, zweimal mit 0,9%iger CO_2 -freier Kochsalzlösung waschen, aufnehmen in CO_2 -freier Kochsalzlösung (0,9 % w,v), einstellen auf ca. 5 gBTS/l (über optische Dichte genau bestimmen).
Meßkammer befüllen mit 225 ml CO_2 -freier Kochsalzlösung (0,9 % w,v)
pH-Wert der Meßkammer auf pH 11 einstellen,
25 ml Biomassesuspension zugeben, Gleichgewichtseinstellung des Meßsystems abwarten, dann Titration starten.
Die Titrationsgeschwindigkeit wird automatisch in Abhängigkeit von der Potentialänderung gesteuert. Die Auswertung erfolgt durch Differenzbildung gegen eine zellfreie Kontrolle.

Meßanordnung:



1: Meßelektrode

2: Referenzelektrode

Maßlösung: 0,1M HCl (CO₂-frei)

P1: Präzisionsdosierpumpe Dosimat 665
minimales Dosiervolumen 1µl

Quelle: Labormethode IBT

k) Chromatofocussierung von ganzen Zellen

Prinzip: Die Organismen werden an der Gelmatrix über ionische Wechselwirkungen gebunden und bei kontinuierlicher pH-Änderung am isoelektrischen Punkt eluiert.

Durchführung:

Trennsäule: 100 x 6 mm

verwendetes Gel: Polygel (Pharmacia)

Probe: ca. 1 mg BTS bzw. Testproteine (0,1mg) jeweils in 2-5 ml 25 mM Imidazol pH 7.5

Startpuffer: Imidazol 25 mM pH 7.5

Trennpuffer: Polypuffer (Pharmacia) 1:10 verdünnt

Trennbedingungen: Flußrate 0.4 ml/min, Fraktionen a 2 ml

verwendete Testproteine: Cytochrom C (pI 10,6) gemessen: pI >7,5

Carboanhydrase (pI 5,9) gemessen: pI 5,6 ± 0,1

BSA (pI 4,8) gemessen: pI 4,9 ± 0,1

Quelle: Labormethode IBT

l) Druckextraktion von Schwermetallen aus festen Proben

Prinzip: Saure Druckextraktion mit Salpetersäure im Mikrowellendruckaufschlußgerät.

Durchführung: Untersuchungsmaterial zerkleinern (Mörser) auf Korngröße <0.1mm bei 105°C trocknen (ca. 2 h).
100 mg Probe + 10 ml H₂O +10 ml HNO₃ (65%ig) in Druckbehälter füllen.
Aufschluß P=120 PSI, Leistung 40 % +5 % je Gefäß, T=30 min (20 min bei 120 PSI).

*Bei starker Druckentwicklung u.U. Druck langsam aufbauen (Stufen 20 PSI, 40 PSI, 80 PSI).

Quelle : CEM Applikationen

m) Druckextraktion von Schwermetallen aus flüssigen Proben

Prinzip: Saure Druckextraktion mit Salpetersäure im Mikrowellendruckaufschlußgerät.

Durchführung: 50 ml Probe +5 ml HNO₃ (65%ig, 1:1 verdünnt) in Druckbehälter füllen.
Aufschluß P=80 PSI, Leistung 40 % +5 % je Gefäß,
T=30min (20min bei 80 PSI).

Quelle : CEM Applikationen

n) Extraktion von Lipidphosphaten und Bestimmung des Phosphatgehaltes

Prinzip: Isolation mikrobieller Membranlipide durch Extraktion mit Chloroform/Methanol.

Durchführung: Biofilmpartikel trocknen.
2,5 g Probe mörsern und mit 50 ml Methanol, 25 ml Chloroform und 20 ml H₂O versetzen.

Inkubation 2 h (Rundschüttler (200 RPM), anschließend nochmals 25 ml Chloroform und 20 ml H₂O zusetzen, intensiv durchmischen und über Nacht bei 4°C inkubieren. Chloroformphase mittels Filtration mit Phasenseparationspapier abtrennen.

Zur Phosphatbestimmung Chloroformphase in Druckaufschlußbehälter überführen, Chloroform bei 40°C unter Vakuum abdampfen, mit 5 ml H₂O und 200 mg Oxisolv (oxidierendes Aufschlußreagenz) versetzen und mittels Mikrowellendruckaufschluß (650 Watt, 1,5min) mineralisieren. Phosphat nach Vorschrift A.1. aa15 bestimmen.

Quelle: Hooijmans, C.M.; Abdin, T.A. und Alaerts, G.J.: Appl. Microbiol. Biotechnol. 43 (1995), 781-785

o) Extraktion von PAH aus Bodenproben

Prinzip: Lösungsmittlextraktion hydrophober Verbindungen.

Durchführung: Probe(lufttrocken) 20 g+20 g Na₂SO₄ mörsern
+20 ml Methylenchlorid oder Cyklohexan, 4 h schütteln (Rundschüttler, oder 1 h Ultraschall).

Clean up (wenn erforderlich):

Huminstoffe: 2mal ausschütteln mit 10 ml 10 mM NaOH

Mineralöl: Extrakt mit Cyklohexan herstellen!

Festphasenextraktion an Silikagel 500 mg

Kartusche vorbereiten: 1 Säulenvolumen Methylenchlorid

4 ml Lösungsmittel (Cyklohexan). Probe (1-2 ml) aufgeben

Elution: 2 ml Acetonitril/Benzol 3:1, mit Acetonitril auf 10 ml auffüllen.

Quelle: Labormethode IBT

p) Extraktion und Anreicherung von extrazellulären – und Oberflächenpolysacchariden

Prinzip: Differenzielle Membranfiltration von polymeren Verbindungen aus dem Medium (EPS) bzw. von Polymeren der Zelloberfläche (CPS) nach Komplexierung mit EDTA.

Durchführung:

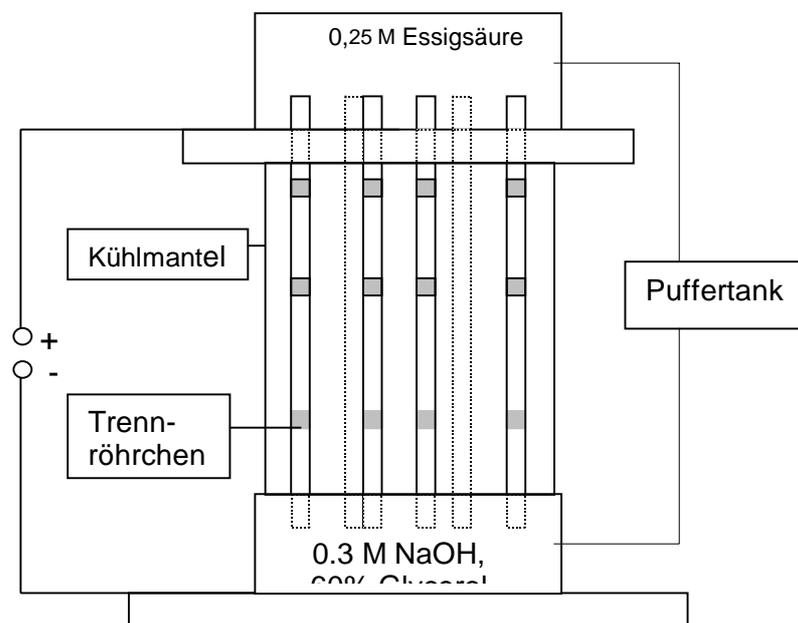
1. Separation von Bakterien und EPS durch Membranfiltration (Filter: Zelluloseacetat 0,45 μm): 50 ml Bakteriensuspension filtrieren. EPS aus dem Filtrat werden gem. Schritt 3 weiter angereichert. Filterkuchen 2 x waschen mit 3 ml eiskaltem Kaliumphosphatpuffer (10 mM, pH 7,0).
2. Separation von CPS: Filterkuchen aufnehmen in 4ml 1mM Na-EDTA (Chelaplex III) in 10 mM Kaliumphosphatpuffer pH 7,0. Inkubation 2 h unter leichtem Schütteln. Danach Zellen und Extrakt trennen (Filterzentrifugation: Centricon 0,22 μm , 15 000 RPM, 30 min oder Filtration: Zelluloseacetatfilter 0,22 μm). CPS aus dem Filtrat werden gem. Schritt 3 weiter angereichert.
3. Filtrate aus Schritt 1 (EPS) bzw. 2 (CPS) mit doppelter Menge Ethanol (100 %) versetzen und Polymere im Eisbad über mindestens 5 h fällen. Sediment separieren durch Zentrifugation (20 min 15 000 RPM), aufnehmen in minimaler Menge aqua bidest. und Fällung wiederholen (mind. 5 h, besser über Nacht). Präzipitat nach Zentrifugation gefriertrocknen oder direkt für Analyse verwenden.

Quelle: Labormethode IBT in Anlehnung an Grobbs, G.J.; van Casteren, W.H.M.; Schols, A.H. Osterveld, A.; Sala, G; Smith, M.R.; Sikkema, J. und J.A.M.de Bont: Appl Microbiol Biotechnol 48 (1997), 516-521.

q) Isoelektrische Fokussierung ganzer Zellen

Prinzip: Trennung von Bakterien anhand ihres isoelektrischen Punktes in einem pH-Gradienten.

Meßanordnung:



Trennröhrchen: 300 mm x 6 mm Innendurchmesser, oben und unten verschlossen mit Dialysemembranen.

Anodenpuffer: 0,25 M Essigsäure

Katodenpuffer: 0,3 M NaOH, 60 % Glycerol

Durchführung:

Gradient: 1 % Ampholyte pH 3-10 , stabilisiert in 10-60 % Glycerol

Probenmenge: ca. 10^6 Zellen, Probe waschen mit aqua dest.

Auftragung: Aus dem Mittelbereich des fertigen Gradienten werden ca. 0.5 ml Ampholin/Glycerol-Gemisch entnommen und die Zellen darin aufgenommen, anschließend wird die Probe wieder in den Entnahmebereich des Röhrchens injiziert.

Trennung: 1600 V mit maximal 1 mA je Röhrchen. Die Trennung war nach durchschnittlich 13 h beendet.

Auswertung: Auftrennung des Gradienten in Fraktionen zu je 0,5 ml und Bestimmung des jeweiligen pH-Wertes. Die Lage der Bakterienzellen im Gradienten ist als diffuse Bande optisch sichtbar.

Quelle: Labormethode IBT

r) Kontaktwinkelmessung

Prinzip: Bestimmung des Kontaktwinkels eines Flüssigkeitstropfens auf einer Oberfläche.

Durchführung: Geeignete Bakterienkultur (ca. 50 ml, üblicherweise 24 h alt) über Zelluloseacetatfilter (42 mm, 0,45 μ m Porendurchmesser) filtrieren. Dabei muß ein geschlossener bakterieller Film entstehen (wenn erforderlich Probevolumen erhöhen), waschen mit 20 ml aqua dest. und mit doppelseitigem Klebeband auf einem Objektträger fixieren. Bestimmung des Kontaktwinkels am OCA 5 zu unterschiedlichen Zeiten. Ausgewertet werden nur Meßwerte, die keine Abhängigkeit vom zeitlichen Verlauf mehr erkennen lassen (Plateauwinkel).

Quelle: Van Oss C.J. :Colloids Surfaces **B 5** (1995), 91-110

s) MATH- Test (Microbial adhesion to Hexadecane)

Prinzip: Bestimmung der Verteilung von Mikroorganismen zwischen Hexadecan und Wasser.

Durchführung: Kultur zentrifugieren, Sediment zweimal waschen mit 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0, in 0,1 M Kaliumphosphatpuffer, pH 7.0 aufnehmen. Die Zellsuspension wird anhand der optischen Dichte auf einen Gehalt von ca. 0,4 g/l BTS eingestellt und die genaue Extinktion bei 400 nm bestimmt.

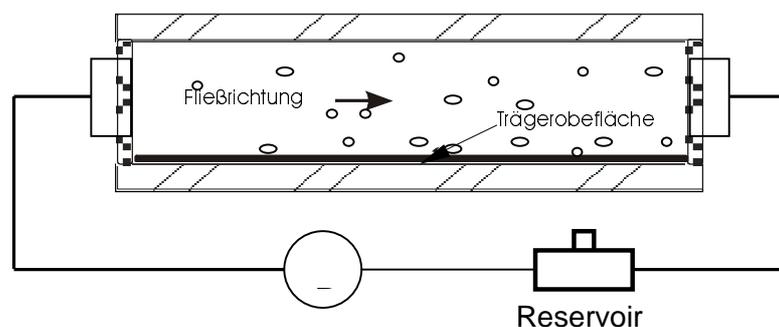
4 ml Bakteriensuspension werden mit 2 ml Hexadecan versetzt und 2 min intensiv durchmischt (Vortex Mixer), nach einer 10 minütigen Phasentrennung wird die Extinktion in der wäßrigen Phase bei 400 nm bestimmt. Aus der Differenz der Extinktionen vor und nach dem Durchmischen kann der Anteil adsorbierter Zellen an der Hexadecanphase ermittelt werden.

Quelle: Pelletier, C.; Bouley, C.; Cayuela, C.; Bouttier, S.; Bourlioux, P. und M.-N. Bellon-Fontaine: Appl. Environ. Microbiol. **63** (1997), 1725-1731.

t) Messung der bakteriellen Adhäsion unter dynamischen Bedingungen in der Parallelplattenkammer

Prinzip: Die Mikroorganismen werden horizontal im Flüssigkeitsstrom transportiert, sinken dabei ab und treten in Wechselwirkung mit einer inneren Oberfläche auf der Unterseite der Kammer. Dabei wirkt die Adhäsion den Scherkräfte des Flüssigkeitsstromes entgegen.

Meßanordnung:



Maße der Meßkammer: Länge 76 mm
 Breite 12 mm
 Kammerhöhe 1,2 mm

Durchführung:

Verwendete Bakteriensuspension: je 100 mgBTS/l, Medium variabel (0,1 M Kaliumphosphat, pH 7,0, PBS oder Kaliumchlorid in unterschiedlicher Konzentration).

Flußrate: 2-150 cm/min

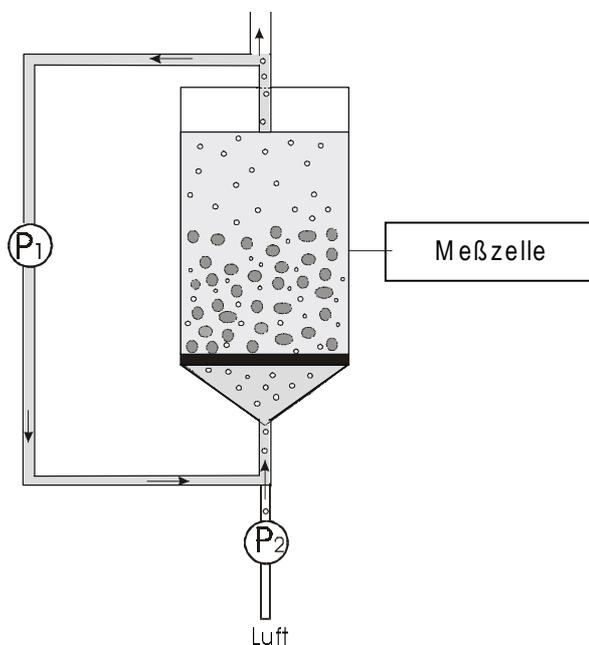
Auswertung: Die Zahl der adsorbierten Zellen wird durch direkte mikroskopische Zählung oder aus der Abnahme der Zelldichte in der Suspension ermittelt.

Quelle: Busscher, H.J. und H.C. van der Mei: Methods Enzym. 253 (1995), 455-477

u) Messung der bakteriellen Adhäsion unter dynamischen Bedingungen in der Wirbelschicht

Prinzip: Bestimmung der Anlagerung von Mikroorganismen an sphärische Partikel während der Durchmischung in der Wirbelschicht.

Meßanordnung:



Durchführung: Zellkultur zentrifugieren (5 000 RPM, 10 min), 2 x waschen mit 10 mM Kaliumphosphatpuffer, resuspendieren in Kaliumphosphatpuffer, optische Dichte einstellen auf ca. 5 gBTS/l.
Meßzelle befüllen mit 20 ml Trägermaterial und 200 ml Bakteriensuspension. Kurz durchmischen, Optische Dichte der Ausgangssuspension bestimmen. Wirbelschicht einstellen mit Pumpe P₁ (Flüssigkeitsstrom) oder P₂ (Gasstrom). Bestimmung der Adsorption durch Abnahme der Optischen Dichte im Überstand.

Quelle: Labormethode IBT

v) Visualisierung der Biofilmstruktur im Rasterelektronenmikroskop

Prinzip: Elektronenmikroskopische Betrachtung der äußeren Biofilmoberfläche nach Sputtern mit Gold.

Durchführung: Ganze bewachsene Trägerpartikel werden auf selbsthaftende Träger montiert. Anschließend werden die Proben vakuumgetrocknet und mit Gold unter Argonatmosphäre gesputtert (Vakuumbedampfungseinheit SCD 004, 200 s, 35 mm Abstand, 20 mA). Die Betrachtung der goldbeschichteten Proben erfolgt am Rasterelektronenmikroskop bei einer Kathodenspannung von 20 kV.

Quelle: Labormethode Inst. für Zoologie Univ. Halle

w) Visualisierung der Biofilmstruktur durch Fluoreszenzfärbung

Prinzip: Markierung lebender und toter Zellen mit spezifischen DNA-Farbstoffen und mikroskopische Visualisierung der Fluoreszenz.

Durchführung: Probe (ca. 200 µl) abzentrifugieren, 2 x waschen in BSA-Lösung*, aufnehmen in 50 µl BSA-Lösung, 3 µl Fluoreszenzmarker** zusetzen, Inkubation 15 min (suspendierte Zellen) bis 24 h im Dunkeln. 10 µl ausplattieren auf Objektträger und im Fluoreszenzmikroskop auswerten. Auswertung mit spezifischen Filtern (DAPI: 360 nm/460 nm Anregung/Emission, Sytox Green: 500 nm/ 520 nm) oder Breitband-Filter-Set zur simultanen Betrachtung vitaler (blau) und geschädigter Zellen (grün).

* BSA-Lösung: 0,25 % Rinderserumalbumin in 0,15 M NaCl.

** Fluoreszenzmarker: 1 mg/ml DAPI im Wasser lösen. Unmittelbar vor Gebrauch 3 µl DAPI- Lösung mit 3 µl Sytox Green-Lösung mischen und mit aqua bidest. auf 60 µl auffüllen.

Quelle: Labormethode IBT adaptiert nach Herstellerangaben von Molecular Probes (Oregon)

x) Visualisierung zelloberflächengebundener Polysaccharide durch Transmissionselektronenmikroskopie nach Färbung mit Ruthenium Red

Prinzip: Visualisierung zelloberflächengebundener Polysaccharide mit Ruthenium Red und nachfolgende Negativkontrastierung mit Uranylacetat.

Durchführung: 2 ml Zellkultur abzentrifugieren, 2 x waschen in PBS*, aufnehmen in 2 ml Ruthenium Red Lösung**, Inkubation 1 h, danach zweimal vorsichtig waschen mit PBS (Zentrifugation 2 min 2000 RPM, aufnehmen durch schwenken in PBS).
Negativkontrastierung ca. 3 h mit 1% Uranylacetat in Cacodylatpuffer (0,1 M , pH 7,2). Anschließend waschen mit aqua bidest., trocknen im Vakuum.

* PBS: 8 g NaCl; 2 g KCl; 1,2 g Na₂HPO₄; 0,2 g KH₂PO₄ auf 1 l H₂O bidest. (pH 7,2)

** Ruthenium Red Lösung: 0,5 mg/ml Ruthenium Red in PBS unmittelbar vor Gebrauch 0,9 % Glutaraldehyd zusetzen.

Quelle: Schaule, G. Dissertation, Forschungs- und Entwicklungsinstitut für Industrie- und Siedlungswasserwirtschaft sowie Abfallwirtschaft e.V. Stuttgart (1992).

y) Visualisierung zelloberflächengebundener Polysaccharide durch Transmissionselektronenmikroskopie nach Färbung mit Con.A-Gold-Konjugat

Prinzip: Visualisierung zelloberflächengebundener Polysaccharide durch Aggregation mit Con.A und nachfolgende Negativkontrastierung mit Uranylacetat.

Durchführung: 100 µl Zellkultur abzentrifugieren, 2 x waschen in PBS*, aufnehmen in 50 µl Con.A-Gold-Konjugat**, Inkubation 1 h, danach zweimal vorsichtig waschen mit PBS (Zentrifugation 2 min 2000 RPM, aufnehmen durch schwenken in PBS).

Negativkontrastierung ca. 3 h mit 1% Uranylacetat in Cacodylatpuffer (0,1 M, pH 7,2). Anschließend waschen mit aqua bidest., trocknen im Vakuum.

* PBS: 8 g NaCl; 2 g KCl; 1,2 g Na₂HPO₄; 0,2 g KH₂PO₄ auf 1 l H₂O bidest. (pH 7,2)

** ConA-Gold-Konjugat: 10 ml kolloidale Goldsuspension mit 100 µg Con.A 5 min intensiv mischen. Anschließend 1 ml 1% Polyethylenglycol (MG 20 000 Da) in PBS zusetzen. Zentrifugieren (1 h bei 15 000 RPM). Sediment aufnehmen in 0,5 ml 0,02% Polyethylenglycol in PBS.

Quelle: Morioka, H.; Tachibana, M und A. Suganuma: J. Bacteriol. **169** (1987), 1358-1362.

z) Visualisierung ausgewählter Strukturelemente zelloberflächengebundener Polysaccharide durch fluoreszenzmarkierte Lectine

Prinzip: Reaktion fluoreszenzmarkierter Lectine mit spezifischen Strukturelementen von Polysacchariden der Zelloberfläche.

Durchführung: 100 µl Zellkultur abzentrifugieren, 2 x waschen in BSA-Lösung*, aufnehmen in 50 µl BSA-Lösung, 2,5 µl Lectinkonjugat** zusetzen, Inkubation 1 h im Dunkeln. Danach vorsichtig abzentrifugieren (5 000 RPM, 2 min) und aufnehmen in 50 µl BSA-Lösung. 10 µl ausplattieren auf Objektträger und im Fluoreszenzmikroskop auswerten.

Filter: Texas-Red 600 nm/ 620 nm

Fluorescein: 500 nm/ 520 nm

* BSA-Lösung: 0,25 % Rinderserumalbumin in 0,15 M NaCl.

** Lectin-Konjugat: 2 mg des jeweiligen Konjugates in 1ml 0,1M Natriumhydrogenkarbonatpuffer (pH 8,3) lösen.

Quelle: Labormethode IBT adaptiert nach Herstellerangaben von Molecular Probes (Oregon)

aa) Zetapotentialmessung

Prinzip: Messung der elektrophoretischen Mobilität der Zellen mittels Laser-Doppler-Technik.

Durchführung: Zellen ernten, zweimal mit NaCl (10 mM, CO₂-frei) waschen, aufnehmen in 10 mM NaCl (CO₂-frei), einstellen auf ca. 0,1 g BTS/l (über optische Dichte genau bestimmen) und bis zur Messung im Eisbad aufbewahren. 2 ml Zellsuspension unmittelbar vor der Messung mit CO₂-freiem H₂O aqua bidest. verdünnen und pH-Wert mit 0,1 N HCl bzw. 0,1 N NaOH einstellen. Potentialmessung erfolgt sofort nach Einstellung des pH-Wertes am Zetameter.

Quelle: Van der Mei, H.C.; Weerkamp A.H. und H.J. Busscher: FEMS Microbiol. Lett. **40** (1987), 15-19.

bb) Quantitative Analysenverfahren

bb.1. Bestimmung des CSB

Prinzip: Thermische Oxidation mit Kaliumdichromat (Cr⁷⁺).
Rücktitration des unverbrauchten Cr⁷⁺ mit Fe²⁺.

Durchführung: 20 ml Probe (max. 300 mg/l CSB)
+ca. 250 mg HgSO₄, nach ca. 2 min 5 ml 0,1 N K₂Cr₂O₇ und unter Kühlung 25 ml Ag₂SO₄-haltige konz. Schwefelsäure* zugeben
2 h kochen unter Rückfluß bei 148 °C.
Nach Abkühlen auf 100 ml auffüllen, unverbrauchtes Dichromat mit 0,025 M Ammoniumeisen(II)sulfat** zurück titrieren.

* 1 l konz. Schwefelsäure mit 10 g AgSO₄ versetzen.

** 0,025 Mol Ammoniumeisen(II)sulfat in 1 l aqua bidest. lösen, 10 ml H₂SO₄ zugeben.

Berechnung: $CSB = (V_b - V_t) \cdot F \cdot f_a / V$

V_b: Verbrauch Ammoniumeisensulfatlösung für Blindwert

V_t: Verbrauch Ammoniumeisensulfatlösung für Probe

F : Faktor der Maßlösung

f_a: Äquivalenzfaktor mg O je l verbrauchte Ammoniumeisensulfatlösung

V: Probevolumen

Quelle: DIN 38 409

bb.2. Ionenchromatographische Bestimmung von Anionen mittels HPLC

Prinzip: Chromatographische Trennung an Ionenaustauscherphase, indirekte UV-Detektion.

Durchführung:

Säule und Trennsystem: Isokratisches HPLC System / Trennsäule IC AN1

Trennbedingungen: Laufmittel 0,249 g / l Phthalsäure / 300 mmol/l Borsäure mit Tris auf pH 4,2 einstellen.

Flußrate 1,2 ml/min, Detektion DAD 254 nm.

Standardgemisch: Cl^- , NO_2^- , NO_3^- , Br^- , SO_4^{2-} , $\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ je 10 mg/l als Na-Salze.

Quelle: Herstellerangaben der Trennsäule

bb.3. Ionenchromatographische Bestimmung von Kationen mittels HPLC

Prinzip: Chromatographische Trennung an Ionenaustauscherphase, indirekte UV-Detektion.

Durchführung:

Säule und Trennsystem: Isokratisches HPLC System / Trennsäule IC Ca

Trennbedingungen: Laufmittel Cer(III)chlorid 10 $\mu\text{Mol/l}$

Flußrate 1 ml/min, Detektion DAD 254 nm

Standardgemisch: Li^+ , Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Ca^{2+} je 10 mg/l als Chloride

Quelle: Herstellerangaben der Trennsäule

bb.4. DNA-Bestimmung

Prinzip: Extraktion mit Perchlorsäure und Nachweis der DNA mit Diphenylamin (photometrisch) oder mit Hoechst 33258 (fluorimetrisch).

Durchführung: Probe (2,5 g Träger) trocknen (20 h bei 105 °C) davon ca. 2 g + 6 ml 0,25 m HClO_4 bei 0 °C 30 min schütteln, Überstand verwerfen. +6 ml 0,5 m HClO_4 , Extraktion 30 min bei 70 °C.

Extraktion eventuell wiederholen und Überstände vereinigen.

Nachweis photometrisch: 1 ml Überstand + 2 ml Diphenylaminreagenz*

Inkubation 17 h bei 30 °C, messen bei 600 nm am Photometer

Nachweis fluorimetrisch: Extrakt 1:100 verdünnen, 100 μl Extrakt + 100 μl Hoechst 33258**

messen am Fluoreszenzphotometer (360 nm/460 nm)

*Diphenylaminreagenz: Lösung A: 1,5 g Diphenylamin lösen in 100 ml Eisessig
+1,5 ml konz. Schwefelsäure.

Lösung B: 16 mg Acetaldehyd in 1ml Wasser lösen.

Vor Gebrauch 20 ml Lösung A mit 0.1 ml Lösung B mischen.

** Hoechst 33258: Verdünnung 2,5 µl/ml nach Herstellerangabe

Störungen: Fluoreszenz kann durch fluoreszierende Verunreinigungen gestört werden.

Dann photometrische Bestimmung verwenden.

Meßbereich: Photometrisch 5 µg/ml bis 50 µg/ml

fluorimetrisch: 0,1 µg/ml bis 1 µg/ml

Quelle: Photometrische Bestimmung: Thomanetz, E.; Serandio, A.; Bardke, D.
GWF- Wasser/Abwasser 124 (1983), H.1, 1

Fluorimetrische Bestimmung: Herstellerangabe Molecular Probes

bb.5. Bestimmung von Neutralzuckern mittels HPLC

Prinzip: Chromatographische Trennung an RP-phase nach Derivatisierung.

Durchführung:

Säule und Trennsystem: HPLC System Gold/ Supersphere RP 18.

Probenvorbereitung:

- Hydrolyse von Polymeren: ca. 5 mg Probe (z.B. CPS aus Abschnitt I) + 1ml TFA (2 Mol/l)
1 h bei 120°C in druckfesten Quarzröhrchen hydrolysieren. TFA
anschließend unter Vakuum abtrennen. Rückstand für Derivatisierung
verwenden.

- Derivatisierung: 30 µl Probe + 80 µl ABEE-Reagenz* 1 h bei 80°C inkubieren.
Anschließend mit 600 µl H₂O und 400 µl Chloroform versetzen und
intensiv ausschütteln. Sediment bei 12 000 RPM abzentrifugieren,
obere Wasserphase nochmals mit 400 µl Chloroform ausschütteln.
Wasserphase nach Zentrifugation für HPLC-Trennung verwenden.

*ABEE-Reagenz: 165 mg ABEE (p-Aminobenzoessäure-Ethylester)

35 mg Natriumcyanoborhydrid

41 µl Eisessig

350 µl Methanol

Trennbedingungen: Laufmittel Acetonitril/H₂O/TFA

A: 90 % H₂O, 10 % Acetonitril, 0,1 % TFA.

B: 100 % Acetronitril, 0,1 % TFA

Gradient: 100 % A, von 5 min bis 10 min auf 50 % B, ab 15 min auf 100 % A. Gesamtzeit pro Trennung ca. 20 min.
Flußrate 1 ml/min, Detektion DAD (200-500nm).

Auswertung: Quantifizierung gegen Standard bei 300 nm.

Quelle: Labormethode adaptiert von Inst. für Mikrobiologie Univ. Halle

bb.6. Bestimmung von organischen Peroxiden

Prinzip: Oxidation von KJ und Rücktitration des freigesetzten Jod

Durchführung: 2 ml Probe + 1 g KJ +10 ml Essigsäureanhydrid
gebildetes Jod titrieren mit 0,1 N NaS₂O₃. Indikator: lösliche Stärke

Störungen: Wasserstoffperoxid und starke Oxidationsmittel werden mit erfaßt.

Meßbereich: 10 mmol/l - 300 mmol/l

Quelle : Beyer Lehrbuch der organischen Chemie

bb.7. Bestimmung von Phenolderivaten mittels HPLC

Prinzip: Chromatographische Trennung an RP-Phase.

Durchführung:

Säule und Trennsystem: HPLC System Gold/ Polysphere RP8

Trennbedingungen: Laufmittel Acetonitril/H₂O/Eisessig.

A: 38 % Acetonitril/ 1 % Eisessig/ 59 % H₂O

B: 99 % Acetronitril/ 1 % Eisessig

Gradient: 100 % A, von 2 min bis 15 min auf 6 % B, ab 45 min auf 100% A. Gesamtzeit pro Trennung ca. 50 min.

Flußrate 0,6 ml/min, Detektion DAD 280 nm (Standardgemisch EPA 8040 Phenole Supelco 1:100).

Quelle: Labormethode IBT

bb.8. Bestimmung von Polycyclischen Aromatischen Kohlenwasserstoffen mittels HPLC

Prinzip: Chromatographische Trennung an RP-Phase.

Durchführung: Säule und Trennsystem: HPLC System Gold/ Vydac PAH

Trennbedingungen: Laufmittel Acetonitril/H₂O

A: 50 % Acetonitril

B: 100 % Acetronitril

Gradient: 100 % A, von 2 min bis 20 min auf 80 % B, ab 32 min auf 100%
A. Gesamtzeit pro Trennung ca. 40 min.
Flußrate 1 ml/min, Detektion DAD 254 nm (Standardgemisch EPA 610
PAH Supelco 1:50).

Quelle: Labormethode IBT

bb.9. Photometrische Bestimmung von Ammonium

Prinzip: Bildung von Kaliumjodamalgan mit HgCl und KJ.

Durchführung: 5 ml Probe mit 0,2 ml Tartratlsg* und 0,2 ml Neßlers Reagenz** versetzen
nach genau 5-10 min messen bei 425nm.

*Tartratlsg: 100g K-Natriumtartrat in 200ml Wasser unter Erwärmen lösen,
10ml Neßlers Reagenz zusetzen.

**Neßlers Reagenz: 100 g HgCl+70 g KJ in möglichst wenig Wasser
lösen, mit NaOH (160 g in 500ml Wasser) mischen, auf 1 l auffüllen (begrenzt haltbar)

Störungen: Huminsäure filtrieren, 0,5 g NaOH zusetzen + 2 g Aktivkohle je 200 ml.
Bei sehr salzarmem Wasser 0,1 g NaCl zusetzen.
H₂S mit Cd-acetat od. Zinkacetat ausfällen.

Meßbereich: 0,1 mg/l - 5 mg/l

Quelle : Höll, K.: Wasser, Untersuchung Beurteilung Aufbereitung
Chemie Bakteriologie Biologie; Berlin 1968

bb.10. photometrische Arsenbestimmung

Prinzip: Ausbildung eines Farbkomplexes von Silberdiehydithiocarbaminat mit
As und Sb.

Durchführung:

Adsorptionsgefäß mit 6 ml Silberdiehydithiocarbaminatlösung* befüllen,

Zwischenstück mit Bleiacetatwolle** befüllen,

Standkolben füllen mit: 250 ml Probe

20 ml H₂SO₄ (10 Mol/l)

8 ml KJ-Lösung (15%ig w/v)

2 ml SnCl₂ (40 g in 100 ml 25%ige HCl (bei Anwesenheit von Sb 4ml)

nach 10 min 12 g Zink verkupfert*** zusetzen

nach 60 min Inhalt des Adsorptionsgefäßes in Küvette überführen und messen bei 546 nm.

*Silberdiethyldithiocarbaminat: 1 g in 200 ml Pyridin lösen (lichtgeschützt aufbewahren!)

**Bleiacetatwolle: Glaswolle in Bleiacetatlösung (10%ig) tränken und bei 120°C trocknen

***100g Zink gekörnt werden mit 100 ml 1%iger CuSO₄

verkupfert (einheitlich schwarz). .Anschl. spülen und trocknen

Störungen: Sb wird durch SnCl₂ beseitigt.

Störwirkung durch H₂S durch Behandlung der Glaswolle mit Bleiacetat (siehe Durchführung).

Meßbereich: 0.002-0.1mg/l

Quelle :Merk: Die chemische Untersuchung von Wasser

bb.11. Photometrische Bestimmung von Hexosaminen

Prinzip: Modifizierte Elson-Morgan-Reaktion.

Durchführung: 1 ml Probe (eventuell vorher hydrolysieren)

+ 1 ml KHSO₄ (5%ig)

+ 1 ml NaNO₂ (5%ig), kurz schütteln und 15 min inkubieren,

+ 1 ml NH₄SO₃NH₂ (12,5%ig), 5 min intensiv durchmischen,

+ 1 ml MBTH*, Inkubation 60 min,

+ 1 ml FeCl₃ (0,5%ig) (Reagenz täglich frisch ansetzen)

Inkubation 30 min, messen bei 650 nm

* MBTH-Reagenz: 0,5 % 3-Methyl-2-Benzothiazolon-Hydrazon * HCl in H₂O täglich frisch

Meßbereich: 1 mg/l – 30 mg/l

Quelle: Tsuji et al.: Chem. Pharm. Bull. 17(1969), 1505-1510

bb.12. Photometrische Nitritbestimmung

Prinzip: Diazotierung mit Sulfanilsäure und anschließende Azokupplung

Durchführung: 5 ml Probe+2 ml SA/NED*-REAGENZ**

Messung nach 20 min bis 2 h bei 540 nm

*NED: N(-1 Naphtyl)-Ähylendiamindihydrochlorid

**SA/NED-REAGENZ: 1 % Sulfanilamid in 1,5 N HCl und 0,02 % NED 1:1 vor Gebrauch frisch ansetzen und 1:1 mit Wasser verdünnen.

Störungen: Chlorid und Schwefelwasserstoff (ausgasen)

bei Huminwässern vorher mit Aktivkohle und NaOH ausschütteln

(auf 200 ml 0,5 g NaOH und 2 g Aktivkohle) und anschließend filtrieren.

Meßbereich: 0,005 - 1 mg/l

Quelle : Griess-Ilosvay in Snell und Snell (1949):Colorimetric methods of analysis Vol.2, p. 804, New York

bb.13. Photometrische Bestimmung von Neutralzuckern

Prinzip: Saure Hydrolyse der Zucker und Bestimmung des Phenolfarbkomplexes der Monomeren.

Durchführung: 200 µl Probe + 200 µl 5 % Phenol (w.v.) in H₂O
nach 10 min intensiv durchmischen
messen nach 30 min bei 490 nm

Meßbereich: 5-500 mg/l Alginat bzw. Glucose (1 mg/l - 200 mg/l)

bb.14. Photometrische Bestimmung phenolischer Verbindungen (Kupplungsfähige Stoffe)

Prinzip: Umsetzung mit diazotiertem p-Nitroanilin zu rotem Azofarbstoff.

Durchführung: 5 ml Probe + 0,2 ml 1 M Na₂CO₃ + 0,4 ml diazotiertes p-Nitroanilin*,
Inkubation 15 min (max. 30 min).
Messung bei 495nm.

* p-Nitroanilin: 5 ml p-Nitroanilin (5 mM in 0,15 N HCl) mit 0,1 ml NaNO₂ (5%ig) mischen
(Mischung max. 1 h haltbar).

Störungen: Sulfide, Cyanide mit CuSO₄ beseitigen,
org. Säuren mit Borat/Phosphatpuffer pH 10,4 abpuffern.

Meßbereich: 0.05 - 5mg/l

Quelle : Höll, K.: Wasser, Untersuchung Beurteilung Aufbereitung
Chemie Bakteriologie Biologie; Berlin 1968

bb.15. Photometrische Phosphatbestimmung

Prinzip: Bildung eines Phosphomolybdänkomplexes mit Orthophosphat.

Durchführung: 5 ml Probe + 0,1 ml Molybdänschwefelsäure* + 12 µl Zinndichlorid**,
messen nach 20 min bei 665nm.

* Molybdänschwefelsäure: 1 Teil 10%ige Ammoniummolybdatlsg.
mit 3Teilen 50 vol% Schwefelsäure mischen.

** Zinndichlorid x 2H₂O 10%ig in konzentrierter HCl lösen und 1:4 verdünnen. Reagenz
täglich frisch bereiten.

Störungen: Reduzierende Stoffe verhindern Farbbildung.

Meßbereich: 0.05 mg/l – 5 mg/l

Quelle : Höll, K.: Wasser, Untersuchung Beurteilung Aufbereitung
Chemie Bakteriologie Biologie; Berlin 1968

bb.16. Photometrische Bestimmung von Sulfid

Prinzip: Bildung von Methylenblau.

Durchführung: 100 ml Maßkolben mit 10 ml 1M Zinkacetat beschicken,
+ 50 ml Probe
+ 10 ml Phenylendiamin*
sofort 0,5 ml Ammoniumeisen(III)-sulfat** zusetzen,
Inkubation 10 min bei Zimmertemperatur, anschließend auf 100 ml auffüllen
Messung bei 670 nm.

*Phenylendiamin: 2 g N,N-Dimethyl-p-Phenylendiammoniumchlorid mit 200 ml Wasser
anschlämmen +200 ml Schwefelsäure konz., auf 1 l auffüllen.

**Ammoniumeisen(III)sulfat: 50 g mit 10 ml Schwefelsäure konz. übergießen und
mit Wasser auf 500 ml auffüllen.

Störungen: stark reduzierende Stoffe vermindern Farbintensität:
Sulfite >200 mg/l, SCN>5 mg/l.
Nitrite bis 0.5 mg/l mit Harnstofflösung beseitigen (Störung
ab 0.2 mg/l).

Meßbereich: 0.02 mg/l – 20 mg/l S⁻

Quelle : DEV D7

bb.17. Photometrische Bestimmung von Uronsäuren

Prinzip: Farbreaktion in schwefelsaurer Lösung mit m-Hydroxydiphenyl

Durchführung: 0,2 ml Probe + 1,2 ml H₂SO₄/Tetraborat*
kühlen auf 0°C (Eisbad), kräftig durchmischen, danach 20 µl Diphenylreagenz**
zusetzen.
Nach 5 min messen bei 520 nm

* H₂SO₄-Tetraborat: 0,0125 M Na-Tetraborat in konz. H₂SO₄ lösen.

**Diphenylreagenz: 0,15% m-Hydroxyphenyl in 0,5% NaOH.

Meßbereich : 5mg/l - 100 mg/l

Quelle : Bitter, T. und H.M. Muir: Analytical Biochemistry 54 (1973), 484-489

A.2 Geräte und Chemikalien

A.2.1 Verwendete Geräte und Materialien

AOX/EOX/POX-Analysator (Deutsche Metrohm)

Atomabsorptionsspektrometer Solar 929 (Flamme bzw. Kaltdampfleinrichtung) (Unicam)

BSB-Meßplatz Oxitop 12 (WTW)

CSB-Meßplatz TRS 100 (Behr)

Epifluoreszenzmikroskop Axioskop (Zeiss Jena), Videoauswerteeinheit GL 700 (Panasonic)

Fluoreszenzphotometer F4500 (Hitachi)

HPLC-Meßplatz SystemGold mit DAD (Beckman Instruments)

HPLC Meßplatz isokratisch mit UV und LF-Detektor (Merk)

HPLC-Säulen: Biosep SEC 2000 (Gelpermeationschromatographie) (Phenomenex)

IC CA (Kationentrennung) (Merk)

IC AN1 (Anionentrennung) (Merk)

Vydac PAH (PAH-Bestimmung) (Phenomenex)

Polysphere RP 8 (Bestimmung von Phenolderivaten) (Merk)

Supersphere RP 18 (Bestimmung von Neutralzuckern) (Merk)

Filterkonzentratoren Centrisart-C 30, 3 ml 0,45 µm (Satorius)

Gaschromatographischer Meßplatz GC 14a mit Probengeber, Dektektion FID/ECD (Shimatsu), Kapilarsäule SPB 5 (30 m) (Supelco)

Kontaktwinkelmeßgerät OCA 5 (Data Physics)

Korngrößenanalysator KS 100 (Retsch)

Membranfilter Zelluloseacetat 0,45µm bzw. 0,22µm, d=42mm (Sartorius)

Membranfilter Zellulosenitrat 0,45µm, d= 42mm (Millipore)

Membranfilter Polycarbonat chloridfrei, d=42mm (Millipore)

Mikrowellenaufschlußgerät MSD 2000 (CEM)

Peristaltikpumpe 8 Kanal elektronisch ansteuerbar (Werder-Watson-Marlow)

Peristaltikpumpe 4 Kanal Typ Reglo (Ismatec)

Phasenseparationsfilterpapier 1PS (Whatman)

pH Präzisionselektrode 6.0133 (Metrohm)

Referenzelektrode 6.0729 mit Schlifffdiafragma und Abschirmung (Metrohm)

Präzisionsdosierpumpe Dosimat 665 (Deutsche Metrohm)

Rasterelektronenmikroskop S-2400 (Hitachi)

Respirometer Sapromat E (Bühler)

Spektralphotometer UVICON 300 und 420 (Kontron Instruments)

Titroprozessor 686 (Metrohm)
 Transmissionselektronenmikroskop BS 500 (Tesla)
 TOC-Analysator DOMATOC 100 (Dimatec)
 Vakuumbedampfungseinheit SCD 004 (Balzers)
 Zetameter Zetamaster 3000 (Malvern Instruments)

A.2.2 Verwendete Chemikalien

Ampholin Pharmalyt pH 3-10	Pharmacia
Acetonitril für die HPLC "Lichrosolv"	Merk
Alcian Blue 8 GS	Roth
Carboanhydrase (Standard für die IEF)	Serva Heidelberg
Concanavalin A	Molecular Probes, Oregon
Concanavalin A-Texas-Red-Konjugat	Molecular Probes, Oregon
Cytochrom C (Standard für die IEF)	Serva Heidelberg
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol)	Molecular Probes, Oregon
Dextranblau	Merk
Kolloidale Goldlösung	Fluka
Kristallviolett	Merk
Markerproteine (Molekulargewichtsstandards MG: 12 300- 145 900)	Merk
Carboanhydrase	
Cytochrom C	
Lactatdehydrogenase	
Myoglobin	
Ovalbumin	
Ovotransferrin	
Oregon Green (2',7'-Difluoro-Fluoreszin)	Molecular Probes, Oregon
Orange II	Fluka
Polypuffer 74 pH 4-7	Pharmacia
Polypufferaustauscher PBE 94	Pharmacia
Rinderserumalbumin p.a.	Serva
Rinderserumalbumin (Standard für die IEF)	Serva
Standardgemisch EPA 610 16 PAH	Supelco
Standardgemisch EPA 8040 Phenole	Supelco
Sytox Green Fertiglösung in DMSO	Molecular Probes, Oregon

Weizenkeim-Agglutinin-Texas-Red-Konjugat Molecular Probes, Oregon

Alle nicht explizit aufgeführten Chemikalien waren von Reinheitsgrad p.a. und wurden von anerkannten Herstellern wie Aldrich, Beker, Merk, Pharmacia oder Sigma bezogen.

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen 1991 und 1999 an Wissenschaftsbereich Bioingenieurtechnik, dem heutigen Institut für Biotechnologie der Martin-Luther-Universität. Mein Dank gilt dem Fachbereich Biochemie/Biotechnologie und insbesondere dem Institut für Biotechnologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. R. Rudolph für die Bereitstellung der guten Arbeitsmöglichkeiten.

Mein besonderer Dank gilt meinen akademischen Lehrern, den Herren Prof. Dr. H. Reinbothe, Prof. Dr. D. Schlee und Prof. Dr. R. Schulze die mich in die Methodik des selbständigen wissenschaftlichen Arbeitens eingeführt haben. Herrn Prof. Dr. R. Schulze danke ich weiterhin für die umfangreiche Förderung im Anfangsstadium und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeiten.

Frau Prof. Dr. R. Ulbricht-Hofmann danke ich für ihr stetes Interesse am Fortgang der Arbeiten und die fördernde Diskussion der Arbeitsergebnisse.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Prof. Dr. H. Köser und den Mitarbeitern des Lehrstuhles für Umweltschutztechnik der Martin-Luther-Universität für die erfolgreiche Zusammenarbeit und die fruchtbringende Diskussion der Forschungsergebnisse.

Dies gilt in besonderer Weise auch für Herrn Prof. Dr. J.R. Andreesen und die Mitarbeiter des Institutes für Mikrobiologie, die mir bei allen mikrobiologischen Fragestellungen stets hilfreich zur Seite standen.

Herrn Dr. G. Tschuch vom Institut für Zoologie danke ich für die Durchführung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen.

Bedanken möchte ich mich vor allem auch bei meinen Mitarbeitern und den Diplomanden der Arbeitsgruppe Umweltbiotechnologie, die in wechselnder Zusammensetzung über viele Jahre durch ihre erfolgreiche Tätigkeit wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfaßt, andere als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die den benutzten Werken, wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle/Saale, Mai 2000

Dr. Marion Martienssen

Lebenslauf

Persönliche Daten: Dr. Marion Martienssen
geb. Kutscherra
geb. am 31.7.59 in Frankfurt (O)
verheiratet

Schulbildung:

- 1966- 1974 Allgemeinbildende Polytechnische Oberschule in Frankfurt (O)
- 1974-1978 Erwerb der Hochschulreife an der Spezialschule
"physikalisch-technische Richtung" Frankfurt (O)

Wissenschaftlicher Werdegang:

- 1978-1982 Studium der Biochemie an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg,
Sekt. Biowissenschaften.
- 1982-1985 Forschungsstudium an der Martin-Luther Universität, Spezialisierung in der
Arbeitsrichtung "ökologische Biochemie".
Promotion zum Thema "Nachweis und Charakterisierung von zwei Formen
der Nitritreduktase in Triticum aestivum und Galium aparine".
- 1985-1989 befristeter Mitarbeiter an der Sekt. Biowissenschaften der
Martin-Luther-Universität, pflanzenbiochemische Abt.
Arbeiten zur Konkurrenz zwischen Kulturpflanzen und Unkräutern vor
allem in Weizenkulturen. Untersuchungen zu Wirkungen von
Unkrautbekämpfungsmitteln.
Durchführung von Seminaren auf dem Gebiet allgemeine Biochemie.
- Sept.-Dez. 89 Arbeiten für den medizinischen Bereich
Untersuchungen zur immunologischen Indikation von Infektionskrankheiten
durch selektiven Nachweis spezifischer Immunglobuline.
- 1990- Nov. 1996 Forschungsingenieur, später wissenschaftlicher Mitarbeiter
am Fachbereich Biochemie/Biotechnologie, Arbeitsgruppenleiter
Umweltschutztechnik (Technikum), Aufbau und Leitung des
umweltanalytischen Labors, Entwicklung verschiedener Verfahren zur
biologischen Eliminierung von Umweltschadstoffen aus Wasser, Boden
und Abprodukten.
- Seit Dez. 1996 wissenschaftlicher Assistent am Fachbereich Biochem./Biotechnologie,
Institut für Biotechnologie. Arbeiten zur Etablierung von Abbaupotentialen
für persistente Umweltschadstoffe, sowie zur mikrobiellen
Populationsdynamik bei der biologischen Stickstoffelimination.