

# **Einfluss des C:N:P-Verhältnisses auf die Bildung von Biofilmen**

Vom Fachbereich Chemie der Universität Dortmund zur Erlangung des akademischen  
Grades eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigte

DISSERTATION

von:

Diplom-Biologe

Jürgen Scheen

aus Dortmund

Universität Dortmund  
2003

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Umweltforschung (INFU) an der Universität Dortmund angefertigt.

Referent: Prof. Dr. M. Spiteller  
Korreferent: Prof. Dr. H.-C. Flemming

Herrn Prof. Dr. M. Spiteller danke ich für die Unterstützung zum Gelingen der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. H.-C. Flemming danke ich für die Übernahme des Korreferats und für die sachliche und fachliche Unterstützung.

Herrn Dr. W. Baumann danke ich, stellvertretend für die Kollegen am Institut für Umweltforschung der Universität Dortmund, für die freundliche Unterstützung, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

Herrn Dr. J. Wingender danke ich, stellvertretend für die Kollegen der Arbeitsgruppe des Fachbereiches Aquatische Mikrobiologie der Universität Duisburg, für die freundliche Aufnahme und die sachliche und fachliche Unterstützung.

<b>Zusammenfassung</b>		
<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Bedeutung von Biofilmen.....	1
1.2	Vorkommen von Biofilmen.....	5
1.3	Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS).....	8
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung</b>	<b>11</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>12</b>
<b>3.1</b>	<b>Aufbau und Betrieb der Biofilmreaktoranlage</b>	<b>12</b>
3.1.1	Systemkomponenten der Biofilmreaktoranlage.....	12
3.1.2	Systembedingungen.....	15
3.1.3	Immobilisationseinheiten (IE).....	16
3.1.4	Synthetisches Medium.....	18
3.1.5	Inokulum.....	19
3.1.6	Ablauf der C:N:P-Versuchsläufe.....	20
<b>3.2</b>	<b>Ernten des Biofilms</b>	<b>20</b>
3.2.1	Ausbau der IE.....	20
3.2.2	Ablösen des Biofilms von den IE.....	21
3.2.3	Zentrifugation der Biofilm-Suspension.....	22
3.2.4	Homogenisierung des Biofilms.....	22
<b>3.3</b>	<b>Methoden zur Bestimmung chemisch- physikalischer- Parameter</b>	<b>22</b>
3.3.1	Gravimetrische Bestimmung der Biofilm-FM (Feuchtmasse).....	22
3.3.2	Bestimmung des Wassergehaltes und Gewinnung der Biofilm-TM (Trockenmasse).....	22
3.3.3	Kohlenstoff - Messung aus dem Biofilm-TM.....	23
3.3.4	Stickstoff - Messung aus dem Biofilm-TM.....	23
3.3.5	Wasserstoff - Messung aus dem Biofilm-TM.....	24
3.3.6	Sauerstoff - Messung aus dem Biofilm-TM.....	24
3.3.7	Phosphor - Messung aus dem Biofilm-TM.....	24
3.3.8	Metall - Messung aus dem Biofilm-TM.....	24
3.3.9	Gelöster organischer Kohlenstoff - DOC und gesamter organischer Kohlenstoff - TOC .....	25
<b>3.4</b>	<b>Methoden zur Bestimmung mikrobiologischer und biochemischer Parameter</b>	<b>25</b>
3.4.1	Fluoreszenzmikroskopische Auszählung der Mikroorganismen.....	25
3.4.2	Kolonienzahlbestimmung der Mikroorganismen als kolonienbildende Einheiten (KBE).....	26
3.4.3	Protein – Messung aus dem Biofilm-TM.....	27
3.4.4	Kohlenhydrat - Messung aus dem Biofilm-TM.....	30
3.4.5	Most probable number (MPN) der Nitrifikanten.....	31
3.4.6	Messung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB).....	31

<b>3.5</b>	<b>Methoden zur EPS-Analytik</b>	<b>32</b>
3.5.1	Extraktion der EPS mit Kationaustauscherharz (CER).....	32
3.5.2	Messung der Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten.....	33
3.5.3	Kohlenstoff - Messung aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte.....	33
3.5.4	Stickstoff – Messung aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte.....	33
3.5.5	Metall – Messungen aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte.....	33
3.5.6	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit den EPS-Extrakten.....	33
3.5.7	Messung von N-Acyl-L-Homoserinlactonen (AHL) in den EPS-Extrakten.....	36
3.5.8	Protein – Messung aus den EPS-Extrakten.....	37
3.5.9	Kohlenhydrate – Messung aus den EPS-Extrakten.....	37
3.5.10	Uronsäure-Messung aus den EPS-Extrakten.....	38
3.5.11	Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivitätstest (G6PDH) mit den EPS-Extrakten.....	38
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>40</b>
<b>4.1</b>	<b>Ergebnisse der chemisch- physikalischen Parameter</b>	<b>40</b>
4.1.1	Biofilmerträge TM und FM.....	40
4.1.2	Wassergehalte in den Biofilmen.....	42
4.1.3	Gehalte an organischen Kohlenstoff in den Biofilmen.....	43
4.1.4	Gehalte an Stickstoff in den Biofilmen.....	44
4.1.5	Gehalte an Wasserstoff in den Biofilmen.....	48
4.1.6	Gehalte an Sauerstoff in den Biofilmen.....	49
4.1.7	Gehalte an Phosphor in den Biofilmen.....	50
4.1.8	Gehalte an Metallen in den Biofilmen.....	52
4.1.9	DOC und TOC.....	54
4.1.10	Zusammenstellung von physikalisch/chemischen Ergebnissen aus dem Biofilm-TM in Summenformeln.....	54
<b>4.2</b>	<b>Ergebnisse der mikrobiologischen und biochemischen Parameter</b>	<b>56</b>
4.2.1	Gesamtzellzahl in den Biofilmen.....	56
4.2.2	Lebendzellzahl in den Biofilmen.....	57
4.2.3	Gehalte an Proteinen in den Biofilmen.....	59
4.2.4	Gehalte an Kohlenhydraten in den Biofilmen.....	61
4.2.5	Ergebnisse zu MPN der Nitrifikanten.....	66
4.2.6	Biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB) aus den C:N:P-Verhältnisse.....	67
<b>4.3</b>	<b>Ergebnisse zur EPS-Analytik</b>	<b>68</b>
4.3.1	Erträge aus den CER-Extraktionen.....	68
4.3.2	Gehalte an Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten.....	68
4.3.3	Gehalte an organischen Kohlenstoff in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte.....	69

4.3.4	Gehalte an Stickstoff in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte.....	70
4.3.5	Gehalte an Metallen aus den EPS-Extrakten.....	72
4.3.6	Proteinbanden aus den EPS-Extrakten mit SDS-Page.....	73
4.3.7	Nachweis von N-Acyl-L-Homoserinlactonen in den EPS-Extrakten.....	74
4.3.8	Gehalte an Proteinen aus den EPS-Extrakten.....	75
4.3.9	Gehalte an Kohlenhydraten aus den EPS-Extrakten.....	77
4.3.10	Gehalte an Uronsäuren aus den EPS-Extrakten.....	79
4.3.11	Ergebnisse zum Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten.....	79
<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>82</b>
<b>6</b>	<b>Aspekte</b>	<b>105</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>107</b>
7.1	Geräte.....	107
7.2	Zusammensetzung der C:N:P-Läufe.....	109
7.3	Abkürzungen.....	111
7.4	Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen .....	112
<b>8</b>	<b>Literatur</b>	<b>126</b>

## Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird der Einfluss des Stickstoffgehaltes auf die Entwicklung von Biofilmen untersucht.

Im experimentellen Teil wird der Biofilm in Abhängigkeit von unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen (Kohlenstoff:Stickstoff:Phosphor, in molaren Verhältnissen) in einem synthetischen Medium durch eine Mischpopulation in einer Biofilmreaktoranlage aufgebaut. Die acht unterschiedlichen C:N:P-Verhältnisse im synthetischen Medium sind: 100:1:1, 100:5:1, 100:8:1, 100:10:1, 100:12:1, 100:14:1, 100:18:1 und 100:20:1. Im experimentellen Teil wird die Zusammensetzung der Biofilme und deren EPS (Extrazelluläre polymere Substanzen) mit physikalisch/chemischen und mikrobiologisch/biochemischen Methoden untersucht.

Durch die Ergebnisse können folgende Aussagen gemacht werden:

- Um die Auswirkungen der unterschiedlichen C:N:P-Verhältnisse deutlich zu machen, ist es notwendig die Ergebnisse sowohl auf den Biofilm-TM (Biofilm-Trockenmasse), als auch auf den Biofilm-FM (Biofilm-Feuchtmasse) zu beziehen.
- Der Wassergehalt im Biofilm-FM nimmt mit zunehmendem Stickstoffanteilen im synthetischen Medium ab. Die Wassergehalte reichen von 81% (100:20:1) bis 98% (100:1:1) – diese und folgende prozentuale Ergebnisse beziehen sich auf w/w (weight/weight).
- Der organische Kohlenstoff aus dem synthetischen Medium wird aus allen unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen gleichmäßig in den Biofilm aufgenommen. Der Gehalt an organischen Kohlenstoff liegt in allen Biofilm-TM bei  $46,9\% \pm 0,7$ . Auch im stickstofflimitierten C:N:P-Verhältniss von 100:1:1 wird dieser Wert erreicht, obwohl durch die Stickstofflimitierung der angebotene organische Kohlenstoff nur zu ca. 70% aus dem synthetischen Medium durch die Mikroorganismen genutzt wird.
- Der aus den synthetischen Medium in den Biofilm aufgenommene Stickstoff erreicht bei C:N:P-Verhältnissen von 100:10:1 und 100:12:1 Maxima. Der in höheren C:N:P-Verhältnissen zusätzlich angebotene Stickstoff verbleibt in der wässrigen Phase - dennoch verändern sich in höheren C:N:P-Verhältnissen die Fraktionen des Biofilms.
- Die Gehalte an Wasserstoff, Sauerstoff und Phosphor sind, unabhängig von den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen, in allen Biofilm-TM gleich. Die Werte für Wasserstoff liegen bei  $7\% \pm 0,19$ , für Sauerstoff bei  $35,1\% \pm 1,11$  und für Phosphor bei  $1,05\% \pm 0,14$ .
- Die Gehalte an Calcium nehmen im Biofilm mit zunehmendem Stickstoffanteil ab. Die Abnahme des Calciumgehaltes deutet auf eine Veränderung der Verknüpfungen in den EPS des Biofilms hin. Die gemessenen Werte für Calcium im Biofilm-TM und die Erträge aus den EPS-Extraktionen bestätigen diese Ergebnisse.
- Die höchste Dichte an Mikroorganismen im Biofilm wird beim C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 gemessen. Aus den C:N:P-Verhältnissen unter- und oberhalb von 100:12:1 werden wesentlich geringere Mikroorganismendichten im Biofilm gemessen.

- Die einzelnen Gehalte an Proteinen und Kohlenhydraten verändern sich im Biofilm in Abhängigkeit vom Stickstoffgehalt. Die Summe der Gehalte von Proteinen und Kohlenhydraten bleibt aber in allen Biofilmen gleich und liegt bei  $70,8\% \pm 3,59$ .
- Der Quotient aus den Proteingehalten und den Stickstoffgehalten aus allen Biofilm-TM liegt bei  $5,12 \pm 0,44$  (das Verhältnis von 100:1:1 ausgenommen) und kann als Konstante für diese Biofilme angesehen werden.
- Die zur Abtrennung der EPS aus den Biofilmen eingesetzte Methode ist abhängig von den jeweiligen Gehalten an Calcium im Biofilm. Dies ist eindeutig, weil die Erträge an Trockensubstanz aus den Extraktionen mit zunehmenden Stickstoffangebot abnehmen. Parallel dazu nehmen die Gehalte an Calcium im Biofilm-TM ab. Dies zeigt das Problem der quantitativen Trennung der EPS aus Biofilmen oder Belebtschlämmen und kann eine Erklärung dafür sein.
- Die Stickstoffgehalte in den EPS ergeben theoretisch wesentlich höhere Proteinwerte als die real gemessenen Proteinwerte. Dies bedeutet, dass der in die EPS gemessene Stickstoff zu einem Großteil nicht in Proteinen gebunden ist, sondern in andere Komponenten – möglicherweise in stickstoffhaltigen Kohlenhydraten oder in Glycoproteinen oder Nukleinsäuren – von den Mikroorganismen eingebaut wurden.
- Die Quotienten aus den Gehalten an Proteinen und Kohlenhydraten in den EPS sind, ausgenommen beim Verhältnis von 100:1:1, immer über eins. Die Ergebnisse zeigen klar, dass Proteine in den EPS vorhanden sind und dass deren Gehalte höher sind als die der Kohlenhydrate.
- Die gute Handhabung der Biofilmreaktoranlage und die angewandte Analytik bieten für die Zukunft weitere Möglichkeiten, um Biofilme unter anderen Versuchsbedingungen zu untersuchen.

# 1 Einleitung

## 1.1 Bedeutung von Biofilmen

Das Verständnis von Abläufen in der Umwelt ist für uns Menschen von essentieller Bedeutung. Dabei geht es auch um die Nutzung dieses Verständnisses für anthropogene Ziele. Besonders gilt dies für die Rolle von Mikroorganismen bzw. Biofilmen bei Anwendungen in der Biotechnologie, Medizin und in der Umwelt.

Das Vorkommen von Mikroorganismen ist ubiquitär. Sie erfüllen wichtige Funktionen bei der Selbstreinigung von Gewässern, Böden und Sedimenten. Die Grenzflächen des Wassers sind besonders beliebte Besiedlungsräume, an denen sie sich akkumulieren und Biofilme bilden (Flemming, 2000a). Das Vorkommen von Biofilmen in allen natürlichen Habitaten ist auch auf ihre evolutionäre Entwicklung zurückzuführen. Sie waren nachweislich schon vor ca. 3,5 Milliarden Jahren in biofilmähnlichen Formen (versteinerte Biofilme in stromatolithischen Gesteinsformationen) existent. Photosynthetisch aktive microbial mats waren dafür verantwortlich, dass die ehemals anaerobe Erdatmosphäre zur aeroben wurde (Flemming, 1995a). Die lange Entwicklungsgeschichte hat zu Anpassungsfähigkeiten geführt, die Mikroorganismen auch unter widrigsten Umweltbedingungen überleben und reproduzieren lässt. Es wird geschätzt, dass 99% aller Mikroorganismen auf der Erde die Lebensform in Biofilmen bevorzugen, weil sie ihnen Schutz und Nährstoffe gewährleisten können (Costerton et al., 1987; Hoffman u. Decho, 1999).

Neben den schützenden Eigenschaften ist das symbiotische Miteinander der Mikroorganismen im Biofilm für ihr Überleben und ihre Reproduktion von Vorteil. Der Schutzeffekt durch den Biofilm kann anhand des Vergleiches zwischen planktonisch vorkommenden und in Biofilmsystemen organisierten Mikroorganismen deutlich gemacht werden. In planktonischen Systemen wird eine Dichte von ca.  $10^7$ /mL Mikroorganismen erreicht. Im Biofilm können Dichten von  $10^{12}$ /mL erreicht werden. Die Konzentration an antimikrobiellen Substanzen kann von Mikroorganismen in Biofilmen bis 1000-fach oder höher toleriert werden als in planktonischen Systemen (Martenssen 2000; Flemming u. Schaule, 1996a; Costerton et al., 1995). Xenobiotika können, im Gegensatz zu planktonischen Systemen, im Biofilm durch Mikrokonsortien metabolisiert oder mineralisiert werden (Sutherland, 2001a).

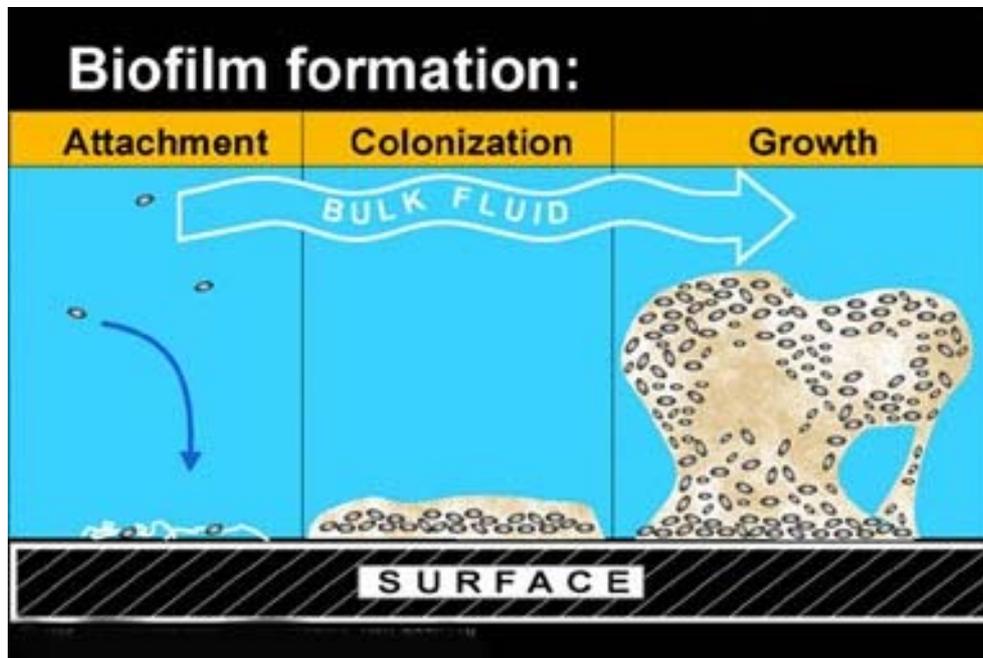
Voraussetzungen für die Entstehung von Biofilmen ist die Existenz einer Grenzfläche, das Vorhandensein von Wasser, die Anwesenheit von Mikroorganismen und das Angebot an Nährstoffen.

Der erste Schritte zur Besiedlung von Oberflächen durch Mikroorganismen ist die Induktionsphase. Dabei adsorbieren Makromoleküle (z. B. Polysaccharide, Proteine oder Huminstoffe) aus der wässrigen Phase an die Grenzfläche und bilden einen conditioning film. Mit dem tritt die Zelloberfläche von Mikroorganismen in Wechselwirkung. Daran schließt sich die Primäradhäsion der Mikroorganismen an. Der erste Schritt der Primäradhäsion ist reversibel. Nach einer längeren Aufenthaltszeit kann die reversible Adhäsion in eine irreversible Adhäsion wechseln. Die Dauer der Induktionsphase ist von umweltbedingten Faktoren abhängig.

An die irreversible Adhäsion der Induktionsphase schließt sich die Wachstumsphase an. Die Primärbesiedler beginnen zu wachsen und andere Mikroorganismen siedeln sich an – es werden Mikrokonsortien gebildet. Der Wachstumsphase schließt sich die Plateauphase an. In der Plateauphase wird ein Gleichgewichtszustand in der Biofilmentwicklung erreicht. Die durch Wachstum und Adhäsion hinzukommende Bio-

masse kann an anderer Stelle durch sloughing off oder Erosion wieder abgelöst werden.

Abbildung 1 zeigt schematisch die Entwicklungsstadien von Biofilmen.



**Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Biofilmbildung  
(©Center for Biofilm Engineering, Montana State University-Bozeman, 1995)

Die Komponenten von Biofilmen sind Wasser, Mikroorganismen, Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), sorbierte Substanzen und eingelagerte Partikel.

Die Matrix von Biofilmen wird von Sutherland (2001) folgendermaßen quantifiziert:

**Tabelle 1:** Zusammensetzung von Biofilmen nach Sutherland (2001, modifiziert)

Komponenten	Komponenten in %
Wasser	bis zu 97
Mikroorganismen	2-5
Polysaccharide (Homo- und Heteropolysaccharide)	<1-2
Proteine	<1-2
DNA und RNA	<1-2
Ionen	? gebunden und frei

Wasser ist quantitativ der Hauptbestandteil von Biofilmen. Die Bindung von Wasser ist eine sehr wichtige physikalisch-chemische Eigenschaft von Biofilmen und anderen mikrobiellen Aggregaten. Das Wasser im Biofilm wird verschiedenen Fraktionen zugeschrieben. Neben dem intrazellulären Wasser der Mikroorganismen ist Wasser in den Poren und Kanälen eingelagert und hauptsächlich in den EPS gebunden. Die Bindung von Wasser wird besonders im Rahmen der Entwässerung von Belebtschlamm untersucht (Schmitt u. Flemming, 1999).

Die Dichte und Artenvielfalt an Mikroorganismen in den Biofilmen unterschiedlicher Habitate können stark variieren.

Der organische Anteil der EPS in der Biofilmtrockenmasse wird mit 75-95% (Flemming, 1995c), 60-98% (Wingender et al., 1999a) und bei Nielsen et al., (1997) zwischen 50-80% angegeben.

Durch die Konkurrenzsituation zwischen den Arten haben verfügbare Nährstoffe maßgeblichen Einfluss auf die Mikroorganismen und damit auf die Biofilmentwicklung (Møller et al., 1997). Die Charakteristik von Biofilmen variiert dabei stark, denn neben den Umweltbedingungen können auch die physiologischen Reaktionen der Mikroorganismen sehr unterschiedlich sein (Sutherland, 2001). Letztlich geht es um die Ausnutzung vorhandener Nährstoffe mit dem Ziel der Reproduktion (Wimpenny, 2000).

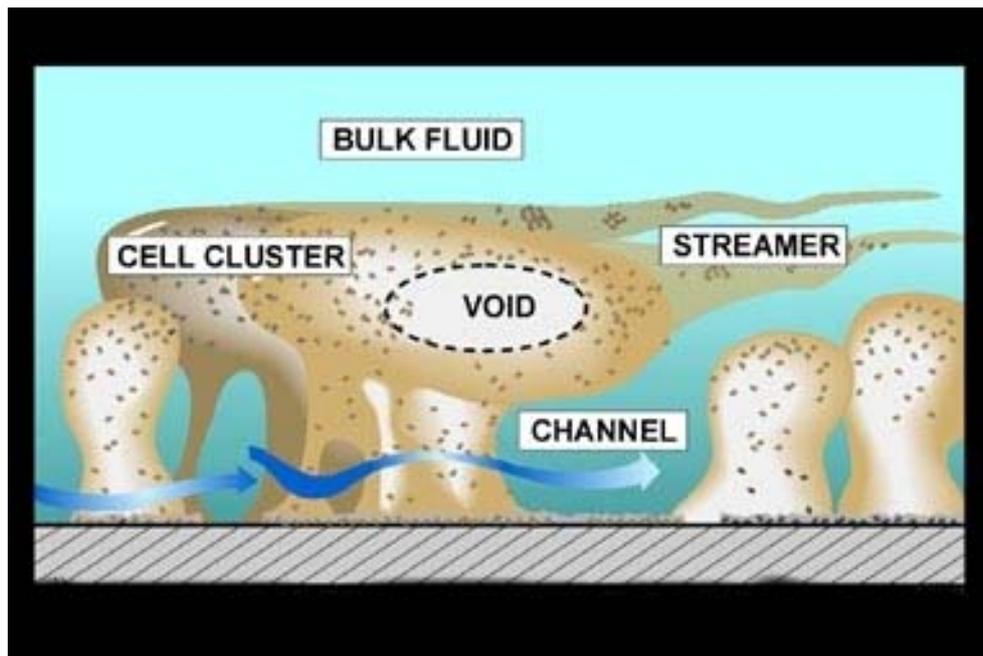
Die erste mikroskopische Betrachtung von Mikroorganismen führte von Leeuwenhoek (Costerton et al., 1999) bereits 1674 durch. Mit selbst entwickelten Mikroskopen betrachtete er Mikroorganismen, die er von seinen Zähnen abgekratzt hatte und die, für Leeuwenhoek nicht erkennbar, in Biofilmen organisiert waren. Eine differenzierte Betrachtung der Biofilmmatrix war mit den damaligen Methoden nicht möglich.

Es dauerte recht lange, bis durch die Entwicklung geeigneter Methoden die Erforschung solcher Ablagerungen möglich wurden. Zwar konnten schon zum Anfang des letzten Jahrhunderts Adhäsionen von Mikroorganismen auf Oberflächen beobachtet und untersucht werden, jedoch waren die Untersuchungen mehr sporadischer Natur. Erst in den späten 60-er Jahren des letzten Jahrhunderts fand wieder eine verstärkte Forschungsaktivität auf diesem Gebiet statt, welche bis heute andauert (Read u. Costerton, 1987).

Mit der Anwendung von CLSM (konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie) und entsprechenden Fluoreszenzfarbstoffen (Neu u. Lawrence, 1999), sowie der NMR (Kernresonanzspektroskopie; Perlin u. Casu, 1982) und Mikrosensorentchnik (Horn, 2000) können Strukturen und Gradienten im nativen Zustand von EPS/Biofilmen beobachtet werden. Mit Hilfe dieser Methoden wurden neue Modelle von Biofilmen entwickelt.

Ein richtungsweisendes Modell – das water channel model – geht davon aus, dass die Mikroorganismen nach der Anheftung an Oberflächen ihren Phänotyp ändern – im Gegensatz zu planktonisch organisierten Mikroorganismen - und Exopolymere produzieren können. Einige Mikrokolonien können zapfenförmige Strukturen bilden. In der weiteren Entwicklung prägen sich innerhalb des Biofilms Wasserkanäle aus, die zur Nährstoffversorgung der Mikroorganismen und zur Kommunikation untereinander dienen können. Die fein verästelten und organisierten Kanäle im Biofilm zeigen Analogien zu denen von höheren Organismen (Costerton et al., 1995), oder mit den Worten von Sutherland, 2001 – „die Summe der Eigenschaften der Gemeinschaft an Mikroorganismen im Biofilm ist größer als die Summe der einzelnen Arten“.

Abbildung 2 zeigt schematisch das water channel model von Biofilmen.



**Abbildung 2:** Water channel model der Biofilmorganisation  
(© Center for Biofilm Engineering, Montana State University-Bozeman, 1996)

Die Organisation der Mikroorganismen im Biofilm kann als eine symbiotische Gemeinschaft angesehen werden, die den Eigenschaften von Vielzellern nahe kommen kann (Costerton et al., 1995). Die Nutzung von Signalmolekülen (Stewart, 2001) im Biofilm sind bekannt. Bereits identifizierte Signalstoffe sind die AHL (N-Acyl-L-Homoserinlactone). Sie werden von Gram-negativen Mikroorganismen zur Kontrolle der Populationsdichte eingesetzt - dem Quorum Sensing (Swift et al., 1996). Bei Heal u. Parsons (2002) wird die Übertragung einer Antibiotikaresistenz gegen Ampicillin über den Luftweg bei räumlich getrennten *E. coli*-Kulturen beschrieben. Costerton (2000) erhebt, auch durch die bei solchen Ergebnissen realistische Prognose, dass in näherer Zukunft Hunderte von neuen Signalstoffen entdeckt werden, die als Hormone oder Pheromone die komplexen Abläufe in Biofilmen regeln.

Bei der Bildung von Biofilmen machen die Mikroorganismen auch vor dem Menschen nicht halt (Rodney, 2000). Einerseits haben sich durch dieses Miteinander symbiotische Konstellationen entwickelt, z. B. Darmbakterien. Auch wirtschaftlich hat sich der Mensch Leistungen der Mikroorganismen zu eigen gemacht, z. B. Fermentationen. Andererseits entstehen aus diesem Miteinander Probleme. Diese Probleme zeigen sich im Gesundheitsbereich, als auch in wirtschaftlicher Hinsicht. Die im Gesundheitswesen und im Bereich der Materialzerstörungen durch Mikroorganismen verursachten Kosten sind volkswirtschaftlich enorm und in ihrer Tragweite bilanzmäßig kaum erfasst.

Durch die breitgefächerte Anwendung von Antibiotika ist es im zunehmenden Maße zu Resistenzen pathogener Mikroorganismen gekommen (Levy, 1998) - speziell bei der Tuberkulose, die am häufigsten zu Tode führende Infektionskrankheit (Nolte, 1995; Levy, 1998), oder bei *Helicobacter pylori*, der u.a. Magenkrebs hervorrufen kann (Stark et al., 1999). Stewart (2001) weist darauf hin, dass es im Biofilm andere Mechanismen sind, die zur Resistenzbildung führen, als bei Mikroorganismen in planktonischen Systemen. Neueste Ergebnisse über den Einfluss der Resistenzbildung durch *Pseudomonas aeruginosa* gegen Antibiotika zeigen, dass nicht nur phä-

notypische Eigenschaften, damit ist die Einbettung und der Schutz durch die Biofilmmatrix gemeint, sondern auch genotypische Eigenschaften, parallel bei *P. aeruginosa* vorkommen können (Drenkard, 2002).

Viele Ergebnisse über Biofilme stammen aus Untersuchungen mit Reinkulturen. Speziell über *P. aeruginosa* sind viele Ergebnisse publiziert worden. Die Extrapolation solcher Ergebnisse auf natürliche Biofilme ist jedoch nur bedingt möglich (Wingender et al., 1999).

Möglicherweise hat die für den Menschen bedrohliche Entwicklung der Resistenzbildungen dazu beigetragen, die Biofilmforschung im interdisziplinären Maßstab voranzutreiben, da speziell Mikroorganismen in Biofilmen Resistenzen entwickeln können. Aus diesen Anstrengungen ist eine allgemeine Definition der Biofilme hervorgegangen. Demnach werden Biofilme als eine strukturierte Gemeinschaft von Mikroorganismen definiert, die in einer *selbst* geschaffenen polymeren Matrix an belebten und unbelebten Oberflächen anheften kann (Costerton et al., 1999).

## 1.2 Vorkommen von Biofilmen

An relevanten Schnittstellen zwischen Mikroorganismen und Menschen treten Probleme auf. Diese Schnittstellen liegen z. B. im Gesundheitsbereich. Die durch Mikroorganismen verursachten medizinischen Probleme sind umfangreich, denn die Mikroorganismen nutzen den Menschen exogen als auch endogen als Besiedlungsfläche. Dabei spielt die Organisation in Biofilmen eine entscheidende Rolle. Der Biofilm gibt den Mikroorganismen sowohl Schutz gegen natürliche Abwehrmechanismen des Menschen, das Immunsystem, als auch gegen Medikamente, z. B. Antibiotika. Planktonisch organisierte Mikroorganismen hingegen können durch diese Abwehrmechanismen besser bekämpft werden. Eine ausführliche Tabelle über Krankheiten mit Biofilmbeteiligung findet sich bei Costerton et al. (1999).

Ein weiterer medizinischer Aspekt wird bei Wolfaardt et al. (1999) angesprochen und beinhaltet die Aufnahme von anorganischen Kontaminationen in Biofilme. Die Aufnahme und die Anreicherung von Metallen (z. B. Kupfer) in die EPS können toxische Metalle in die Nahrungskette der höheren Organismen übertragen.

Die erwähnten Schnittstellen zwischen Biofilmen und Menschen liegen nicht nur in medizinischen Bereichen. Ökonomische Belastungen durch Biofilme an unerwünschten Stellen sind auch in industriellen/kommunalen Einrichtungen nicht unerheblich.

Einige Beispiele: Biofilme spielen in der Aufbereitung und Verteilung von Trinkwasser eine ambivalente Rolle. Einerseits sorgen sie in der Aufbereitungstechnik zur Entfernung von biologisch abbaubaren Substanzen, andererseits entstehen sie auch in den Trinkwasserverteilungssystemen. In den Verteilungssystemen können Probleme wie erhöhte Keimzahl, pathogene Keime, Verfärbung, Geschmack etc. durch Biofilme auftreten (Schwartz et al., 1999).

Der Bewuchs von Schiffsrümpfen durch Biofilme – als Biofouling bezeichnet – dem höhere Organismen wie Muscheln im Bewuchs folgen, wird allein bei der amerikanischen Marine mit jährlich mehr als 500 Millionen US \$ beziffert. Der erhebliche finanzielle Mehraufwand wird durch die erhöhten Reibungskräfte der Schiffsrümpfe, primär durch den Bewuchs mit Biofilmen, hervorgerufen (Flemming, 1992).

Negative Auswirkungen des Biofouling macht sich besonders an Membranoberflächen bemerkbar. Betriebskosten, die für den Betrieb einer Umkehr-Osmose-Anlage entstanden, wurden zu ca. 30% dem Biofouling zugeschrieben. Biofilme treten in Reinstwasseranlagen, Trinkwassersystemen oder bei der Herstellung anfälliger Computerbauteile auf. Dort können sie zu erheblichen Problemen und Schäden führen (Flemming, 1995b).

Eine weitere Auswirkung von Biofilmen auf Oberflächen ist die MIC (microbially influenced corrosion = mikrobiell beeinflusste Korrosion). Das MIC ist gleich zu setzen mit den Begriffen der Biodeterioration und der Biokorrosion. Mikroorganismen bewirken keine neuen Korrosionsmechanismen, sondern sie beeinflussen den chemischen bzw. elektrochemischen Korrosionsprozess durch ihre Anwesenheit oder durch ihre Stoffwechselprodukte. Durch das Wachsen der Biofilme auf Oberflächen verändern sie z. B. den pH-Wert, das Redoxpotential, die Konzentrationen an Sauerstoff, gelösten Salzen und Komplexbildnern (Flemming, 1995), so dass Korrosionsprozesse stattfinden können.

Die durch MIC entstandenen Schäden in Betonrohren der Stadt Hamburg machten bereits in den 70er Jahren des letzten Jahrhunderts Reparaturen in Höhe von 25 Millionen € notwendig (Sand u. Bock, 1991). In den USA entstehen durch MIC in der Kanalisation Schäden in Höhe von ca. 100 Millionen US \$ (Severyn, 1991). In der BRD auftretende Bauschäden von mindestens 20 Milliarden € werden zu 10-20% dem Einfluss von Mikroorganismen zugeordnet (Flemming, 1995).

Der Schaden durch korrosive Wirkung von sulfatreduzierenden Bakterien in Biofilmen wird allein in der Öl-Industrie auf einige hundert Millionen US \$ beziffert (Coster-ton u. Boivin, 1991). Die in einem kanadischen Kernkraftwerk durch MIC entstandenen Kosten beliefen sich auf 55 Millionen US \$ (Brennenstuhl u. Doherty, 1991). Die generellen lebensdauerbestimmenden Faktoren von Wasserwärmesystemen werden nach Meinung von Bresle (1981) durch den Einfluss von MIC bestimmt.

Häufig werden die Schäden in ihrem Zusammenhang nicht erkannt, da das Wissen über den mikrobiellen Einfluss nicht berücksichtigt wird. Oftmals wird versucht, die mikrobiell bedingten Ursachen mit einer Erhöhung von Biozidkonzentration zu kompensieren. Diese Versuche können nur von mäßigem Erfolg sein, da die in tiefere Bereiche des Biofilms eingebetteten Mikroorganismen gut geschützt sind und sich Resistenzbildungen gegenüber dem Biozid einstellen können. Der Schutz von Materialien gegenüber mikrobiellen Einflüssen ist ambivalent, denn je besser ein Material gegenüber mikrobiellen Einflüssen geschützt ist, desto größer sind später die Probleme bei der Abfallentsorgung (Flemming, 1995a).

Als vorrangig sind die positiven Leistungen von Biofilmen zur Aufrechterhaltung von natürlichen Stoffkreisläufen zu sehen. Dabei sind sie am Kreislauf von Stickstoff, Schwefel, Silicium und Phosphor, aber auch von Metallen wie Quecksilber, Eisen, Mangan, Chrom u.a. beteiligt (Ehrlich, 1990). Im Kohlenstoffkreislauf schließen sie als Mineralisierer den Kreislauf des Kohlenstoffs. Bei Wolfaardt et al. (1999) wird die wichtige Rolle von Biofilmen gegen Erosion durch die Stabilisierung der Sedimente und Böden erwähnt.

Das mögliche Vorkommen von pathogenen Mikroorganismen in Biofilmen kann nicht ausgeschlossen werden. Doch wird die Ausbreitung der pathogenen Mikroorganismen dadurch unterdrückt, in dem die mikrobielle Gesamtpopulation deren ungezügelte Vermehrung vermeiden kann (Levy, 1998).

Die für die Menschen und die Natur positive Anwendungen von Biofilmen ist besonders auf den Bereich der Aufbereitung von Abwasserfrachten zu sehen. Nach Choi (2001) arbeiten bereits ca. ein Viertel der weltweit vorkommenden Abwasserbehandlungsanlagen mit unterschiedlichen Variationen von Biofilmtechniken.

Biofilmreaktoren haben gegenüber herkömmlichen Belebtschlammverfahren Vorteile. Sie beanspruchen weniger Raum bei gleichzeitiger Mobilität. Der im Belebtschlammverfahren anfallende und zu entsorgende Belebtschlamm ist beim Betrieb von Biofilmreaktoren im Volumen erheblich reduziert. Beim Betrieb von Biofilmreaktoren entfällt die Belebtschlammrückführung, wie sie beim Belebungsverfahren notwendig ist. Die Unterschiede zwischen Belebtschlammverfahren und Biofilmreaktoren sind auch

ausschlaggebend für die Betreuung einer Anlage, die erwartungsgemäß bei einem Betrieb von Biofilmreaktoren einen geringeren Personaleinsatz benötigt (Rusten et al., 1997).

Für die Aufbereitung von Abwässern können fixierte Biofilme z. B. in Tropfkörpern, Scheibentauchtropfkörpern, Wirbelbettreaktoren oder anderen Festbettreaktoren eingesetzt werden (Bryers und Characklis, 1990; Bitton, 1994). Beispielsweise wird das MBBR-Verfahren (Moving-bed-biofilm-reactor) für die biologische Behandlung von kommunalen Abwässern, Abwässern aus der Nahrungsmittelindustrie und in der Abwasseraufbereitung aus der Papierindustrie eingesetzt (Rusten et al., 1999). Auch die Kombinationen von chemischen Behandlungsmethoden mit dem MBBR-Verfahren für die Behandlung von kommunalen Abwässern werden erfolgreich angewendet (Rusten et al., 1997). Über das sogenannte Kaldness-Verfahren berichten Dalentof u. Thulin (1997) gute Abbauraten von Abwässern aus der Forstindustrie. Das Verfahren wird dort mit einem Belebungsverfahren kombiniert. Dalentof u. Thulin (1997) schränken die Anwendung dieses Verfahrens auf Abwässer mit hohen Frachten aus ökonomischen Gründen ein.

Aufgrund der höheren Dichte an Mikroorganismen in Biofilmreaktoren und dem wesentlich geringeren Anfall an zu entsorgendem Belebtschlamm, sowie der möglichen Mobilität, können Biofilmreaktoren auch dezentral eingesetzt werden. Die Biofilmreaktoren können z. B. in industriellen Bereich die anfallenden Abwasserfrachten direkt entsorgen. Das aufbereitete Wasser wird dann zu geringeren Kosten in das kommunale Netz eingeleitet, oder kann innerbetrieblich weiter eingesetzt werden.

Eine seit über zehn Jahren erfolgreich eingesetzte Großanlage zur Behandlung von Abwässern aus der Produktion, aus Formulierung und aus dem Labor, die aus der Produktion von Pflanzenschutzmitteln und pharmazeutischen Produkten entstehen, wird in der Schweiz (Münchwillen) eingesetzt. Die Anlage hat einen täglichen Durchlauf von 40-50 m<sup>3</sup> Abwasser, wobei maximal 75 Kg organischer Kohlenstoff (als TOC) durch drei hintereinander geschaltete Biofilmreaktoren aus der wässrigen Phase eliminiert werden können. Die Abluft der Anlage wird über einen Aktivkohlefilter abgeleitet und das aufbereitete Abwasser vor der Einleitung in das kommunale Netz noch über eine Ultrafiltration geführt. Die Kosten für diese Entsorgung liegen bei ca. 80 €/m<sup>3</sup> Abwasser und liegen nach Informationen der Betreiber günstiger als vergleichbare Entsorgungsmöglichkeiten (Thüer und Coers, 1992; Thüer, 2001).

Die oben beschriebenen biologischen Verfahren sind größtenteils empirischer Natur, weil mikrobiologisch/biochemische und physikalisch/chemische Wirkmechanismen der Biofilme noch nicht vollständig verstanden sind. Das Unverständnis kann zu Unsicherheiten und fehlerhaften Anwendungen führen. Ergebnisse aus dieser Arbeit sollen auch zur weiteren Aufklärung der oben beschriebenen Prozesse dienen. Eine Schlüsselrolle haben, zum Verständnis der Abläufe in mikrobiellen Aggregaten wie Biofilme und Belebtschlammflocken, die EPS.

### 1.3 Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

Die EPS sind die Schlüssel­moleküle für Struktur, Funktion und Organisationsform von Biofilmen.

Teilweise wird unter dem Begriff EPS nur die Fraktion der Polysaccharide verstanden, also extrazelluläre Polysaccharide (Sutherland, 2001a). Das Vorkommen anderer Fraktionen wird als Makromoleküle zusammengefasst. Auch die Abkürzung ECP (extrazelluläre Polymere), die Polysaccharide und Proteine umfasst, wird in der Literatur gewählt (Zhang et al., 1998).

Die EPS bestehen hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, aber auch aus Glycoproteinen, Lipiden, Phospholipiden, Glycolipiden und Nukleinsäuren (Flemming u. Wingender, 2002).

**Tabelle 2:** Zusammensetzung bakterieller EPS (Wingender et al., 1999)

EPS	Komponenten (Untereinheiten, Vorstufen)	Hauptbindungstyp zwischen Untereinheiten	Struktur des Polymerrückgrats	Substituenten (Beispiele)
Polysaccharide	Monosaccharide, Uronsäuren, Aminosucker	glycosidische Bindung	linear, verzweigt, Seitenketten	organisch: O-Acetyl, N-Acetyl, Succinyl, Pyruvyl, anorganisch: Sulfat, Phosphat
Proteine (Polypeptide)	Aminosäuren	Peptidbindungen	linear	Oligosaccharide (Glucoseproteine), Fettsäuren (Lipoproteine)
Nukleinsäuren	Nukleotide	Phosphodiesterbindungen	linear	
(Phospho)lipide	Fettsäuren, Glycerin, Phosphat, Ethanolamin, Serin, Cholin, Zucker	Esterbindungen	Seitenketten	
Huminstoffe	Phenolische Verbindungen, Einfache Zucker, Aminosäuren	Etherbindungen, C-C Bindungen, Peptidbindungen	Quervernetzung	

Organische Polymere der EPS können ihren Ursprung in Zellausscheidungen durch Mikroorganismen haben und sind nicht fest an deren Zelloberflächen gebunden. Gebildete Polysaccharide der EPS können aus Wiederholungseinheiten der gleichen Monosaccharide (Homopolysaccharide, z. B. Dextran) und aus unterschiedlichen Monosacchariden (Heteropolysaccharide, z. B. Alginate) bestehen. Häufig auftretende Monosaccharide sind: Glucose, Galaktose, Mannose, Glucuronsäure, Galacturonsäure (Lazarova u. Manem, 1995), N-Acetylglycosamin und Rhamnose (Flemming, 1995b). Die Polysaccharide tragen häufig Acetyl-, Succinyl- oder Pyruvyl-Gruppen, oder auch anorganische Substituenten (Flemming u. Wingender, 2000b u. 2003).

Die EPS prägt im wesentlichen die Eigenschaften des Biofilms, wie z. B. die einer Diffusionsbarriere, eines Molekularsiebes oder eines Ionenaustauschers. Auch kann die Wirkung von Antibiotika durch die EPS eingeschränkt oder gänzlich verhindert werden (Batchelor et al., 1997).

Durch Wechselwirkungen zwischen den makromolekularen Ketten der EPS wird ein Netzwerk gebildet. Bei den EPS aus Biofilmen sind keine kovalenten Bindungen am Zusammenhalt der EPS-Matrix beteiligt (Flemming, 1996b). Die Vernetzung wird durch Wasserstoffbrückenbindungen, van-der-Waals-Kräfte und elektrostatischen Wechselwirkungen bewirkt (Flemming u. Wingender, 2000b).

Durch elektrostatische Wechselwirkungen kann Calcium als divalentes Kation die Carboxylgruppen der extrazellulären Polysaccharide verbrücken - speziell in Umweltproben (Flemming u. Wingender, 2002). Für eine bedeutende Rolle als divalentes Kation kann der durchschnittliche Gehalt an Calcium im Süßwasser von Bedeutung sein. Er liegt bei ca. 20%, bezogen auf die gelösten Feststoffe. Calcium ist dadurch in natürlichen Habitaten für die Mikroorganismen in der Wasserphase ausreichend verfügbar. Häufig wird noch Magnesium als zweiwertiges Kation bei der Verknüpfung der Polysaccharide erwähnt. Das Vorkommen von Magnesium ist mit ca. 3% der gelösten Feststoffe im Süßwasser aber wesentlich geringer als das von Calcium.

Eine stetige Veränderung von Biofilmen kann durch die Änderung der EPS-Zusammensetzung des Biofilms bedingt sein. Generell können die von einer Mikroorganismenart gebildeten EPS nicht von der gleichen wieder abgebaut werden. Im Biofilm mit Mischpopulation können die EPS durchaus abgebaut werden. Dies kann zu einer Veränderung des Biofilms führen (Sutherland, 2001). Bei Wingender et al. (1999a) werden die Veränderungen der strukturellen Polymere des Biofilms damit in Verbindung gebracht, dass durch die Depolymerisation der Biofilmmatrix Mikroorganismen wieder planktonisch werden. Die so frei gewordenen Mikroorganismen können an anderer Stelle neue Flächen kolonisieren.

Die EPS geben mikrobiellen Aggregaten in Biofilmen und Belebtschlammflocken Schutz und Entfaltungsmöglichkeiten, die sie unter rein planktonischen Bedingungen nicht vorfinden. Sie geben mikrobiellen Aggregaten mechanische Stabilität, z. B. in der biologischen Abwasserbehandlung. Sie ermöglichen den Mikroorganismen im Biofilm über z. B. AHL's (N-Acyl-L-Homoserinlactone, s. unten) zu kommunizieren (Swift et al., 1996). Der Genaustausch zwischen den Mikroorganismen kann innerhalb von Biofilmen ermöglicht werden, was zu neuen Eigenschaften der Mikroorganismen führen kann (Lorenz und Wackernagel, 1994). Durch Kometaabolismus (Miseret et al., 1999) und Exoenzyme in der EPS-Matrix, können z. B. Xenobiotika metabolisiert werden, die unter submersen Bedingungen nicht für die Mikroorganismen als Nährstoff zugänglich sind. Schwermetalle können in der EPS-Matrix gebunden werden. Dadurch können deren toxische Eigenschaften gegenüber den Mikroorganismen vermieden werden. Die Sorption von Xenobiotika und Schwermetallen aus der Wasserphase in die EPS von Belebtschlammflocken und Biofilmen entfernt diese aus der Wasserphase. Das aufbereitete Wasser kann anschließend wieder verwendet werden.

Die mikrobiellen Aggregate wie Belebtschlammflocken und Biofilme bieten den Mikroorganismen Schutz gegen Austrocknung. Die EPS ermöglichen die Einlagerung von Wasser. Das diese notwendige Voraussetzung für das Überleben im Biofilm mit einem geringen Aufwand an Energie und Nährstoffen erreicht wird, zeigt der Umstand, dass nur 1-2% der organischen Substanz im Biofilm ca. 98-99% des Wassers binden kann (Flemming u. Wingender, 2003).

Der Aufbau der EPS in den Belebtschlammflocken hat Auswirkungen auf die Wasserhaltekapazität. Belebtschlamm muss nach seiner Entfernung aus dem aeroben Reinigungsprozess entsorgt werden. Der Energieverbrauch für die Entwässerung von Belebtschlamm spielt dabei eine wichtige ökonomische Rolle. Das Wasser in der EPS der Belebtschlammflocken wird hauptsächlich von Polysacchariden und Protei-

nen gebunden. Gelingt es, die Wasserbindeeigenschaften der EPS weiter zu verstehen, könnten Mittel und Wege gefunden werden, um die Entwässerung von Belebtschlamm effektiver durchzuführen.

Die Eigenschaften von Biofilmen/EPS sind durch ihre Zusammensetzung und die Verfügbarkeit von Nährstoffen für die Bildung von mikrobiellen Aggregaten beeinflusst (Flemming u. Wingender, 2003). Mikroorganismen sind in der Lage - auch bedingt durch den aus über 3 Milliarden Jahren konditionierten Pool an genetischer Anpassung an Umweltbedingungen - unter widrigsten Bedingungen zu überleben und sich zu reproduzieren. Zur Bestimmung von mikrobiellen Eigenschaften reicht es nicht aus, die Leistungen von Mikroorganismen aus einer Reinkultur in einer Mischpopulation einfach zu addieren. Denn die Interaktionen von Mikroorganismen untereinander, sowie die Eigenschaften der EPS (z. B. Exoenzyme), können zu neuen Eigenschaften führen. Diese enorme Anpassungsfähigkeit macht es schwierig, Grundsätze zur Bildung von mikrobiellen Aggregaten endgültig zu formulieren. Die unterschiedliche Zugabe von Nährstoffen, unter ansonsten konstanten Versuchsbedingungen, zeigt den Einfluss des Nährstoffes auf das Resultat – in dieser Arbeit den Einfluss des Stickstoffgehaltes auf den Biofilm, bzw. EPS.

Der Einfluss der Nährstoff-Verhältnisse von organischem Kohlenstoff (als CSB = chemischer Sauerstoffbedarf), Stickstoff und Phosphor in einem synthetischen Abwasser (C:N:P), wurde von Bura et al. (1998) an Belebtschlammflocken untersucht. Bura et al. (1998) können einen Einfluss des C:N:P-Verhältnisses auf die Hydrophobizität, die Oberflächenspannung und die EPS-Bildung zeigen. Ergebnissen aus Untersuchungen an Belebtschlammflocken können nur unter Vorbehalt auf Biofilme übertragen werden. Aus Untersuchung von Martin-Cereceda et al. (2001) geht hervor, dass die Gehalte an Proteinen und Polysacchariden der EPS aus Biofilmen wesentlich höher waren, als die aus der gleichen Anlage untersuchten EPS von Belebtschlammflocken. Martin-Cereceda et al. (2001) konnten nachweisen, dass in einer kaskadisch angelegten Biofilmreaktoranlage, die mit realem Abwasser betrieben wurde, die Zusammensetzung des Biofilms am Anfang der Kaskade eine andere war, als am Ende der Kaskade. Dies wird dadurch verständlich, da die Nährstoffzusammensetzung des Abwassers zu Beginn der Kaskade eine andere war, als an deren Ende.

Piciooreanu et al. (2000) weist darauf hin, dass besonders in der frühen Phase der Biofilmbildung die Charakteristik der Substratverfügbarkeit eine wichtige Rolle spielt. Auch Stoodley et al. (1999) und Wimpenny u. Colasanti (1997) bestätigen den großen Einfluß von Nährstoff- und physikalischen Bedingungen auf die Biofilmbildung.

Die Anfangsschritte der Biofilmbildung spielen eine wichtige Rolle und können einen beachtlichen Einfluss auf die Struktur und physikalisch/chemischen Eigenschaften des reifen Biofilms haben. Dies gilt besonders für die verfügbaren Nährstoffe und deren Anfangskonzentrationen (Hartmann, 1967; Flechter u. Flodgate, 1973; Bryers u. Characklis, 1981; Samuelsson u. Kirchmann, 1990).

In der vorliegenden Arbeit wurde Stickstoff als variabler Faktor in den Versuchsläufen gewählt. Speziell für Proteine ist Stickstoff unentbehrlich. Da die Umsetzung des Genotyps in den Phänotyp auch enzymatisch erfolgt, sind Enzyme – und somit auch Stickstoff - am Erfolg oder Misserfolg von mikrobiellen Zielen nicht unwesentlich beteiligt. Untersuchungen zum Einfluss von Stickstoff auf die Biofilmbildung sind bisher nur im sehr geringen Umfang durchgeführt worden, obwohl Stickstoff ein essentielles Element ist.

## 2 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den Einfluss von Stickstoff auf die Bildung von Biofilmen/EPS zu untersuchen.

Eine wichtige technische Voraussetzung für die Durchführbarkeit der Untersuchungen ist die Biofilmreaktoranlage. Sie ist so angelegt, dass es ermöglicht wird, die Stickstoffgehalte zu variieren und andere Parameter konstant zu halten. Neben den technischen Anforderungen wird ein geeignetes synthetisches Medium eingesetzt, mit dem die Mikroorganismen den Biofilm aufbauen können.

Die Untersuchungsmethoden sind so ausgewählt, dass der Einfluss der Stickstoffgehalte auf den gebildeten Biofilm deutlich wird. Die analytische Fraktionierung des gesamten Biofilms erstreckt sich über die gravimetrische Erfassung des Biofilms, den Wassergehalt, die Mikroorganismendichte, den Kohlenhydratgehalt, Proteingehalt, organischer Kohlenstoffgehalt, Stickstoffgehalt, Wasserstoffgehalt, Sauerstoffgehalt, Phosphorgehalt, Metallgehalt (speziell Calcium).

Die EPS werden aus den Biofilmen abgetrennt und die Extrakte auf ihre Gehalte auf Proteine, Kohlenhydrate, Metalle, Uronsäuren, G6PDH-Aktivität und AHL's hin untersucht. Die Trockensubstanzen der EPS werden gravimetrisch erfasst und die Gehalte an organischem Kohlenstoff und Stickstoff gemessen.

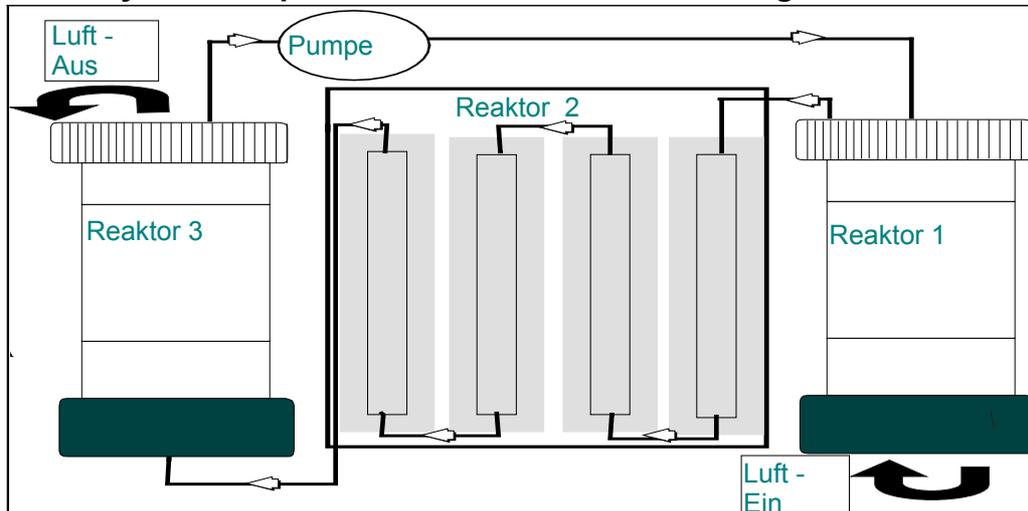
Die Auswertungen der Ergebnisse zeigen die Auswirkungen unterschiedlicher Stickstoffgehalte auf den Biofilm und die EPS. Die Resultate dienen dazu, deutliche Hinweise für zukünftige Biofilmuntersuchungen zu geben, als auch die Eigenschaften von Biofilmen und damit deren Einsatz, z. B. in der biologischen Abwasseraufbereitung, zu verbessern.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Aufbau und Betrieb der Biofilmreaktoranlage

Die nachfolgend beschriebene Biofilmreaktoranlage wurde entwickelt, um Biofilme reproduzierbar bilden zu können (Scheen, 1998).

##### 3.1.1 Systemkomponenten der Biofilmreaktoranlage

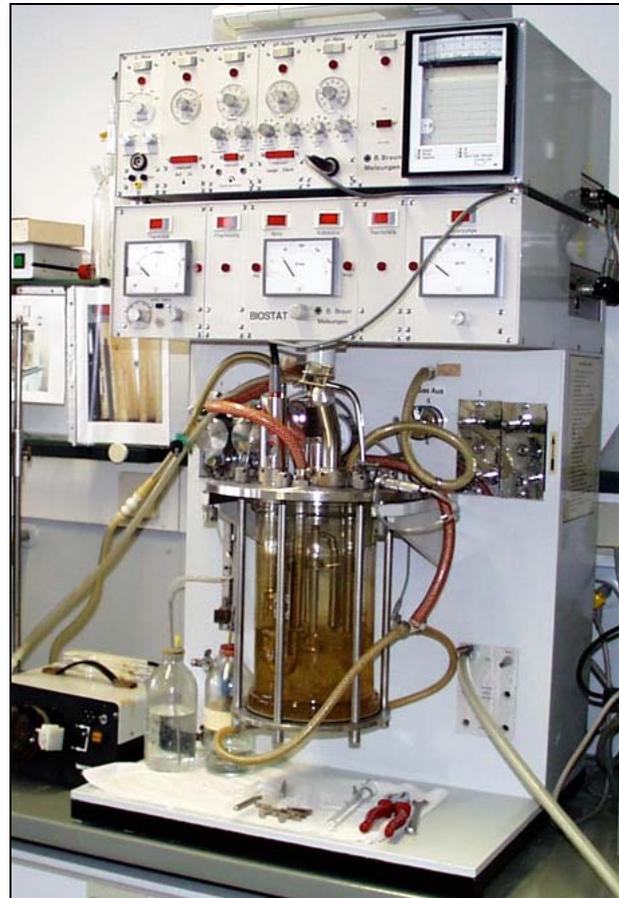


**Abbildung 3:** Schematische Darstellung der gesamten Biofilmreaktoranlage

Die Biofilmreaktoranlage besteht aus drei Hauptkomponenten (Reaktor 1, 2 und 3), auf die im folgendem näher eingegangen wird.

Reaktor 1 (Firma Braun, Melsungen) der Gesamtanlage dient zur Kontrolle und Korrektur der Systembedingungen (online-Steuerung des pH-Wertes, Luftzufuhr, Temperatur, Nährstoffzugabe und Durchmischung des Mediums; s. Kap. 3.1.2)

Die obere Abdeckplatte des Reaktorgefäßes hat insgesamt neun Ports, durch die Zulauf, pH-Wert-Messung, pH-Wert-Steuerung, Probennahme und die Druckluftmessung, die Temperatur geregelt bzw. gemessen werden. Durch die untere Grundplatte wird Luft eingeblasen, die vorher durch einen Entöler gereinigt wird. Die Temperatur wird durch eine in das Reaktorgefäß integrierte, innen mit Wasser durchflossene Schikane geregelt, die mit einer externen Temperaturregulierung (Modifikation) verbunden ist.



**Abbildung 4:** Reaktor 1 der Biofilmreaktoranlage



**Abbildung 5:** Reaktor 2 der Biofilmreaktoranlage

Reaktor 2 – Eigenbau und Kernstück der Biofilmreaktoranlage - wird aus Reaktor 1 mit wässrigem Medium angeströmt. Reaktor 2 hat mehrere Komponenten. Der obige Teil besteht aus 19 senkrecht stehenden und in Reihe verbundenen Glasröhren. In diese sind insgesamt 700 Immobilisationseinheiten (IE, s. Kap. 3.1.3) aus Polyethylen integriert. Das wässrige Medium durchfließt in Reihe die Glasröhren und die darin befindlichen IE. Die aus Reaktor 1 einströmende Druckluft baut einen Überdruck von 0,3-0,6 bar auf, bis der Druckwiderstand nachfolgender Reaktorteile überwunden ist. Der Überdruck ist die treibende Kraft für den weiteren Transport des wässrigen Mediums durch die Anlage bis in Reaktor 3.

Der untere Teil des Reaktor 2 ist ein Edelstahlzylinder (s. Abbildung: 6), der durch eine Öffnung im Boden (in Abbildung 3 anders dargestellt) mit dem wässrigen Medium aus Reaktor 1 angeströmt wird. Der obere Teil des Zylinders ist durch eine Abdeckplatte mit 19 Perforierungen verschlossen, an die jeweils nach oben und nach unten Glasröhren angeschraubt sind (Maße oben: 19 cm Länge, 1,5 cm Außendurchmesser. Maße unten: 13,4 cm Länge, 1,5 cm Außendurchmesser).

Die Platte wird fest auf den Edelstahlzylinder aufgeschraubt. Das in den Zylinder einströmende wässrige Medium durchströmt die Glasröhren mit den integrierten Immobilisationseinheiten auf einer Gesamtlänge von ca. 7 Metern. Das wässrige Medium durchfließt die neunzehn Röhren, bis zur letzten, einzig oben geöffneten Glasröhre. Daraus wird das wässrige Medium in Reaktor 3 weitergeleitet.



**Abbildung 6:** Edelstahlzylinder Reaktor 2



**Abbildung 7:** Grundplatte Reaktor 2



**Abbildung 8:** Reaktor 3 der Biofilmreaktoranlage

Ein Umwälzreaktor bildet die dritte Komponente der Gesamtanlage, den Reaktor 3. Dieser wird aus Reaktor zwei angeströmt. Das Innenteil des Reaktors besteht nur aus einer Entnahmeleitung für Reaktor 1 und einer Rückführleitung aus Reaktor 2. Die Rückführleitung ist so angelegt, dass das Gas/Wassergemisch knapp über dem Reaktorboden eingeleitet wird. Die dadurch entstehenden starken Verwirbelungen garantieren eine gute Durchmischung des Reaktorinhaltes. Mit der einzigen Pumpe der Anlage wird aus diesem Reaktor 1 angeströmt. Bei möglichen Undichten externer Schlauchverbindungen tritt dadurch nur ein Verlust von maximal 2 Liter wässrigen Mediums auf. Dies wird durch das Anbringen der Entnahmeleitung im oberen, inneren Bereich von Reaktor 3 erreicht.

Bei Batch-Betrieb ist der Reaktorkreislauf (Volumen: 20 Litern) geschlossen. Die in dieser Arbeit durchgeführten Läufe waren ausnahmslos Batch-Versuche. Im on-line Betrieb der Anlage wird Reaktor 3 nicht benutzt.

Mit dieser Anlagenkonfiguration wurden in 48 Reaktorläufen Biofilme mit acht unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen (s. Kap. 3.1.6) im synthetischen Nährmedium aufgebaut.

### 3.1.2 Systembedingungen

Die Versuchsläufe mit unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen im synthetischen Medium werden unter folgenden Bedingungen durchgeführt. Die Bedingungen werden im Reaktor 1 konstant gehalten:

#### Reaktor 1:

- pH-Wert: 7
- Temperatur: 30°C
- Rührung: 400 rpm
- Luftzufuhr: 6 L/min
- Sauerstoffgehalt: ca. 9,2 - 10 mg/L
- Überdruck: ca. 0,35 - 0,6 bar
- Füllvolumen des Reaktors: 5 L
- Durchfluss: 80 mL/min = 4,8 L/h
- hydraulische Verweilzeit: 64 min
- Animpfdichte:  $4 \cdot 10^3$  KBE/mL (s. Kap. 3.1.5 und 4.2.2)

#### Reaktor 2:

- Umfang: 60 cm
- Höhe: 32 cm
- Gesamtlänge der Glasröhren ca. 7 m
- Gesamtvolumen der 19 Glasröhren: 479 cm<sup>3</sup>
- Fläche der Immobilisationseinheiten: ca. 0,8 m<sup>2</sup>
- Überdruck: ca. 0,35 bar
- Sauerstoffgehalt: Einlauf ca. 9,3 - 10 mg/L – Auslauf ca. 6,7 mg/L
- Durchfluss: 80 mL/min = 4,8 L/h

#### Reaktor 3:

- Umfang: 60 cm
- Höhe: 67 cm
- Füllvolumen des Reaktors: 15 Liter
- Durchfluss: 80mL/min = 4,8 L/h
- hydraulische Verweilzeit: 192 min

Die oben angegebenen Sauerstoffkonzentrationen in der wässrigen Phase variieren innerhalb der einzelnen Stadien eines Versuchslaufes. Dies ist die Auswirkung von physiologischen Aktivitäten der Mikroorganismen in der wässrigen Phase und im Biofilm. Ein Druckanstieg in Reaktor 1 über den Anfangsüberdruck von 0,35 bar, wird durch die Bildung von Biofilm in Reaktor 2 hervorgerufen, da der Rohrquerschnitt durch den Biofilm in den Glasröhren verringert wird.

Der Anfangsüberdruck von ca. 0,35 bar bewirkt eine höhere Sauerstoffsättigung in das wässrige Medium als bei atmosphärischem Druck. Durch die Biofilmbildung steigt der Druck im Reaktor 1 um ca. 0,2 bar auf ca. 0,6 bar an.

Eine negative Beeinflussung auf die Mikroorganismen war durch den erhöhten Sauerstoffgehalt im wässrigen Medium nicht zu erwarten. Von Wilderer (1995) werden Versuche mit einem Membran-Biofilm-Reaktor beschrieben, die mit einem Überdruck von 3 bar gefahren wurden, was einer Sauerstoffkonzentration von 100 mg/L entsprach. Negative Auswirkungen auf den Biofilm wurden nicht beschrieben.

Eine erhöhte Sauerstoffsättigung kann auf den Biofilm positive Auswirkungen haben. Die Diffusionsrate des Sauerstoffs in tiefere Bereiche des Biofilms wird erhöht und

der erhöhte Sauerstoffeintrag kann dazu beitragen, sloughing-off entgegen zu wirken (Applegate, 1991).

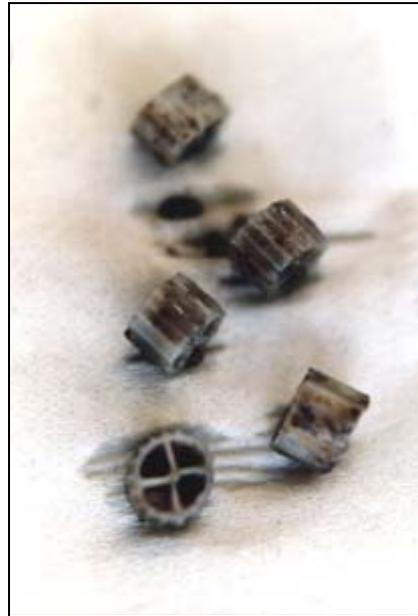
### 3.1.3 Immobilisationseinheiten (IE)

Die verwendeten IE wurden von der Fa. PURAC, Merseburg, zur Verfügung gestellt. Sie werden in der Abwasseraufbereitung im Kaldnes-Verfahren eingesetzt (Rusten et al., 1997/1999; Dalentoft u. Thulin, 1997).

Für die Versuchsläufe im Biofilmreaktor wurden innerhalb eines Versuchslaufes je 700 IE (wie unter 3.1.1 beschrieben) in die Glasröhren von Reaktor 2 eingesetzt. Die zylinderförmigen Kunststoffkörper bestehen aus Polyethylen HD (high density). Polyethylen HD eignet sich im Gegensatz zu Polyethylen LD (low density) gut als Bewuchsoberfläche, da sie mikrobiellen Einflüssen, wie dem Abbau oder Änderung der Oberflächeneigenschaften durch mikrobiellen Bewuchs, weitgehend widerstehen kann (Pommer, 1995). Die IE haben einen Durchmesser von 10 mm, sowie eine Höhe von 7 mm. Die Dichte beträgt  $0,96 \text{ g/cm}^3$ . Die 700 IE bieten eine Gesamtoberfläche von ca.  $0,8 \text{ m}^2$  zum Aufbau des Biofilms innerhalb der Glasröhren. Die Oberfläche der IE hat eine maximale Rauigkeit von  $3,1 \mu\text{m}$  an der Innenseite und von  $3,8 \mu\text{m}$  an der Außenseite. Die mittlere Rauigkeit beträgt an der Innenseite  $2,5 \mu\text{m}$  und an der Außenseite  $2,9 \mu\text{m}$ . Die Rauigkeit gibt die Tiefe der Unebenheiten an und wurde mit einem Perthometer gemessen. Eine Umrechnung des gebildeten Biofilms auf die Fläche der IE wurde nicht durchgeführt, da die Verteilung des Biofilms auf die Fläche der IE in den unterschiedlichen Versuchsläufen nicht gleichmäßig war.

Eine ungleichmäßige Verteilung des Biofilms ist durch die diffusen Strömungsverhältnisse im Reaktor 2 bedingt, die zu einer uneinheitlichen Dicke des Biofilms führt.

In der Entwicklungsphase der Biofilmreaktoranlage wurde Granulat aus Glas als Bewuchsoberfläche für die Biofilme getestet. Aus denen mit den IE aus Polyethylen und denen mit Glasgranulat bepackten Glasröhren im Reaktor 2 wurde der gebildete Biofilm je Glasröhre gravimetrisch erfasst. Der Bewuchs mit Biofilm auf den Polyethy-



**Abbildung 9:** Mit Biofilm bewachsene IE



**Abbildung 10:** Mit Biofilm bewachsene IE in den Glasröhren von Reaktor 2

leneinheiten war um ca. 10% höher als auf dem Glasgranulat. Der Durchfluss und die Verwirbelungen in den Glasröhren bewirkte zudem einen Abrieb des Glasgranulates. Der niedrigere Bewuchs und der Abrieb disqualifizierten das Glasgranulat als Immobilisationseinheiten für den Biofilmreaktor.

### 3.1.4 Synthetisches Medium

Bei Chandy u. Angles (2001) und Martienssen et al. (1997) wird darauf hingewiesen, dass ein C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 für mikrobielles Wachstum in planktonischen Systemen als optimiert gilt. Aus diesem Grunde wurden in dieser Arbeit die C:N:P-Verhältnisse im synthetischen Medium für die Biofilmbildung unter und über diesem Verhältnis angelegt. In den folgenden Tabellen 3 und 4 sind die Inhaltsstoffe und die Einwaagen für das synthetische Medium angegeben. Die variablen Stickstoffgehalte der einzelnen C:N:P-Läufe werden in der anschließenden Tabelle aufgeführt.

**Tabelle 3:** Zusammensetzung des Nährmediums in den C:N:P-Versuchsläufen

Komponente	pro Liter	in 20 Liter
<b>Saccharose</b> C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> ; [342,3] Merck 1.07651	4,37 mmol	87,4 mmol
<b>Ethanol</b> p. A.; 99,8% C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O; [46,07] AppliChem A 1613	1,05 mL	21 mL
<b>Ammoniumchlorid</b> NH <sub>4</sub> Cl; [53,49] Merck 1145	variiert, s. Ta- belle 4	variiert, s. Ta- belle 4
<b>di-Kaliumhydrogenphosphat</b> K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 3 H <sub>2</sub> O; [174,18] Merck 5104.1000	0,43 mmol	8,6 mmol
<b>Eisen(II)-sulfat</b> FeSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O; [278,02] Merck 3965	0,036 mmol	0,72 mmol
<b>Magnesiumsulfat</b> MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O; [246,48] Merck 5886	0,051 mmol	1 mmol
<b>Calciumchlorid</b> CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O; [147,02] Merck 2382	0,099 mmol	1,97 mmol
<b>Spurenelementstammlösung</b> (Zusammensetzung s. Kap. 7.2)	0,2 mL	4 mL

**Tabelle 4:** Konzentrationen an  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [53,49] in den unterschiedlichen C:N:P-Versuchsläufen

<b>Molares C:N:P-Verhältnis</b>	<b><math>\text{NH}_4\text{Cl}</math> pro Liter</b>	<b><math>\text{NH}_4\text{Cl}</math> in 20 Litern</b>
<b>100:1:1</b>	0,71 mmol	0,0141 mol
<b>100:5:1</b>	3,53 mmol	0,0705 mol
<b>100:8:1</b>	5,64 mmol	0,1128 mol
<b>100:10:1</b>	7,05 mmol	0,1410 mol
<b>100:12:1</b>	8,46 mmol	0,1692 mol
<b>100:14:1</b>	9,87 mmol	0,1973 mol
<b>100:18:1</b>	12,68 mmol	0,2537 mol
<b>100:20:1</b>	14,1 mmol	0,2823 mol

Für jeden Versuchslauf wurden 20 Liter synthetisches Medium mit entsprechender Zusammensetzung angesetzt. Um eine homogene Verteilung des Mediums zu gewährleisten, wurden Reaktor 1 mit 5 Litern und Reaktor 3 mit 15 Litern separat befüllt. Die Zusammensetzungen der Nährmedien (mg/L) sind im Anhang unter 7.2 aufgeführt.

### 3.1.5 Inokulum

Das Inokulum für die Versuchsläufe wurde aus einem Belebungsbecken der kommunalen Kläranlage Ölbach, Bochum-Querenburg entnommen. Dadurch wurde gewährleistet, dass das Inokulum artenreich ist und Ergebnisse auf reale Umweltbedingungen anwendbar sind (Neu u. Lawrence, 1999).

Vor dem ersten C:N:P-Versuchslauf wurden 2 Liter aus dem Belebungsbecken beprobt. Die Suspension wurde gekühlt transportiert und der Überstand zentrifugiert (12.000  $\text{g}$ , 4°C, 10 min). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet mit einer Natriumpyrophosphat-Lösung (Merck 6591; 1,6 g/L = 3,59 mmol, sterilfiltriert, 0,2  $\mu\text{m}$  Filter) aufgenommen und resuspendiert. Die Suspension wurde anschließend nochmals zentrifugiert (12.000  $\text{g}$ , 4°C, 10 min). Der Waschschrift wurde insgesamt dreimal wiederholt. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Pellet mit  $\frac{1}{4}$  konz. Ringerlösung (s. Kap. 3.4.1) aufgenommen und in Eppendorfgefäße (2 mL) portioniert. Für die spätere Verwendung wurden die Inokula eingefroren (-18°C). Vor Beginn eines jeden Versuchslaufes wurde ein Inokulum aufgetaut. Auch bei Stoodley et al. (1999) wurde mit Inokula gearbeitet, die eingefroren waren. Die 2 mL konnten nach dem Auftauen zur Animpfung des jeweiligen Versuchslaufes eingesetzt werden.

Diese Vorgehensweise gibt die notwendige Voraussetzung, die unterschiedlichen Versuchsläufe mit der gleichen Mikropopulation zu starten. Die Lebendkeimzahlbestimmung der Mikroorganismen im Inokulum wurde durch Auszählen (KBE = kolonienbildende Einheiten) bestimmt. Die Vorgehensweise ist unter 3.4.2 beschrieben.

### 3.1.6 Ablauf der C:N:P-Versuchsläufe

Nach der Reinigung und des Aufbaus der Biofilmreaktoranlage werden für jeden Versuchslauf folgende Arbeiten durchgeführt:

1. Ansetzen des synthetischen Mediums in 5 bzw. 15 Liter Portionen.
2. Auffüllen von Reaktor 1 (5 Liter) und Reaktor 3 (15 Liter) mit synthetischen Medium.
3. Auftauen des Inokulum und Animpfung des Versuchlaufes im Reaktor 1.
4. Die Pumpe zwischen Reaktor 3 und Reaktor 1 wird erst ca. 1 Stunde nach der Animpfung gestartet. Durch die Inbetriebnahme der Pumpe wird der Wasserkreislauf der Anlage in Gang gesetzt.
5. Nach Überschreitung der hydraulischen Verweilzeit von Reaktor 1 wird die erste Wasserprobe am Auslauf von Reaktor 2 gezogen. Aus dieser Probe wird der Start-DOC (s. Kap. 3.3.9) des Versuchlaufes bestimmt.

Nach diesem Schema wurden für diese Arbeit 48 Versuchsläufe durchgeführt. Die Anzahl einzelner Versuchsläufe mit unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen zeigt folgende Tabelle 5.

**Tabelle 5:** Anzahl der Versuchsläufe mit C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 - 100:20:1

<b>100:1:1</b>	<b>100:5:1</b>	<b>100:8:1</b>	<b>100:10:1</b>	<b>100:12:1</b>	<b>100:14:1</b>	<b>100:18:1</b>	<b>100:20:1</b>
5 Läufe	5 Läufe	6 Läufe	6 Läufe	8 Läufe	8 Läufe	5 Läufe	5 Läufe

Ausschlaggebend für die Beendigung der einzelnen Versuchsläufe ist der DOC. Er wird nach dem Start (s. oben) und dann alle 24 h gemessen. Wenn die zu Beginn gemessene Konzentration von ca. 1.030 mg/L DOC auf unter 50 mg/L DOC abgesunken ist, wird der Versuchslauf gestoppt. Die Immobilisationseinheiten mit dem gebildeten Biofilm werden zügig aus Reaktor 2 separiert und der Biofilm weiterbehandelt. Das weitere Vorgehen ist unter Kap. 3.2 beschrieben.

## 3.2 Ernten des Biofilms

### 3.2.1 Ausbau der Immobilisationseinheiten (IE)

Wenn das Ende eines Versuchslaufes erreicht ist, wird die Kreislaufführung der Anlage gestoppt. Anschließend wird Reaktor 2 demontiert und die IE aus den Glasröhren herausgeholt. Dabei musste darauf geachtet werden, dass auch der Biofilm an den Innenseiten der Glasröhren mit abgespült wurde.

Die Abspülung der IE aus den Glasröhren mit VE-Wasser brauchte ein Volumen von ca. 0,8 Litern für die neunzehn oberen Glasröhren. Aus den unteren Glasröhren wurden für die Ablösung des Biofilms ca. 0,6 Liter VE-Wasser benötigt.

Der Vorgang des Ausbaus und die Separierung der IE müssen sofort nach Öffnung der Anlage durchgeführt werden, um den Biofilm in seinem nativen Zustand nicht zu verändern. Die weitere Behandlung des Biofilms wird unter Kap. 3.2.2 beschrieben.

### 3.2.2 Ablösen des Biofilms von den IE

Um die mögliche mechanische Zerstörung der Mikroorganismen durch die Ultra Turrax Behandlung zu überprüfen, wurde die Biofilm-Feuchtmasse parallel mit einem Handhomogenisator homogenisiert. Die Vergleichsmessungen wurden mit KBE (Kolonienbildende Einheiten) durchgeführt. Die Ergebnisse sind unter Kap. 4.2.2 dargestellt.

Die Trennung des Biofilms von den IE wird durch Scherkräfte erreicht. Gute Voraussetzungen dafür bietet der Ultra Turrax. Der Ultra Turrax wurde nach jedem Einsatz mit VE-Wasser und Ethanol (ca. 96%, vergällt) intensiv gereinigt. Bei Stillstandzeiten wurde der Scherkopf in Ethanol gelagert.

Zur Ablösung des Biofilms von den IE muss der Scherkopf des Ultra Turrax in ein leeres Becherglas bis auf den Grund des Glases aufgesetzt werden. Erst dann wird die Waschlösung mit den IE in das Becherglas überfüllt (s. Abbildung 11). Dadurch ist gewährleistet, dass die rotierenden Scheren des Ultra Turrax die IE nicht direkt kontaktieren und beschädigen.

Die Geschwindigkeit des Ultra Turrax wird so eingestellt, dass die IE in der wässrigen Phase stetig in Bewegung bleiben und wechselnd den Scherkräften am Boden des Becherglases ausgesetzt sind (s. Abbildung 12). Diese Vorgehensweise wird für ca. 10 min durchgeführt.

Nach dem Ablösen des Biofilms von den IE wird das Becherglas für mindestens 10 min stehen gelassen. Anschließend werden die IE vorsichtig aus dem Becherglas separiert. Dabei ist darauf zu achten, dass möglichst wenig wässrige Phase an den IE haften bleibt. Die IE werden in einem Becherglas gesammelt, damit sich noch Restwasser absetzen kann. Das so gewonnene Gesamtwasser mit dem Biofilm wird anschließenden zentrifugiert (s. Kap. 3.2.3).



**Abbildung 11:** Ultra Turrax Behandlung der IE vor dem Start



**Abbildung 12:** Ablösung des Biofilms mit dem Ultra Turrax von den IE

### 3.2.3 Zentrifugation der Biofilm-Suspension

Der von den IE separierte Biofilm wird durch Zentrifugation aus der wässrigen Phase abgetrennt. Hierzu wird die Suspension mit den Biofilmen bei 10.000 rpm (12.000 ´g [DIN58970-1], bei 4°C) für 15 min zentrifugiert. Nachdem der gesamte Biofilm abzentrifugiert ist, werden die Zentrifugenröhrchen für ca. 5 min, mit der Öffnung nach unten, abgestellt. Dies garantiert das Abfließen des nicht im Biofilm gebundenen Wassers. Der abzentrifugierte Biofilm, mit maximalem Wassergehalt, wird in dieser Arbeit als Biofilm-FM bezeichnet.

Einige der Überstände aus den Zentrifugationen wurden auf ihren Gehalt an  $C_{org.}$  und Proteinen gemessen. Auf diese Messungen wird unter Kap. 4.2.8 eingegangen.

### 3.2.4 Homogenisierung des Biofilms

Der abzentrifugierte Biofilm wird in einer ausgewogenen Glasschale gesammelt und sofort gravimetrisch gemessen (s. Kap. 3.3.1).

Der in der Glasschale gesammelte Biofilm wird anschließend manuell, unter zu Hilfe-nahme eines Metallspatels, homogenisiert. Dabei ist besonders darauf zu achten, dass visuell gut zu erkennende Verdichtungen, meist in kugeliger Form, gut aufzulösen sind. Die intensive Homogenisierung nimmt ca. 4-6 min in Anspruch.

An die Homogenisierung des geernteten Biofilms schließen sich die weiteren Schritte wie die Bestimmung des Wassergehaltes (s. Kap. 3.3.2), Lebendkeimzahl als Kolo-nienbildende Einheiten (KBE) im Biofilm-FM (s. Kap. 3.4.2), Messung der Gesamt-keimzahl im Biofilm-FM mit dem Fluoreszenzmikroskop (s. Kap. 3.4.1) und die EPS-Extraktion (s. Kap. 3.5.1) an.

Als Rückstellprobe werden Teile des homogenisierten Biofilms in verschließbare Gläser überführt und bei -18°C eingefroren. Mit den eingefrorenen Biofilmen wurden nach dem Auftauen auch CER-Extraktionen (Kation-Austauscherharz, s. Kap. 3.5) durchgeführt. Da mit Unterschieden zwischen frischem Biofilm und aufgetauten Bio-film zu rechnen ist, sind im Ergebnisteil die Resultate aus den aufgetauten und fri-schen Biofilmen getrennt dargestellt.

## 3.3 Methoden zur Bestimmung chemisch/physikalischer Parameter

### 3.3.1 Gravimetrische Bestimmung der Biofilms-FM

Der geerntete Biofilm (s. Kap. 3.2.4) wird in eine getrocknete (105°C, über Nacht) und im Eksiccator bis auf Gewichtskonstanz abgekühlte Glasschale überführt und ausgewogen. Aus der Rechnung

$$\text{(Leergewicht Glasschale + Biofilm)} - \text{(Leergewicht Glasschale)} = \text{Biofilm-FM}$$

ergibt sich das Gewicht des Biofilm-FM in g. Die Separierung und das Auswiegen muss schnell vollzogen werden, da ansonsten Wasser aus dem Biofilm evaporiert. Desgleichen gilt für die sich anschließende Homogenisierung des Biofilms.

### 3.3.2 Bestimmung des Wassergehaltes und Gewinnung der Biofilm-TM

Die Angaben zum Wassergehalt von Biofilmen sind in der Literatur unterschiedlich. Oftmals wird die Probenvorbereitung zur Wassergehaltmessung nicht angegeben. In dieser Arbeit wird die maximale Wasserhaltekapazität durch Zentrifugation (s. Kap. 3.2.3) erreicht. Der Schritt der Zentrifugation – d.h. das Abtrennen des Biofilms aus der wässrigen Phase – und das Abtrennen des Biofilmpellets vom nicht im Biofilm gebundenen Wassers, gewährleistet die Messung der maximalen Wasserhaltekapä-

azität des Biofilm-FM. In folgenden Kapiteln wird die Wasserhaltekapazität mit dem Wassergehalt der in dieser Arbeit untersuchten Biofilme gleichgesetzt.

Nach der gravimetrischen Bestimmung des Gesamtgewichtes des Biofilm-FM und der Entnahme des homogenisierten Biofilms zur Messung der Mikroorganismendichte und der Extraktion mit CER, wird der restliche Biofilm in einer zuvor ausgewogenen Glasschale getrocknet (105°C, über Nacht, bis zur Gewichtskonstanz; Schaule et al., 2000).

Nach dem Erreichen der Gewichtskonstanz wird der Wassergehalt des Biofilms nach folgender Gleichung ausgerechnet:

$$\text{(Glasschale + Biofilm-FM)} - \text{(Glasschale + Biofilm-TM)} = \text{Wassergehalt}$$

Der Gehalt an Wasser wird auf den prozentualen Anteil, bezogen auf Biofilm-FM, umgerechnet. Der Biofilm ohne Wassergehalt ist in dieser Arbeit als Biofilm-TM bezeichnet.

Um den Biofilm-TM weiter untersuchen zu können, wird er aus den Glasschalen entfernt und in einem Mörser homogenisiert. Der so vorbereitete Biofilm wird im Exsiccator rückgestellt. Alle Biofilm-TM Proben bleiben bis kurz vor den Messungen im Exsiccator, um die hygroskopischen Eigenschaften des Biofilm-TM auszuschließen.

Aus dem Biofilm-TM wird der Gehalt an  $C_{\text{org}}$ , N, H, O, Metalle, Proteine und Kohlenhydrate gemessen. Die Messmethoden werden in den folgenden Kapiteln beschrieben.

### 3.3.3 Kohlenstoffmessung aus dem Biofilm-TM

Der Gehalt an organischen Kohlenstoff aus dem Biofilm-TM wird mit einem Elementaranalysator der Firma LECO, Typ: CHNS-932, gemessen. Pro Probe wird eine Dreifach-Bestimmung vorgenommen. Aus den Werten wurde der Mittelwert gebildet und die Werte in %, oder mg/g im Ergebnisteil (s. Kap. 4.1.3) angegeben.

Zusätzlich wurden Vergleichsmessungen zur Bestimmung des TOC durchgeführt. Dies war notwendig, um auszuschließen, dass in den Biofilm-TM Proben noch anorganischer Kohlenstoff mitgemessen wird.

Dazu wurden je Probe ca. 10 mg Biofilm-TM in 10 mL VE-Wasser (0,2 µm Filter, sterilfiltriert) mit dem Ultraschall-Stab (Ultraschall Sonorex Super, 80% Leistung, im Eisbad) suspendiert und intensiv homogenisiert. Aus diesen Proben wurde der TOC gemessen.

### 3.3.4 Stickstoff – Messung aus dem Biofilm-TM

Mit einem Elementaranalysator von LECO wird der Gehalt an Stickstoff<sub>gesamt</sub> aus dem Biofilm-TM bestimmt. Die getrockneten Proben werden in Dreifach-Bestimmung gemessen. Aus den Werten wird der Mittelwert bestimmt. Die Ergebnisse sind im Kapitel 4.1.4 dargestellt.

### Ammonium-N Messung aus dem Restwasser des synthetischen Mediums

Die Ammonium-N Messungen werden mit insgesamt 8 wässrigen Proben aus C:N:P-Läufen durchgeführt. Diese Proben werden als Restwässer bezeichnet. Diese werden aus dem Reaktorkreislauf nach dem Ende der einzelnen Versuchsläufe entnommen. Es waren die gleichen Läufe, aus denen die EPS direkt mit CER extrahiert wurden. Die Untersuchungen wurden durchgeführt, um die Restgehalte an Ammonium-N nach Beendigung der C:N:P-Läufe im wässrigen Medium festzustellen. Damit wird überprüft, inwieweit der Ammonium-N in den Biofilm aufgenommen wurde.

Die einzelnen Proben werden generell kurz vor dem Stopp des Versuchslaufe aus dem Auslauf des zweiten Reaktors gezogen und zentrifugiert (10.000 rpm = 12.000 `g, 10 min, 4°C). Aus dem Überstand wurde anschließend der Gehalt an NH<sub>4</sub>-N nach DIN-38406 E5 gemessen. Die Ergebnisse sind unter Kap. 4.1.4 dargestellt.

### **Nitrat-Messung aus dem Restwasser des synthetischen Mediums**

Aus dem Restwasser abgeschlossener C:N:P-Läufe wurde der Gehalt an Nitrat mit dem WTW Multilab P5 photometrisch nach der Merck Spektroquant Methode 14773 gemessen. Die Probenvorbereitung war die gleiche wie unter Kap. 3.4.1. Das Vorkommen von Nitrifikanten wird in Kap. 3.4.5 beschrieben.

### **3.3.5 Wasserstoff – Messung aus dem Biofilm-TM**

Der Wasserstoffgehalt wurde wie der Sauerstoff- (s. Kap. 3.3.6) und Stickstoffgehalt (s. Kap. 3.3.4) mit dem Elementaranalysator von LECO aus dem Biofilm-TM gemessen. Die getrockneten Proben werden in Dreifach-Bestimmung gemessen. Aus den Resultaten wird der Mittelwert bestimmt. Die Ergebnisse sind in % und mg/g im Kapitel 4.1.5 in den Abbildungen dargestellt.

### **3.3.6 Sauerstoff – Messung aus dem Biofilm-TM**

Der Gehalt an Sauerstoff aus dem Biofilm-TM (s. Kap. 3.3.2) werden mit dem Elementaranalysator von LECO bestimmt. Die Messungen werden dreifach durchgeführt. Die Ergebnisse werden im Kap. 4.1.3 angegeben.

### **3.3.7 Phosphor – Messungen aus dem Biofilm-TM**

Die Phosphorgehalte im Biofilm-TM (s. Kap. 3.3.2) werden analog den Metallmessungen (s. Kap. 3.3.8) mit der ICP (induktiv gekoppeltes Plasma; Liberty 200, Fa. Varian) bestimmt. Die Ergebnisse sind unter Kap. 4.1.7 angegeben.

### **Phosphor – Messungen im synthetischen Medium und in den Restwässern der C:N:P-Läufe**

Die Phosphor-Messungen wurde aus insgesamt 8 C:N:P-Versuchsläufen durchgeführt. Dabei handelt es sich um die Läufe, aus denen die EPS direkt, ohne Einfrierungsschritt, extrahiert wurden. Die Messungen wurden durchgeführt, um den Verlauf des Phosphorgehaltes in den synthetischen Medien und in den Restwässern der abgeschlossenen C:N:P-Läufe zu bestimmen.

Die einzelnen Proben werden unmittelbar vor dem Stopp der Versuchsläufe aus dem Auslauf des Reaktor 2 gezogen und zentrifugiert (10.000 rpm = 12.000 `g, 10 min, 4°C). Aus den Überständen wurden anschließend die Gehalte an Phosphor nach DIN EN 1189 D11 gemessen.

### **3.3.8 Metall - Messungen aus dem Biofilm-TM**

Aus dem Biofilm-TM (s. Kap. 3.3.2) wird mit der ICP der Gehalt an Metallen (Calcium, Mangan, Eisen, Magnesium, Natrium, Kalium) bestimmt. Alle Messungen aus Biofilm-TM werden nach DIN EN 11885, mit dem Aufschluss nach DIN ISO 13346, durchgeführt. Die Ergebnisse sind im Kap. 4.1.8 dargestellt. Nach dem gleichen Verfahren wurden die Gehalte an Metallen aus den EPS-Extrakten gemessen (s. Kap. 4.3.5).

### 3.3.9 Gelöster organischer Kohlenstoff – DOC und gesamter organischer Kohlenstoff - TOC

Der DOC/TOC aus den wässrigen Medien wird mit dem Dimatoc 100 (Fa. DIMATEC) gemessen. Der DOC wird gemessen, um die jeweiligen Reaktorläufe von Start bis zum Ende auf den Gehalt an gelösten organischen Kohlenstoff zu bestimmen. Dies ist notwendig, weil der DOC das notwendige Ende eines Reaktorlaufes anzeigt. Das Ende eines Laufes wird erreicht, wenn im wässrigen Medium des Laufes der Wert unter 50 mg/L DOC lag.

Die Probenvorbereitung zur Messung des DOC umfasst die Zentrifugation (10.000 rpm = 12.000 g) der wässrigen Proben. Die Pellets werden verworfen und aus dem Überstand wird der DOC mit dem DIMATEC-Gerät in Dreifach-Bestimmung gemessen. Hieraus wird dann der Mittelwert berechnet und in mg/L angegeben.

Der Verlauf des DOC-Abbaus in den unterschiedlichen C:N:P-Läufen war ab dem Verhältnis von 100:5:1 gleich. Der DOC erreichte in allen dieser Läufen nach ca. 72 Stunden einen DOC <50 mg/L. Auf das Ergebnis zu den Läufen bei einem C:N:P-Verhältnis von 100:1:1 wird in Kap. 4.1.9 eingegangen.

Des Weiteren wurde der DOC zur Kontrolle der BSB-Messungen (Biochemischer Sauerstoffbedarf, s. Kap. 3.4.6) eingesetzt.

Die unter Kap. 3.3.3 angegebenen Kontrollmessungen zum  $C_{org}$  des Elementaranalysators mit dem Dimatoc 100 sind TOC-Messungen. Der Unterschied zum DOC liegt darin, dass die Proben zur TOC-Messung nicht zentrifugiert werden. Die Biofilm-TM Proben wurden vor der Messung des TOC mit dem Ultraschallstab homogenisiert. Die Ergebnisse sind unter Kap. 4.3.3 angegeben.

## 3.4 Methoden zur Bestimmung mikrobiologischer und biochemischer Parameter

### 3.4.1 Fluoreszenzmikroskopische Auszählung der Mikroorganismen

Zur Bestimmung der Mikroorganismendichte werden ca. 50-150 mg Biofilm-FM aus den C:N:P-Lauf in 200 mL steriler Ringerlösung (Zusammensetzung s. unten) suspendiert. Die Lösung wird mit dem Ultra Turrax (IKA-Labortechnik, gelber Bereich = 8000 Leerlaufumdrehungen  $\text{min}^{-1}$ ) homogenisiert. Die Homogenisierung erfolgt für ca. 2-5 min (s. Frølund et al., 1995). Nach der Homogenisierung werden die entsprechenden Volumina zur Bestimmung der Mikroorganismendichte (s. Kap. 3.4.1 u. 3.4.2), und MPN (Most probable number, s. Kap. 3.4.5) für die Konzentration von Nitrifikanten, entnommen.

Aus dem Homogenisat wird 1 mL in 8,6 mL steriler Ringerlösung suspendiert. Zum Anfärben (Visualisierung von Nukleinsäuren) werden 0,4 mL Acridinorange (5%-ige w/v Stamm-Lösung aus Merck 1.15931, sterilfiltriert, 0,2  $\mu\text{m}$  Filter) zupipettiert. Die Mikroorganismen verbleiben für ca. 5 min in der 0,2%-igen Acridinorange-Lösung (Sprenger, 1996).

Anschließend wird die gesamte Lösung mit einem Vakuumfiltrationsgerät filtriert (ISOPORE Membrane Filters, 2,5 cm, Type: 0,2  $\mu\text{m}$  GTBP02500). Danach wird das Filter zunächst mit 10 mL steriler 1%-iger Natrium-Pyrophosphat-Lösung und anschließend mit gleichem Volumen an sterilem VE-Wasser gespült. Das Filter wird in eine Petrischale übertragen und im Dunkeln getrocknet. Nach der Trocknung wird es auf einen Objektträger mit Immersionsöl (Waldeck, 50670100) fixiert.

Anschließend wird die zu betrachtende Fläche des Filters mit einem Immersionssöltropfen abgedeckt. Dann wird das Filter mit einem Deckgläschen belegt. Das Deckgläschen muss an den Auflagekanten mit Kleber (Entellan Merck, 7961) fixiert

werden. Dies ist notwendig, um die Objekte mit einem ZEISS Auflichtfluoreszenz Inversmikroskop auszuzählen.

Die Auszählung der rötlich fluoreszierenden Mikroorganismen erfolgt in einem Gitternetz (100µm • 100µm) bei 1000-facher Vergrößerung (Immersionsöl). Das Gitternetz wird in 20 verschiedenen Gesichtsfeldern ausgezählt. Die Ergebnisse werden gemittelt und mit dem Mikroskopfaktor (s. unten) multipliziert. Anschließend werden die Daten auf mg Biofilm-FM umgerechnet.

Wenn die Objekt mit den fixierten und angefärbten Mikroorganismen nicht sofort ausgezählt wurden, werden sie verschlossen (Petrischale) und unter Lichtabschluss gelagert.

#### **Berechnung des Mikroskopfaktors:**

Die Fläche des Gitternetzes wird mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt. Bei 1000-facher Vergrößerung betrug die Fläche des Gitternetzes 0,006944444 mm<sup>2</sup>. Der Radius des Membranfilters wird durch die seitliche Auflagefläche des Vakuumfiltrationsgerätes auf 2 cm begrenzt. Die Fläche des Filters betrug 314,1592654 mm<sup>2</sup>. Die Division der Fläche des Filters durch die Fläche des Gitternetzes ergab einen Mikroskopfaktor von 45238,94. Mit diesem Faktor wurden die Auszählergebnisse multipliziert. Die Ergebnisse sind unter Kap. 4.2.1 angegeben.

#### **Ringerlösung, ¼ konz.:**

2,25 g	NaCl
0,10 g	KCl
0,08 g	CaCl <sub>2</sub> • 2H <sub>2</sub> O
0,05 g	NaHCO <sub>3</sub>

ad 1000 mL VE-Wasser. Die Lösung wird bei 121°C für 20 min autoklaviert.

#### **3.4.2 Kolonienzahlbestimmung der Mikroorganismen als kolonienbildende Einheiten (KBE)**

Die Dichte der Mikroorganismen im Biofilm wird durch Ausstreichen und Auszählen der Mikroorganismen auf Standard I Nähragar (Merck 7881) in Petri-Schalen, bestimmt.

Mit dem in steriler Ringerlösung homogenisierten Biofilm (s. Kap. 3.4.1), wird eine Verdünnungsreihe in steriler Ringerlösung durchgeführt. Dazu werden 100 µl des Homogenisats in 3 mL steriler Ringerlösung pipettiert (Verdünnung 1:31). Nach intensiver Homogenisierung im Reagenzglasschüttler werden aus der 1:31 Verdünnung 100 µl in 3 mL steriler Ringerlösung pipettiert. (Verdünnung 1:961). Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Daraus ergaben sich die Verdünnungen von 1:29791 und 1:923521. Die Verdünnungsschritte und die Ausplattierungen wurden jeweils in Doppelbestimmung durchgeführt. Unter der sterilen Gloove-Box wurden je 100 µl aus den Verdünnungen ausplattiert.

Anschließend wurden die beimpften Agarplatten bei 30°C im Brutschrank inkubiert. Die Kolonienzahl wurde nach 12 h, 24 h, 48 h, 72 h und 96 h, oder bis zur Kolonienzahlkonstanz, ausgezählt. Aus den berechneten Mittelwerten werden die Mikroorganismendichten je mg Biofilm-FM berechnet. Die Ergebnisse sind unter Kap. 4.2.2 dargestellt.

### **KBE-Bestimmung des Inokulum**

Die Auszählung der Lebendzellzahl als KBE im Inokulum der C:N:P-Läufe (s. Kap. 3.1.5) wurde aus den aufgetauten 2 mL der Eppendorfgefäße gemessen. Die Vorgehensweise war die gleiche wie oben beschrieben. Die Ergebnisse sind unter Kap. 4.2.2 dargestellt.

### **3.4.3 Protein – Messung aus dem Biofilm-TM**

Die Proteinmessungen aus den Biofilm-TM Proben, als auch aus den EPS-Extrakten, wurde mit zwei Methoden gemessen. Die grundlegende Methode zur Proteinbestimmung von Lowry et al. (1951). Die zweite Methode (Frølund et al., 1996) ist dahingehend modifiziert, dass ein möglicher Huminstoffanteil in den Proben mit berücksichtigt wird. Die Möglichkeit von Huminstoffen in den Biofilmen wurde überprüft. Huminstoffe konnten nicht festgestellt werden. Nach dieser Überprüfung sind die Proteine mit der Methode von Lowry et al. (1951) gemessen worden.

Des Weiteren wird in der modifizierten Methode nach Frølund et al. (1996) SDS (Natriumdodecylsulfat) eingesetzt. Das SDS dient zur Steigerung der Löslichkeit von Lipoproteinen (Spaeth u. Wuertz, 2000). SDS wurde bei den Protein-Messungen aus dem Biofilm-TM und den EPS-Extrakten nicht eingesetzt. Vergleichsmessungen zwischen SDS-Anwendung und der Probenvorbereitung mit Ultraschall zeigten durchgehend höhere Proteinwerte mit der Probenvorbereitung durch Ultraschall. Eine wesentlich bessere Auffaltung von Proteinagglutinationen wird bei Saborio et al. (2001) zur besseren Analyse von Prionen dargestellt und hat auch in dieser Arbeit den gleichen Effekt.

Im folgenden sind beide Methoden komplett aufgeführt, wobei die Original-Methode nach Lowry et al. (1951) die Maßgebliche war. Im Ergebnisteil sind nur Werte aus diesen Messungen angegeben.

Der Gesamtprotein-Anteil der Biofilme wurde aus dem Biofilm-TM (s. Kap. 3.3.2) gemessen. Dazu wurden ca. 10 mg des getrockneten Biofilms in 10 mL VE-Wasser (sterilfiltriert, 0,2 µm Filter) suspendiert. Der Lösevorgang wurde durch Ultraschall erreicht. Das VE-Wasser / Biofilm-TM-Gemisch wurde für ca. 3 min mit dem Ultraschallstab (Sonifier, 80%, im Eisbad) suspendiert und homogenisiert. Nach der Angleichung auf Raumtemperatur wurden die Messungen durchgeführt.

#### **Proteinmessungen nach Lowry et al. (1951):**

Die Prozedere und eingesetzten Chemikalien für die Messung der Proteine nach Lowry et al. (1951), waren folgende:

Als Standard diente BSA (Rinderserumalbumin, Serva 11930). Die Kalibriergrade wurde von 0 - 60 mg mit BSA erstellt. Die Korrelationskoeffizienten lagen bei allen Messungen über 0,9. Die Proben wurden mindestens zweimal und bei jedem Probendurchgang dreifach auf den quantitativen Proteingehalt gemessen.

**Reagenzien** (Molekulargewichte etc. s. Frølund et al., 1996):

**Lösung 1:**

143 mmol NaOH  
270 mmol Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>

**Lösung 2:**

57 mmol CuSO<sub>4</sub>

**Lösung 3:**

124 mmol Na-tartrate

**Lösung 4:**

Lösung 1, 2, 3 im Verhältnis von 100:1:1 mischen.

**Lösung 5:**

Folin Reagenz (Merck 109001) mit VE-Wasser im Verhältnis von 5:6 vermischt.

**Vorgehensweise:**

0,5 mL der Probe werden mit 0,7 mL von Lösung 4 gut gemixt. Lösung 5 wird mit 0,1 mL hinzugefügt und nochmals gut gemischt. Nach 45 min bei Raumtemperatur werde die Absorptionen bei 750 nm im Photometer (Spectrometer, Perkin Elmer) bestimmt.

Der Nullabgleich wird mit Aqua dest. durchgeführt. Die Proben werden dreifach bestimmt. Aus den Messungen wird der Mittelwert errechnet und umgerechnet auf mg/g bzw. % von der Biofilmeinwaage und im Ergebnisteil angegeben.

**Protein-Messung nach Frølund et al. (1996)**

**Chemikalien:**

- Di-Natriumtartrat-dihydrat
- Dodecylsulfat Natriumsalz = SDS
- Folin-Ciocalteus Phenolreagenz
- Kupfersulfat-Pentahydrat
- Natriumcarbonat, wasserfrei
- Natriumhydroxid
- Bovine Serum Albumin, Serva 11930 (BSA)
- Huminsäure

**Lösung 1:**

0,143 mol L<sup>-1</sup> (5,7196 g L<sup>-1</sup>  $\equiv$  1,4299 g auf 250 mL<sup>-1</sup>) NaOH [39,997] und 0,270 mol L<sup>-1</sup> (28,6168 g L<sup>-1</sup>  $\equiv$  7,1542 g auf 250 mL<sup>-1</sup>) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> [105,988] in VE-Wasser

**Lösung 2:**

0,057 mol L<sup>-1</sup> (14,2313 g L<sup>-1</sup>) Kupfersulfat-Pentanhydrat [249,683] in VE-Wasser

**Lösung 3:**

0,124 mol L<sup>-1</sup> (28,5299 g L<sup>-1</sup>) Di-Natriumtartrat-dihydrat [230,08] in VE-Wasser

**Lösung 4:**

VE-Wasser

**Arbeitsreagenz Proteinbestimmung:**

Lösung 1, 2 und 3 im Verhältnis 100:1:1 (z. B. 40 mL + 0,4 mL + 0,4 mL) mischen (vor Gebrauch frisch ansetzen)

**Arbeitsreagenz Huminstoffbestimmung:**

Lösung 1, 3 und 4 im Verhältnis 100:1:1 (z. B. 40 mL + 0,4 mL + 0,4 mL) mischen (vor Gebrauch frisch ansetzen)

**Phenolreagenz:**

5 mL Folin Ciocalteus Phenolreagenz (Merck 109001) in 6 mL VE-Wasser lösen (braunes Glas verwenden)

**Stammlösungen:**

200 mg/L BSA mit 1% SDS in VE-Wasser (Kalibrierung: 20/40/60 mg/l)

100 mg/L Huminsäure in VE-Wasser (Kalibrierung: 20/40/60/80/100 mg/l)

**Durchführung der Proteinbestimmung nach Frølund et al., 1996:**

Alle Proben mit 1% SDS (Endkonzentration) versetzen

- 0,5 mL Probe + 0,7 mL Arbeitsreagenz Proteinbestimmung und vorsichtig mischen

- 20 min stehen lassen bei Raumtemperatur (RT), danach wird 0,1 mL Phenolreagenz hinzugegeben

- 30 min bei RT stehen lassen

- anschließend wird von allen Ansätzen die Absorption bei 750 nm im Photometer (Spectrometer, Perkin Elmer) gemessen. Alle Messungen werden gegen VE-Wasser durchgeführt. Alle Ansätze sind dreifach bestimmt worden, woraus dann der Mittelwert berechnet wurde. Die Korrelationskoeffizienten waren bei allen Messungen der Kalibrierreihe über 0,9.

**Durchführung der Huminstoffbestimmung:**

- 0,5 mL der Probe + 0,7 mL Arbeitsreagenz Huminstoffbestimmung und vorsichtig mischen

- 20 min stehen lassen bei RT; danach 0,1 mL Phenolreagenz hinzugeben

- 30 min bei RT stehen lassen

- anschließend wird von allen Ansätzen die Absorption bei 750 nm im Photometer gemessen. Alle Messungen werden gegen VE-Wasser und dreifach Bestimmt - woraus dann der Mittelwert angegeben wird.

**Auswertung:**

$$A_{\text{Protein}} = 1,25 \cdot (A_{\text{Protein gem.}} - A_{\text{Humin, gem.}})$$

$$A_{\text{Humin}} = A_{\text{Humin, gem.}} - 0,2 \cdot A_{\text{Protein}}$$

### 3.4.4 Kohlenhydrate – Messung aus dem Biofilm-TM

Die Kohlenhydrate Messungen aus dem Biofilm-TM (s. Kap. 3.3.2) werden aus den gleichen Proben wie die Proteinmessungen durchgeführt. Dazu werden ca. 10 mg des getrockneten Biofilms in 10 mL VE-Wasser (sterilfiltriert 0,2 µm Filter) gelöst. Die Resuspendierung und Homogenisierung wird durch Ultraschall erreicht. Die Wasser/Biofilm-TM Suspension wird für mindestens 3 min mit dem Ultraschallstab (Sonifier, 80%, Eisbad) behandelt. Nach dem Ausgleich an Raumtemperatur werden die Messungen durchgeführt.

#### Kohlenhydrate-Assay nach Dubois et al. 1956

##### Chemikalien:

- Konzentrierte Schwefelsäure,  $H_2SO_4$ , [98,08], 95-97 %, Merck 159425, p.A.
- Phenol,  $C_6H_5OH$ , [94,11], Merck 1.00206.1000, p.A.
- Glucose,  $C_6H_{12}O_6$ , [180,16], Merck 8337.1000, p.A.

##### Arbeitsreagenz Kohlenhydratbestimmung

- 5 g Phenol in 100 mL VE-Wasser lösen (unter dem Abzug) = Phenol Lösung 5% (w/v)

##### Stammlösung

- 200 mg/L Glucose-Stammlösung; Kalibrierung: 20/100/200 mg/l. Alle Korrelationskoeffizienten der Kalibriergraden lagen über 0,9

##### Durchführung der Kohlenhydratbestimmung:

- 0,5 mL der Probe mit 0,5 mL der Phenol-Lsg. versetzen und gut mischen
- anschließend 2,5 mL konz. Schwefelsäure direkt hinzugeben und gut mischen

Die ersten beiden Schritte der Durchführung sind an höchstens 3 Proben schnell hintereinander auszuführen

- wenn alle Proben so behandelt worden sind, bleiben sie für 10 min bei Raumtemperatur stehen

- anschließend kommen die Proben für 15 min bei 30°C ins Wasserbad

- nach 5 min wurde die Absorption 490 nm im Photometer (Spectrometer, Perkin Elmer) gemessen

Alle Messungen werden gegen VE-Wasser als Nullpunkt gemessen. Die Proben werden mindestens zwei mal und bei jedem Probendurchgang dreifach gemessen. Die angegebenen Ergebnisse sind Mittelwerte. Die Mittelwerte werden auf mg/g bzw. % im Ergebnisteil (s. Kap. 4.2.4) angegeben.

### 3.4.5 Most probable number (MPN) der Nitrifikanten

Zur Überprüfung auf Nitrifikanten wurde die im folgenden beschriebene MPN-Methode eingesetzt.

**Medium** (Schneider u. Rheinheimer, 1988):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1,0 g
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0,5 g
NaCl	2,0 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,2 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,05 g
$\text{CaCO}_3$	6,0 g
Phenol red. 0,5%	0,01 g
ad 1000 mL VE-Wasser	

In Reagenzgläser wurde 9 mL des obigen Mediums pipettiert. Die Reagenzgläser wurden mit Kapsenbergkappen verschlossen und anschließend bei 121°C für 20 min autoklaviert.

Mit der Biofilm-Suspensions (s. Kap. 3.4.2) wurden dezimale Verdünnungsreihen (3-fach) in der Gloove-Box durchgeführt. Die Verdünnungsreihen wurden für jeweils 4 Wochen inkubiert (30°C). Die Ansätze wurden täglich geschüttelt.

Eine positive Reaktion, die auf ein Vorkommen von Nitrifikanten hindeuten, ist durch den farblichen Umschlag der MPN-Reihe (von orange nach gelb) zu erkennen.

### 3.4.6 Messung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB) im Sapromaten

Der BSB kann Hinweise über die physiologischen Reaktionen der Mikroorganismen auf unterschiedliche C:N:P-Verhältnisse geben, dies gilt speziell für potentiell toxische Auswirkungen hoher Ammonium-N Gehalte in den C:N:P-Verhältnissen.

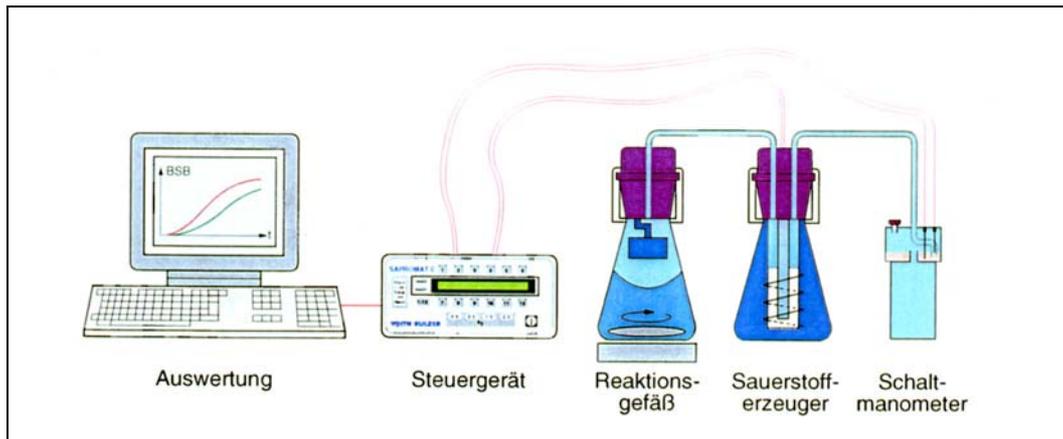
Dabei ist im Vergleich zum Biofilm ein deutlicher Unterschied zu beachten. Bei diesem Untersuchungsparameter handelt es sich um planktonische Versuchsanordnungen – es wird möglicherweise deutlich, wie die Mikroorganismen durch den Verbrauch an Sauerstoff auf unterschiedliche C:N:P-Verhältnisse reagieren.

Die Versuchsläufe werden in Doppelbestimmung durchgeführt. Als Inokulum dient die gleiche Mikroorganismenpopulation (s. Kap. 3.1.5) wie für die Untersuchungsläufe in der Biofilmreaktoranlage.

Am Sapromaten wird stündlich der Sauerstoffverbrauch aufgezeichnet. Ein erstreckt sich über mindestens 120 Stunden. Am Ende der Läufe wird der BSB und der DOC gemessen. Die stündlichen Sauerstoffverbrauchsraten ( $\text{O}_2$ ) der Mikroorganismen werden gegen die Zeit (h) aufgetragen.

Ein deutlicher Nachteil dieser planktonischen Versuche ist die Kontrolle des pH-Wertes. Er kann nach Versuchsbeginn nicht mehr reguliert werden. Diese Bedingung kann zu einer anderen Entwicklung der Zusammensetzung der mikrobiellen Population führen und läuft nicht analog mit der Entwicklung im Biofilmreaktor.

Diese Untersuchungen können als Screening angewendet werden. Die Einsatzfähigkeit der BSB-Messung im Sapromaten ist z. B. auf die Voruntersuchungen von Abwässern, um eine biologische Behandlung und notwendige anorganische Nährstoffzugaben abzuschätzen, anzuwenden. Aus den Variationen der Nährstoffzugaben können aus den Verlaufskurven und den Auswertungen Hinweise auf eine optimierte Reduzierung von Abwasserfrachten ermittelt werden.



**Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Sapromateinheiten zur BSB-Messung

Die Abbildung 13 zeigt die Einheiten des Sapromaten zur Bestimmung des BSB. Im Ergebnisteil werden die Sauerstoffverbrauchskurven aus verschiedenen C:N:P-Verhältnissen gegen die Zeit dargestellt.

### 3.5 Methoden zur EPS-Analytik

#### 3.5.1 Extraktion der EPS mit Kationaustauscherharz (CER)

Das CER wurde vor Verwendung im Extraktionspuffer (1 kg Dowex in 2 Liter Extraktionspuffer) für eine Stunde unter Rühren gewaschen. Aus dem homogenisierten Biofilm-FM (s. Kap. 3.2.4) wurden äquivalent 2-3 g TS entnommen. Der Biofilm wurde anschließend in 300 mL Extraktionspuffer suspendiert. Analog wurden je g TS Biofilm 70 g CER hinzugefügt. Die Suspension wurde für 2 Stunden bei 900 rpm und 4°C (Eisbad) gerührt.

Anschließend wurde die Suspension für 1 min mit 12.000  $\times$ g (10.000 rpm) und bei 4°C in der Ultrazentrifuge zentrifugiert werden. Das Pellet wurde verworfen und der Überstand nochmals mit 12.000  $\times$ g für 15 min und bei 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde wiederum verworfen und der Überstand mit 40.000  $\times$ g (20.000 rpm) für 15 min und bei 4°C, zentrifugiert.

Die zentrifugierten Suspensionen werden gesammelt und durch einen Membranfilter (Schleicher & Schuell, FP 30/0,2 CA-S, 0,2  $\mu$ m) filtriert (Frølund et al., 1996). Die filtrierten EPS-Extrakte werden homogenisiert und anschließend portioniert bei -18°C eingefroren. Zur Bestimmung von Kohlenhydraten, Proteinen, AHL, Trockensubstanz u.a. wurden die benötigten Volumina aufgetaut.

#### Chemikalien:

CER Dowex 50  $\cdot$  8, Na<sup>+</sup>-Form, stark sauer, Teilchengröße 20–50 mesh (Fluka 44445)

#### Extraktionspuffer:

2 mmol L<sup>-1</sup> Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Tri-Natriumphosphat-Dodecahydrat [163,94]; (Merck 6578)  
 4 mmol L<sup>-1</sup> NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> Natriumdihydrogenphosphat-monohydrat [137,99];(Merck 6345)  
 9 mmol L<sup>-1</sup> NaCl Natriumchlorid [58,44]; (Merck 6404)  
 1 mmol L<sup>-1</sup> KCl Kaliumchlorid [74,55]; (Merck 4936)

### 3.5.2 Messung der Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten

Die gravimetrischen Bestimmungen wurden durchgeführt, um den Trockensubstanzanteil der EPS-Extrakte zu bestimmen. Die gravimetrische Messung ist in der Analytik eine der zuverlässigsten Methoden.

Dazu werden definierte Volumina – in Doppelbestimmung - der Suspensionen aus der CER-Extraktion in ausgewogene und im Exsikkator getrocknete Glasschalen überführt. Die Glasschalen sind im Trockenschrank bei 105°C (über Nacht) bis zur Gewichtskonstanz getrocknet worden. Die Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten ergab sich aus der Gewichts Differenz von:

$$\text{(Glasschale + EPS-Extrakt)} - \text{(Glasschale + Trockensubstanz)}$$

Die Werte wurden auf 300 mL Extraktionspuffer umgerechnet. Die Nullwerte, d. h. die gravimetrischen Erträge des reinen Extraktionspuffers, mussten von denen der EPS-Extraktion subtrahiert werden. Die Ergebnisse der Feststoffanteile aus diesen Messungen sind im Kap. 4.2.8 dargestellt.

Aus dieser Trockensubstanz wird der organische Kohlenstoff und der Stickstoffgehalt mit dem Elementaranalysator von LECO gemessen.

### 3.5.3 Kohlenstoff<sub>org.</sub> – Messung aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte

Der organische Kohlenstoff (C<sub>org.</sub>) wird mit dem Elementaranalysator von LECO aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte gemessen. Die Proben sind wie unter Kap. 3.5.2 beschrieben vorbehandelt. Die Ergebnisse sind im Ergebnisteil unter Kap. 4.3.3 dargestellt.

### 3.5.4 Stickstoff – Messung aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte

Der Stickstoffgehalt in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte wurde mit dem Elementaranalysator von LECO gemessen. Die Proben waren wie unter Kap. 3.5.2 beschrieben vorbehandelt. Die Ergebnisse sind im Ergebnisteil unter Kap. 4.3.4 dargestellt.

### 3.5.5 Metall – Messung aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte

Die Messung der Metalle aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte wurde analog den Metall-Messungen aus dem Biofilm-TM durchgeführt (s. Kap. 3.3.8). Die Ergebnisse (s. Kap. 4.3.5) wurden im Ergebnisteil in mg/g oder % angegeben. Diese Messungen zeigen die Effektivität der CER-Extraktion bezüglich der Calcium-Komplexierung an. Bei einer effektiven CER-Extraktion sollten im Extrakt keine zweiwertigen Kationen – speziell Calcium – messbar sein.

### 3.5.6 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) mit den EPS-Extrakten

Diese Untersuchungen sind im Institut für Grenzflächen-Biotechnologie der Universität Duisburg durchgeführt worden. Es wurden nur die EPS-Proben aus dem „frischen“ Biofilm gemessen, da davon auszugehen war, dass die EPS aus den aufgetauten Biofilmen Lyseprodukte enthalten.

### Reagenzien

Die Reagenzien und Gele stammen alle von der Fa. Invitrogen. Die Artikelnummern sind in Klammern hinter dem Namen angegeben.

#### Tris-Glycin-SDS Laufpufferkonzentrat (LC2675)

Zur Herstellung des Laufpuffers wurde das Konzentrat vor dem Lauf 1:10 mit deion. Wasser verdünnt. Der Laufpuffer enthielt 2,9 g Tris, 14,4 g Glycin und 1,0 g SDS auf 1 L Deionat (pH 8,3)

#### SDS-Probenpuffer (LC2676)

2,5 mL 0.5 M Tris-HCl-Puffer (pH 6,8), 2,0 mL Glycerin, 4,0 mL 10 % (w/v) SDS-Lösung, 0,5 mL 0,1 % Bromphenolblau-Lösung auf 10 mL Deionat

#### Tris-Glycin-Fertiggele (EC6005)

Es wurden Tris-Glycin-Gele (8 cm • 8 cm) mit 12 % (w/v) Acrylamid 2,6 % (w/v) Bisacrylamid verwendet (Geldicke = 1,0 mm; Trenngel = 4 % (w/v) Acrylamid)

### Protein-Standards

Mark 12 Wide Range Protein Standard (LC5677)

Enthält:

Myosin	200.000 g/mol
β-Galactosidase	116.250 g/mol
Phosphorylase B	97.400 g/mol
Serumalbumin	66.300 g/mol
Glutamat-Dehydrogenase	55.400 g/mol
Lactat-Dehydrogenase	36.500 g/mol
Carboanhydrase	31.000 g/mol
Trypsin-Inhibitor	21.500 g/mol
Lysozym	14.500 g/mol
Aprotinin	6.000 g/mol
Insulin, B-Kette	3.500 g/mol
Insulin, A-Kette	2.500 g/mol

### Durchführung der Gelelektrophorese:

#### Probenvorbereitung

Die EPS-Extrakte wurden mit SDS-Probenpuffer bis zu einer Konzentration von 1,25 µg Protein in 25 µL verdünnt. Maßgeblich für die Verdünnungen waren die Proteinmessungen vom „frischen“ Biofilm, wie unter Kap. 4.3.8 dargestellt.

Die Verdünnung wurde in ein verschließbares Eppendorfgefäß gegeben und mit dem Vortex gut gemischt. Die Probenröhrchen wurden verschlossen und für 5 min in ein 85°C warmes Wasserbad gestellt. Sie wurden danach kurz in einem Eisbad abgekühlt und dann auf Raumtemperatur gebracht.

#### Elektrophoretische Trennung

Die Gelkassetten wurden vor der Elektrophorese auf Raumtemperatur gebracht und erst dann aus der Verpackung genommen, um eine Austrocknung der Gele zu vermeiden. Sie wurden mit deion. Wasser abgespült, der untere Verschluss sowie der obere Kamm entfernt und die Probenaschen mindestens vier mal mit dem verwendeten Laufpuffer gespült.

Die Kassetten wurden in die Elektrophoresekammer mittels zweier Klammern eingespannt und der Laufpuffer in beide Kammern eingefüllt.

In die Probenaschen wurden 25 µL Probenlösung vorsichtig eingefüllt.

Nach dem Verschließen der Kammer wurde eine konstante Spannung von 125 V angelegt. Wenn zwei Gele eingespannt wurden, entstand ein Strom von ca. 60 mA

beim Start, welcher bis zum Ende auf etwa 30 mA absank. Nach ca. 90 min war die blau gefärbte Lauffront zum unteren Ende gewandert. Die Elektrophorese wurde dann beendet und die Gelkassetten entnommen und vorsichtig geöffnet. Die Gele konnten dann zur sofortigen Fixierung und Färbung entnommen werden.

### **Silberfärbung**

Es wurde das kommerzielle Färbe-Kit „SilverXpress Silver Staining Kit“ (Art. Nr. LC6100) der Firma Invitrogen verwendet:

#### **Reagenzien:**

- Methanol z. A.
- Essigsäure z. A.
- deion. Wasser

#### **SilverXpress Silberfärbekit:**

Sensibilisierungsreagenz:

Enthält Glutaraldehyd.

Färbelösung A:

Enthält Silbernitrat.

Färbelösung B:

Enthält Ammoniumhydroxid und Natriumhydroxid.

Entwickler:

Enthält Formaldehyd und Zitronensäure.

Stopper:

Enthält Zitronensäure.

### **Durchführung**

Zur Fixierung wurde das Gel direkt nach dem Lauf in eine Mischung aus 100 mL Methanol, 90 mL deion. Wasser und 20 mL Essigsäure in eine Färbewanne gegeben und auf den Schütteltisch gestellt, welcher auf etwa einen Zyklus pro Sekunde eingestellt war. Dort blieben sie während des gesamten Färbevorgangs, ohne dass dies jetzt weiter erwähnt wird.

Nach 10 min Fixierung folgte der Sensibilisierungsschritt. Dazu wurde eine Lösung aus 105 mL deion. Wasser mit 100 mL Methanol und 5 mL Sensibilisierungsreagenz gegen die Fixierungslösung ausgetauscht. Für nichtreduzierte Gele dauerte dieser Schritt 2 • 10 min.

Danach wurde zweimal hintereinander für je 5 min mit je 200 mL deionisiertem Wasser gewaschen.

Für den Färbeschritt wurden 90 mL deionisiertem Wasser mit je 5 mL Färbelösung A und Färbelösung B gemischt. Eine anfänglich auftretende Trübung verschwand nach kurzem Umrühren. Das Gel wurde für 15 min in dieser Lösung gefärbt.

Es wurde danach wieder zweimal für je 5 min mit je 200 mL deion. Wasser gewaschen.

Zur Entwicklung wurden 95 mL deion. Wasser mit 5 mL Entwickler gemischt und das Gel solange in dieser Lösung geschüttelt, bis die Banden deutlich sichtbar waren, eine starke Hintergrundfärbung jedoch noch nicht auftrat. Um den Entwicklungs-

prozess zu beenden, wurden 5 mL Stopper direkt in die Entwicklungslösung gegeben.

Nach 10 min wurde noch dreimal mit je 200 mL deion. Wasser für 10 min gewaschen.

### 3.5.7 Messung von N-Acyl-L-Homoserinlactonen in den EPS-Extrakten

Dieser Test wurde im Labor des Instituts für Grenzflächen-Biotechnologie an der Universität Duisburg durchgeführt.

Es wurden folgende Medien vorbereitet:

#### **LB-Agar (Luria Broth-Agar)**

15 g Bacto-Agar (Difco)  
10 g Trypton (Difco)  
5 g NaCl (Merck 6404)  
5 g Hefeextrakt (Merck 103753)  
ad 1000 mL VE-Wasser

Das Nährmedium wurde mit 1 M NaOH auf einen pH-Wert von 7,0 eingestellt und anschließend für 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen auf 50°C wurden 15 mL Agarnährmedium in sterile Petrischalen gegossen.

#### **LB-Weichagar**

0,3 g Bacto-Agar (Difco)  
2 g Trypton (Difco)  
1 g NaCl (Merck 6404)  
1 g Hefeextrakt (Merck 103753)  
ad 100 mL VE-Wasser

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend wurde für 20 min bei 121°C autoklaviert. Dem LB-Weichagar wurde Kanamycin zugesetzt, so dass die Endkonzentration 25 mg/L betrug. Danach wurden jeweils 5 mL LB-Weichagar in ein steriles Reagenzglas gefüllt und bis zur weiteren Verwendung bei Raumtemperatur aufbewahrt.

#### **LB-Medium**

10 g Trypton (Difco)  
5 g NaCl (Merck 6404)  
5 g Hefeextrakt (Merck 103753)  
ad 1000 mL VE-Wasser

Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt und das Medium für 20 min bei 121°C autoklaviert. Nach dem Abkühlen wurde dem Medium Kanamycin zugesetzt, so dass die Endkonzentration 50 mg/L betrug.

#### **Anzucht von *Chromobacterium violaceum* CV026**

Aus einer Stammagarplatte mit *Chromobacterium* wurden einige Kolonien entnommen und in 0,14 M NaCl-Lösung suspendiert. Der Zelltiter dieser Bakteriensuspension wurde mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer bestimmt. In einem 100 mL Erlenmeyerkolben wurden 20 mL LB-Medium mit der Suspension so angeimpft, dass die Zell-

dichte  $10^6$  Zellen/mL betrug. Die Inkubation der Kultur erfolgte für 24 h bei 30°C und 180 rpm.

#### **Durchführung zur Bestimmung von AHL mit kurzer Acyl-Seitenkette**

Je 5 mL LB-Weichagar wurden im Wasserbad aufgeköcht, auf 49°C abgekühlt und mit 50 µL der angezogenen *Chromobacterium*-Kultur beimpft. Nach der Vermischung auf einem Reagenzglasschüttler wurden die 5 mL auf eine Petrischale mit 15 mL Agarnährboden ausgegossen. Nach dem Aushärten der Weichagarschicht für ca. 2 Stunden – bei Raumtemperatur – wurden mit einem sterilen Korkbohrer (Innendurchmesser 5 mm) Löcher in den Agar gestanzt. In die Löcher wurden 50 µl der EPS-Extrakte aus den Biofilmen pipettiert. Die Platten wurden bei 30°C für 24 h inkubiert. Eine positive Reaktion wird durch die Bildung eines violetten Hofes um das Loch angezeigt.

#### **Durchführung zur Bestimmung von AHL mit längerer Acyl-Seitenkette**

Der LB-Weichagar wurde aufgeköcht und beimpft (wie bereits oben beschrieben). Zusätzlich wurden je 5 mL LB-Weichagar 25 µL HHL-Lösung (N-Hexanoyl-L-homoserinlactone in 20µg/mL Acetonitril) zugegeben. Die weitere Vorgehensweise war die gleiche, wie bei dem Test auf kurze Acyl-Seitenkette. Eine positive Reaktion bestand bei diesem Test in einem farblosen Hof um das Probenloch bei violett gefärbter Umgebung. Ergebnisse zu diesem Test sind unter Kap. 4.3.7 zu finden.

#### **3.5.8 Protein – Messung aus den EPS-Extrakten**

Die tiefgefrorenen EPS-Extrakte (s. Kap. 3.5.1) wurden bis auf Raumtemperatur aufgetaut. Anschließend wurden die Proben mit dem Ultraschallstab behandelt (Sonifier, 80%, 3 min, Eisbad). Durch diese Probenvorbereitung war eine Gleichbehandlung der Proben mit der Biofilm-TM Proben sichergestellt. Die Durchführung der Proteinmessungen ist die gleiche wie unter Kap. 3.4.3 bereits beschrieben. Aus den gemessenen Proteinwerten wurde der Mittelwert berechnet. Die Ergebnisse sind im Ergebnisteil unter Kap. 4.3.8 angegeben.

#### **3.5.9 Kohlenhydrate – Messung aus den EPS-Extrakten**

Die tiefgefrorenen EPS-Extrakte wurden bis Raumtemperatur aufgetaut. Die weitere Behandlung der Proben ist die gleiche, wie sich auch für die Kohlenhydratbestimmung aus dem Biofilm-TM (s. Kap. 3.4.4) durchgeführt wurde. Die Ergebnisse sind unter Kap. 4.3.9 im Ergebnisteil dargestellt.

### 3.5.10 Uronsäure Messung aus den EPS-Extrakten

Die Uronsäuren wurden aus den aufgetauten EPS-Extrakten (s. Kap. 3.5.8. und 3.5.9) gemessen. Dabei wurde die Methode nach Filisetti-Cozzi u. Carpita, 1991 verwendet.

#### Chemikalien:

- Sulfaminsäure (Amidosulfonsäure), [97,09]
- konz. Schwefelsäure, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, , 95-97%, p.A., [98,08]
- di-Natriumtetraborat-decahydrat, p.A. [381,37]
- Kaliumhydroxid-Lösung, gesättigt [56,11]
- Natriumhydroxid, NaOH, [40]
- m-Hydroxybiphenyl (3-Phenylphenol) [170,21]
- 100 µg mL<sup>-1</sup> D-Glucuronsäure als Standard (20 /100 / 200 µg mL<sup>-1</sup>)

#### Lösung 1: Sulfamat-Lösung (4mol/L)

- 19,42 g Sulfaminsäure wurden in 20 mL Aqua dest. gerührt und bis zur Lösung tropfenweise KOH-Lösung (gesättigt) zugegeben (ca. 8 mL). Nach dem Abkühlen wurde der pH auf 1,6 eingestellt. Anschließend wurde mit Aqua dest. auf 50 mL aufgefüllt und die Lösung bei Raumtemperatur (RT) gelagert

#### Lösung 2: Schwefelsäure/Tetraborat-Lösung (0,075 mol/L)

- 5,7206 g di-Natriumtetraborat-decahydrat wurden in 200 mL konz. Schwefelsäure gelöst

#### Lösung 3: m-Hydroxybiphenyl-Lösung (0,15%)

- 15 mg m-Hydroxybiphenyl wurden in 10 mL 0,5% NaOH gelöst. Die Lösung wurde im Kühlschrank gelagert und ist bis zu einer Woche haltbar

#### Durchführung:

Die Proben wurden dreifach gemessen. Als Nullwert wurde Aqua dest. verwendet. Zu jeder Probe wurden 40 µL aus Lösung 1 gegeben und mit dem Reagenzglaschüttler (RG) gut vermischt. Anschließend wurden 2,4 mL aus Lösung 2 zugegeben und mit dem RG gemischt. Danach wurden die Proben für 20 min bei 100°C im Wasserbad erhitzt. Die Proben wurden für 5 min im Eisbad abgekühlt und anschließend mit 80 µL der Lösung 3 versetzt. Danach wurde die Lösung auf dem RG gemischt. Nach 10 min bei RT wurde die Absorption aller Ansätze bei 525 nm im Photometer gegen Aqua dest. gemessen. Die Ergebnisse sind unter Kap. 3.5.9 angegeben.

### 3.5.11 Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten

Die EPS-Extrakte werden mit dem Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivitätstest überprüft (Ng u. Dawes, 1973). Dies ist notwendig, um eine mögliche Lyse von Mikroorganismen zu überprüfen. Aus den insgesamt 16 verschiedenen CER-Extraktionen aus Biofilmen mit unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen im synthetischen Medium, waren 8 Biofilme nicht eingefroren worden, bevor die CER-Extraktion durchgeführt wurde. Sie wurden im Ergebnisteil als „frisch“ dargestellt. Die EPS-Extrakte aus vorher eingefrorenem Biofilm sind als „aufgetaut“ gekennzeichnet.

**Reagenzien:**

0,12 mol L<sup>-1</sup> Tris/HCl-Puffer pH 8,6 (Merck 1.08382.0100):

3,6342 g Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 2-Amino-2-hydroxy-methylpropan-1,3-diol) wurden in 230 mL VE-Wasser gelöst, mit 4 mol L<sup>-1</sup> wässriger Salzsäure auf pH 8,6 eingestellt und mit VE-Wasser auf 250 mL aufgefüllt

0,12 mol L<sup>-1</sup> Tris/HCl-Puffer pH 7,5:

3,6342 g Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), 2-Amino-2-hydroxy-methylpropan-1,3-diol) wurden in 230 mL VE-Wasser gelöst, mit 4 mol L<sup>-1</sup> wässriger Salzsäure auf pH 7,5 eingestellt und mit VE-Wasser auf 250 mL aufgefüllt

0,02 mol L<sup>-1</sup> Glucose-6-phosphat-Lösung (Sigma G7375):

Am Tag der Messung wurden 101,6 mg Glucose-6-phosphat in 18 mL VE-Wasser gelöst

0,01 mol L<sup>-1</sup>  $\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $\beta$ -NAD, Sigma N6522):

Am Tag der Messung wurden 39,8 mg  $\beta$ -NAD in 7 mL VE-Wasser gelöst

0,25 mol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>-Lösung:

12,7062 g MgCl<sub>2</sub> wurden in 250 mL VE-Wasser gelöst

**Durchführung:**

In Reagenzgläser (Dreifachbestimmung) wurde jeweils 0,5 mL 0,12 mol L<sup>-1</sup> Tris/HCl-Puffer pH 8,6; 0,375 mL 0,02 mol L<sup>-1</sup> Glucose-6-phosphat-Lösung; 0,25 mL 0,01 mol L<sup>-1</sup>  $\beta$ -NAD-Lösung; 0,09 mL 0,25 mol L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>-Lösung und 0,235 mL VE-Wasser pipettiert. Der Inhalt der Reagenzgläser wurde mit dem Reagenzglasschüttler gut gemischt und anschließend im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Zu den 1,45 mL Substratlösung wurden 0,05 mL der EPS-Suspensionen pipettiert und gut gemischt. Zu verschiedenen Zeitpunkten (0, 15, 30, 45, 60 min) wurden die Absorptionen der jeweiligen Ansätze bei 340 nm im Photometer (Spectrometer, Perkin Elmer) gemessen. Der Nullabgleich erfolgte mit VE-Wasser. Die Messwerte wurden gemittelt und werden im Kap. 3.5.10 gezeigt.

## 4 Ergebnisse

Die in diesem Kapitel dargestellten Ergebnisse zeigen die Resultate der Analysen aus den gebildeten Biofilmen im Reaktor 2, mit der in allen Versuchen immer gleichen Aufwuchsfläche von 0,8 m<sup>2</sup> auf den Immobilisationseinheiten (s. Kap. 3.1.2).

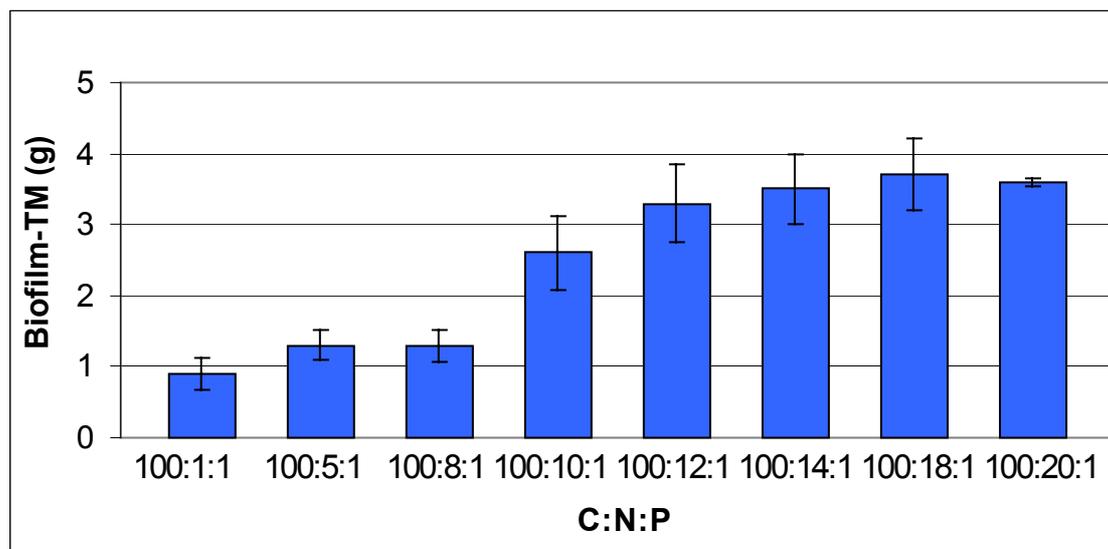
Die Ergebnisse errechnen sich aus den Mittelwerten von bis zu 48 Reaktorläufen. Als Zahlenwerte zu den Diagrammen werden die Versuchsanzahl (n), die Mittelwerte mit Standardabweichungen in Tabellenform im Anhang gezeigt. Die Darstellungen in den Diagrammen erfolgt als Biofilm-Trockenmasse (Biofilm-TM) und/oder Biofilm-Feuchtmasse (Biofilm-FM).

Die Darstellung als Biofilm-TM und Biofilm-FM ist unbedingt notwendig, da aus den Vergleichen erst deutlich wird, auf welche Fraktionen des Biofilms die unterschiedlichen C:N:P-Verhältnisse Einfluss genommen haben.

### 4.1 Ergebnisse der chemisch- physikalischen Parameter

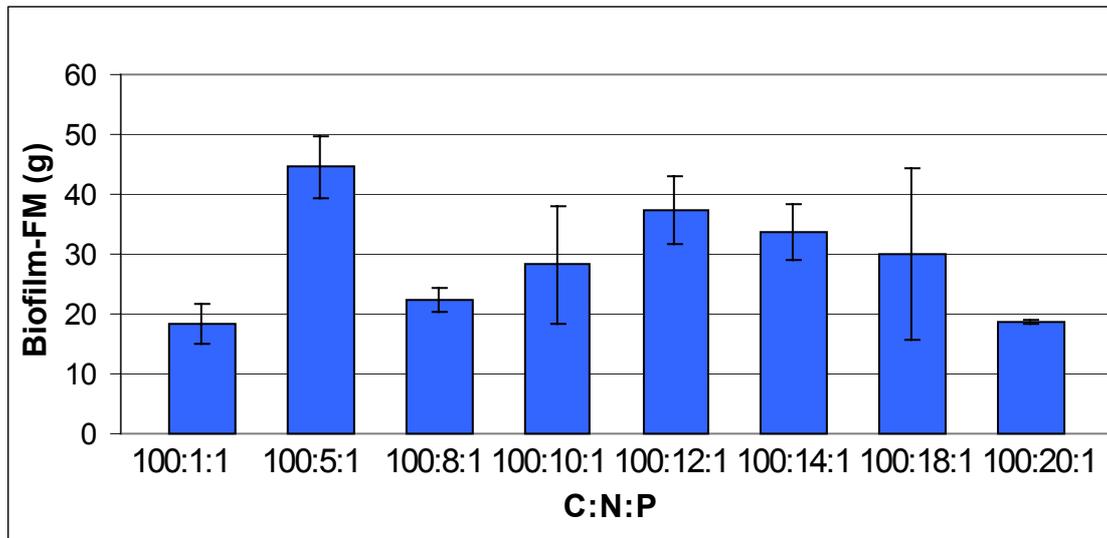
#### 4.1.1 Biofilmerträge TM und FM

Die folgenden Abbildungen 14 und 15 zeigen die Erträge an Biofilm-TM und Biofilm-FM aus C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 bis 100:20:1. Die Tabellen mit den Messdaten zu den Abbildungen 14 und 15 sind im Anhang dargestellt.



**Abbildung 14:** Erträge an Biofilm-TM aus den C:N:P-Verhältnissen auf 0,8m<sup>2</sup>

Der unterschiedliche Verlauf in Abbildung 14 zu denen in Abbildung 15 (s. unten) wird durch den abnehmenden Gehalt an Wasser (s. Kap. 4.1.2) in den Biofilmen, mit steigendem C:N:P-Verhältnis, hervorgerufen. Die Zunahme ist auf den steigenden Gehalt an Stickstoff im synthetischen Medium zurückzuführen, weil dieser die einzige Variable in den verschiedenen C:N:P-Läufen ist.



**Abbildung 15:** Erträge an Biofilm-FM aus den C:N:P-Verhältnissen auf 0,8 m<sup>2</sup>

Aus dem Verlauf in Abbildung 15 ist erkennbar, dass mit steigendem Stickstoffanteil ins synthetischen Medium, die Erträge an Biofilm-FM bis zu einem Verhältnis von 100:12:1 ansteigen – das Verhältnis von 100:5:1 ausgenommen – danach fallen die Erträge wieder ab. Aus dem Verlauf wird deutlich, dass eine Abhängigkeit zwischen dem Stickstoffanteil im synthetischen Medium und der quantitativen Biofilmbildung im zweiten Reaktor der Biofilmreaktoranlage besteht.

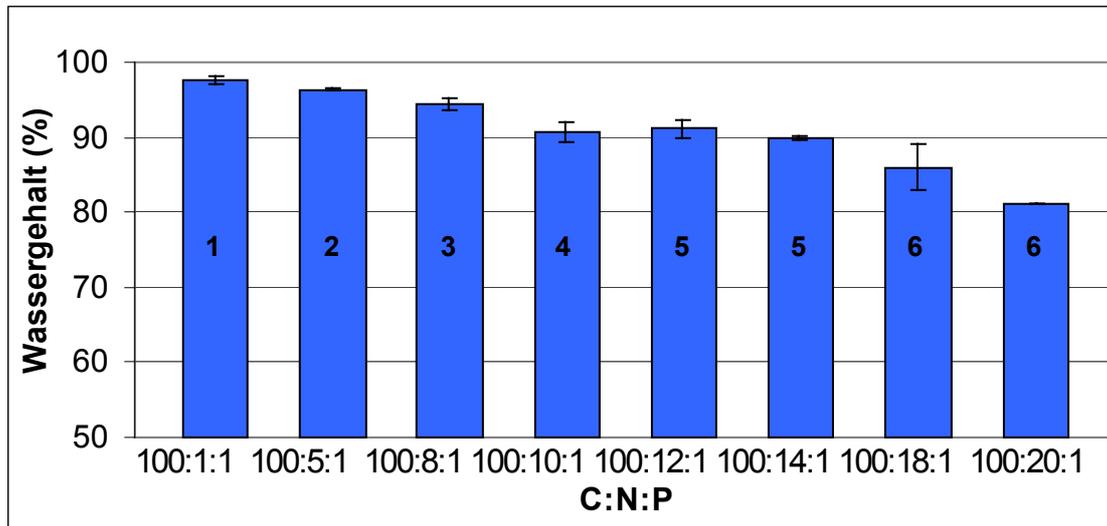
Durch eine Verlängerung der Standzeiten (9 Tage) des Biofilms und zusätzlichen Nährstoffzugaben, bilden sich deutlich dunklere Bereiche im Biofilm. Die folgende Abbildung 16 zeigt im Mittelteil die dunkleren bis schwarzen Biofilmbereiche in den Glasröhren von Reaktor 2. Sie traten nach zeitlich getrennten, dreimaligen Zugaben des synthetischen Mediums (C:N:P von 100:12:1) auf. Die erkennbaren dunkleren Bereiche könnten durch anaerobe sulfatreduzierende Mikroorganismen hervorgerufen worden sein.



**Abbildung 16:** Biofilmbildung mit aeroben und anaeroben Zonen in den Glasröhren von Reaktor 2

#### 4.1.2 Wassergehalte in den Biofilmen

Die Wassergehalte der untersuchten Biofilme (s. Kap. 3.3.2) liegen zwischen 81% und 98%. Bei steigendem Stickstoffgehalte im synthetischen Medium verringert sich der Wassergehalt im Biofilm. Die Abbildung 17 zeigt die Wassergehalte in den Biofilmen bei steigendem Stickstoffgehalte im synthetischen Medium (Zahlenzuordnungen in den Balken sind Einteilungen zur Konsistenz, siehe folgender Text). Die Tabellen mit den Messdaten zu der Abbildung 17 sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 17:** Wassergehalte der Biofilme aus den C:N:P-Verhältnissen (w/w)

Die Ursache für die Änderung des Wassergehaltes kann nur der unterschiedliche Stickstoffgehalte im synthetischen Medium sein.

Bereits bei der manuellen Homogenisierung des Biofilms zeigte sich bei den Biofilmen aus unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen im synthetischen Medium eine unterschiedliche Konsistenz der Biofilme. Rheologische Untersuchungen konnten mit den Biofilmen nicht durchgeführt werden. Eine subjektive Einteilung der Konsistenzen der Biofilme wird mit den Zahlenzuordnungen in den Messbalken der Abbildung 17 gegeben. Die Zuordnungen spiegeln in aufsteigender Folge die zunehmende Viskosität der Biofilme mit steigendem C:N:P-Verhältnis wieder: 1. dickflüssig, 2. zähflüssig, 3. leimartig, 4. leimartig+, 5. breiig, 6. pastös, 7. pastös+.

#### 4.1.3 Gehalte an organischem Kohlenstoff ( $C_{org.}$ ) in den Biofilmen

Der Biofilm-TM war, wie unter Kap. 3.3.2 beschrieben vorbehandelt. Der  $C_{org.}$  wurde mit dem Elementaranalysators von LECO gemessen. Die Prozentangaben sind in den Abbildungen 18 und 19 jeweils auf 1 g Biofilm-TM bzw. Biofilm-FM bezogen. Die Tabellen mit den Messdaten zu den Abbildungen 18 und 19 sind im Anhang aufgeführt.

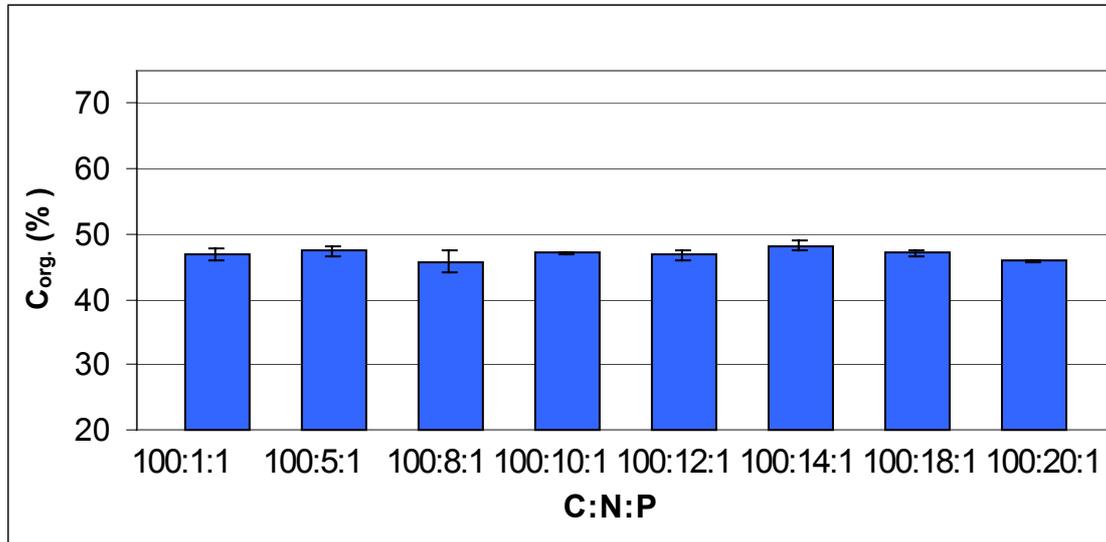


Abbildung 18: Gehalte an  $C_{org.}$  in Biofilm-TM (w/w)

Die Ergebnisse zeigen einen gleichmäßigen Gehalt an  $C_{org.}$  von  $46,9\% \pm 0,7$  und keinen Unterschied im Anteil des organischen Kohlenstoffs im Biofilm-TM bei unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen im synthetischen Nährmedium.

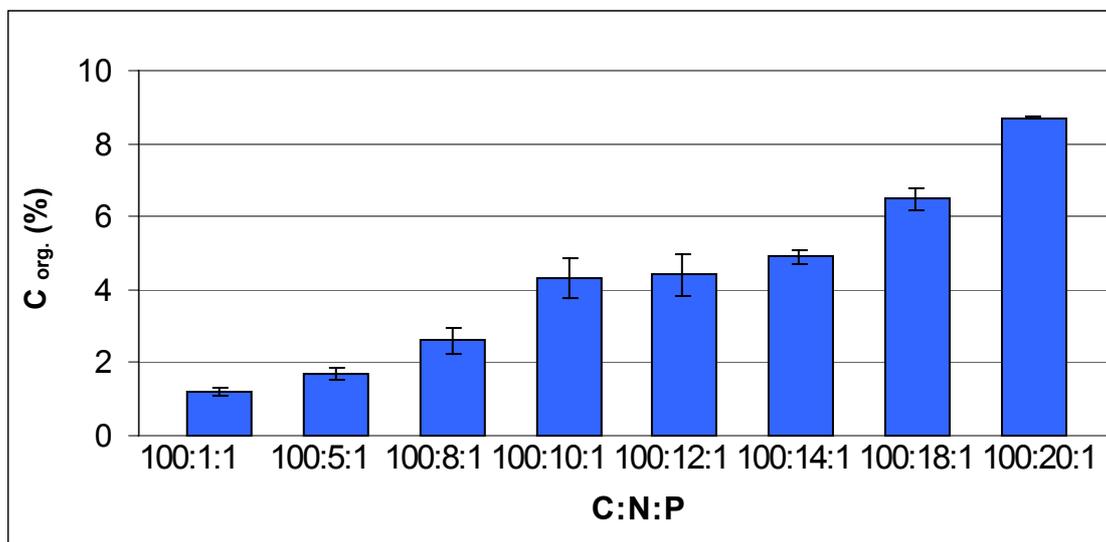


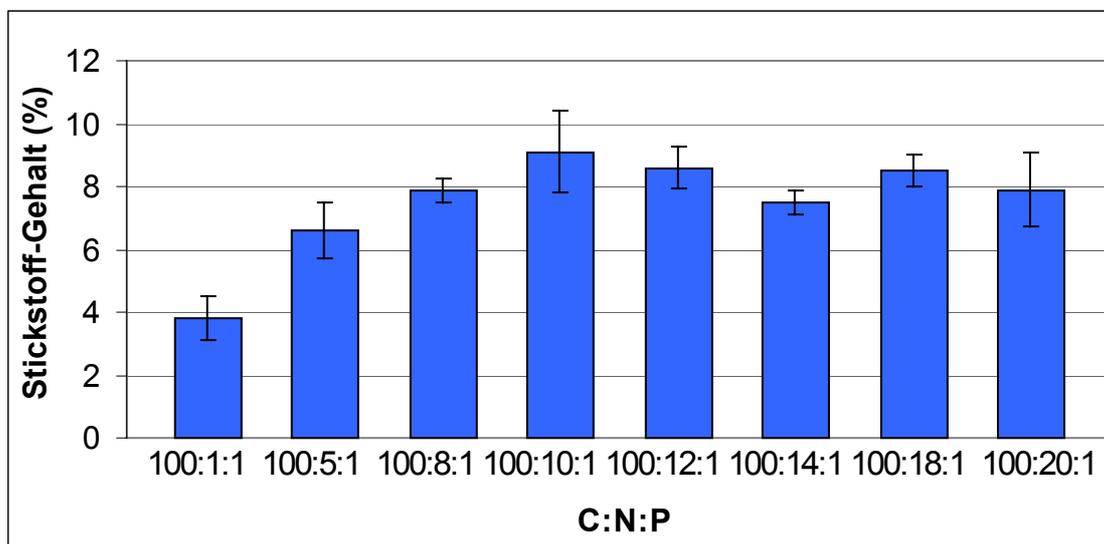
Abbildung 19: Gehalte an  $C_{org.}$  im Biofilm-FM (w/w)

Die im Biofilm-TM gleichen Gehalte von  $46,9\% \pm 0,7$  verändern sich im Biofilm-FM, weil der Wassergehalt in den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen mit berücksichtigt wird. Mit diesen Ergebnissen wird auch deutlich gemacht, wie wichtig es ist, die Ergebnisse aus den Biofilmen jeweils in Trockenmasse und Feuchtmasse anzugeben.

Um zu überprüfen, ob bei den Messungen des  $C_{org}$  mit dem Elementaranalysator nur der organische Kohlenstoff gemessen wurde, sind Vergleichsmessungen mit resuspendierten Biofilm-TM Proben mit dem TOC-Analysator (s. Kap. 3.3.3) durchgeführt worden. Die Ergebnisse aus den Vergleichsmessungen zwischen  $C_{org}$ (Elementaranalysator) und dem TOC-Analysator zeigten übereinstimmende Resultate. Die Probenvorbereitung der Biofilme, speziell die Trocknung bei 105°C (s. Kap. 3.3.2), können den möglicherweise vorhandenen anorganischen Kohlenstoff ausgetrieben haben und der mit dem Elementaranalysator gemessene Kohlenstoff war der Anteil an  $C_{org}$ .

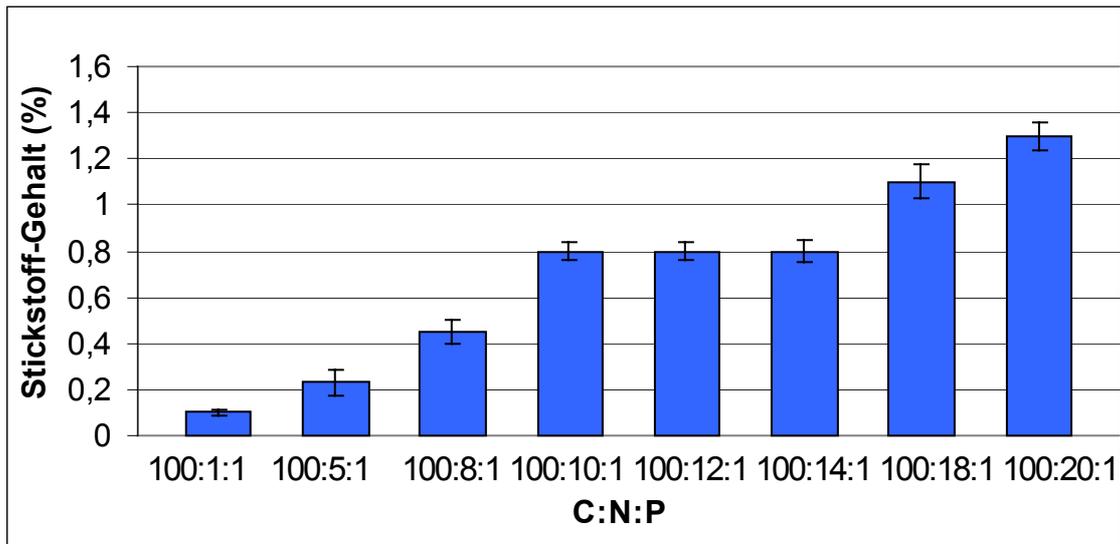
#### 4.1.4 Gehalte an Stickstoff in den Biofilmen

Stickstoff war der einzige Nährstoff in den synthetischen Medien, der verändert wurde. Die Abbildung 20 und 21 zeigen die Gehalte an Stickstoff, die aus dem Biofilm-TM und Biofilm-FM gemessen wurden. Die Tabellen mit den Messdaten zu den Abbildungen 20 und 21 sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 20:** Gehalte an Stickstoff im Biofilm-TM (w/w)

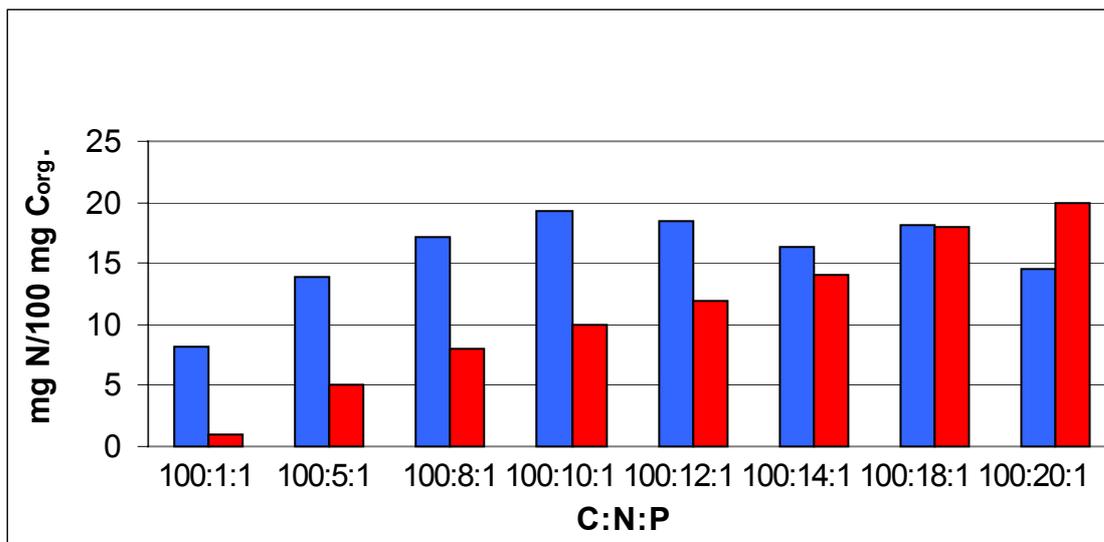
Der Verlauf in der Abbildung 20 zeigt eine Steigerung des Stickstoffgehaltes im Biofilm-TM bis zu einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:01 - 100:12:01 an. Danach bleibt der Stickstoffgehalt in etwa gleich. Die Ergebnisse korrelieren gut mit den Messungen des Ammonium-Stickstoffs in der verbleibenden wässrigen Phase der Reaktorläufe. Aus diesen Analysen geht hervor, dass der Stickstoff nur bis zu einem Verhältnis und Höhe von ca. 100:10:1 aus der wässrigen Phase in den Biofilm aufgenommen wird. Bei höheren C:N:P-Verhältnissen verbleibt der zusätzliche Stickstoff in der wässrigen Phase. Wie z. B. aus der folgenden Abbildung 21 zu erkennen ist, ändern sich dennoch Fraktionen im Biofilm.



**Abbildung 21:** Gehalte an Stickstoff im Biofilm-FM (w/w)

Die Abbildung 21 zeigt die Gehalte an Stickstoff im Biofilm-FM. Bis zu einem Verhältnis von 100:10:01 steigt der Gehalt an. Dann wird eine Plateau-Phase erreicht, um ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:18:01 wieder anzusteigen. Der Einfluss des Wassergehaltes wird auch hier deutlich. Aus den Verläufen ist abzuleiten, dass der erhöhte Stickstoffgehalt an dem sinkenden Wassergehalt in den Biofilmen ursächlich beteiligt sein kann. Werden die Ergebnisse aus den Ammonium-N im Restwasser des synthetischen Mediums der Reaktorläufe in Relation zu diesen Ergebnissen gesetzt, wird der Einfluss noch deutlicher. Die Ammonium-N Werte im Restwasser der synthetischen Medien sind im Kapitel 4.1.4, s. unten, dargestellt.

In folgender Abbildung 22 wird der Stickstoffgehalt im synthetischen Medium und im Biofilm-TM, in Relation zu je 100 mg  $C_{org.}$  gezeigt. Die Tabelle mit den Messdaten zu der Abbildung 22 ist im Anhang aufgeführt.

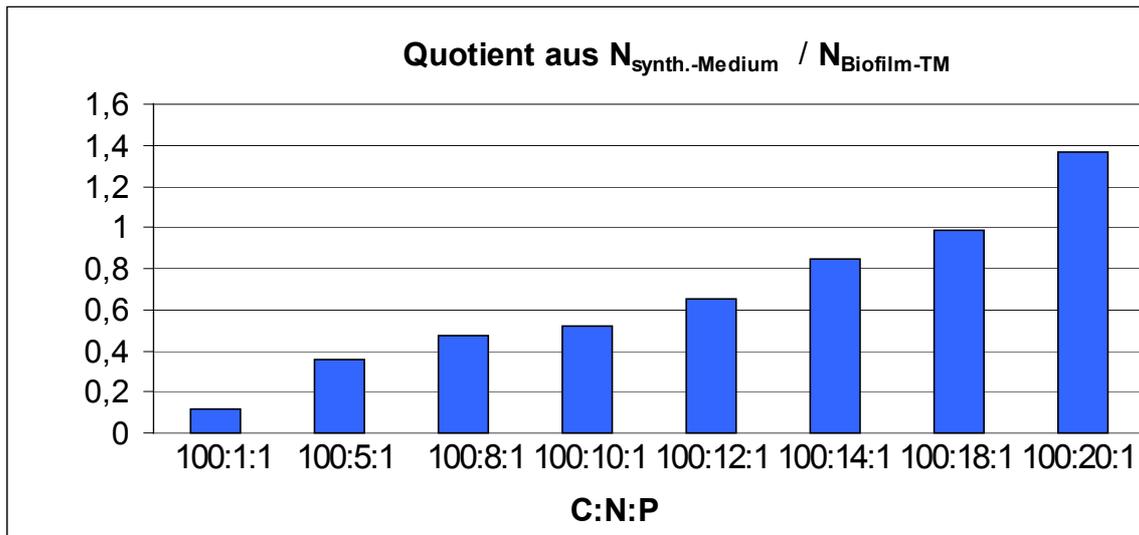


**Abbildung 22:** Stickstoff/Kohlenstoff - Verhältnisse im synthetischen Medium ■ und im Biofilm-TM ■

Der Stickstoffgehalt im Biofilm-TM entwickelt sich anders als es das Stickstoffangebot im synthetischen Medium ermöglichen hätte. Ab einem C:N:P-Verhältnis von

100:10:1 bis 100:12:1 werden Maxima erreicht. Nach dem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 steigen die verfügbaren Stickstoffgehalte im synthetischen Medium zwar an, aber der Gehalt an Stickstoff steigt im Biofilm-TM nicht entsprechend an. Diese Entwicklung wird auch durch die Ammonium-N Gehalte in den synthetischen Medien und im Restwasser (s. unten, Kap. 4.1.4) der C:N:P-Läufe deutlich.

In folgender Abbildung 23 wird der angebotene Stickstoff im synthetischen Medium mit dem Stickstoff im resultierenden Biofilm in Relation gesetzt. Die Tabelle mit den Messdaten zur Abbildung 23 ist im Anhang aufgeführt.

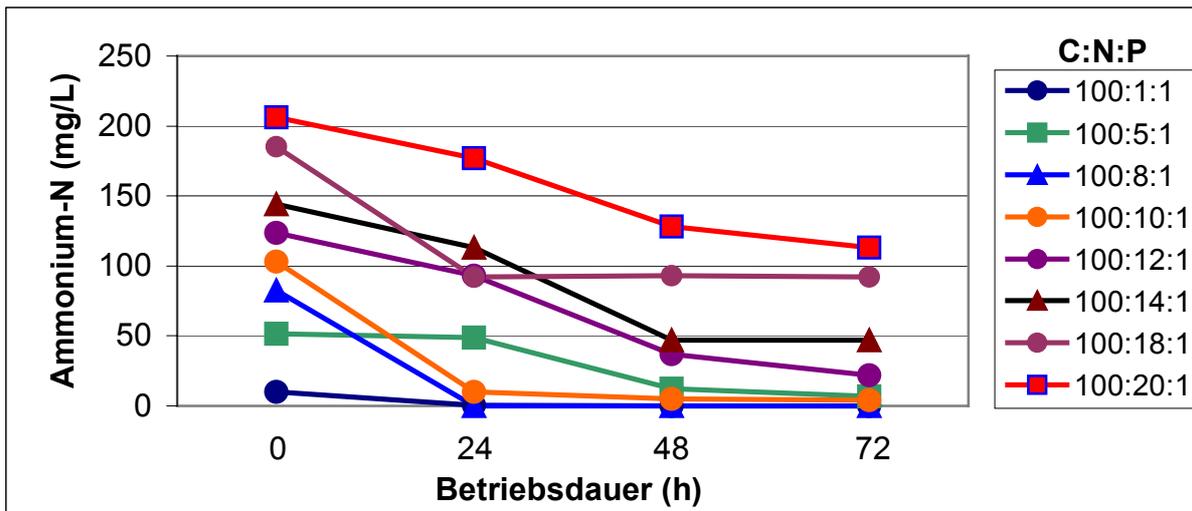


**Abbildung 23:** Quotient aus N im synthetischen Medium und N im Biofilm-TM

Abbildung 23 zeigt, dass bei steigendem Stickstoffangebot im synthetischen Medium, der Stickstoff von den Mikroorganismen nicht vollständig genutzt wird. Je höher der Quotient, desto weniger wurde vom angebotenen Stickstoff des synthetischen Mediums in den Biofilm-TM aufgenommen.

#### **Gehalte an Ammonium-N im synthetischen Medium und im Restwasser der C:N:P-Läufe**

Die Abbildung 24 zeigt den Verlauf der Gehalte an Ammonim-N im synthetischen Medium der C:N:P-Versuchsläufe. Das Restwasser ist das wässrige Medium nach Beendung der jeweiligen C:N:P-Läufe.



**Abbildung 24:** Ammonium-N Konzentrationen in den C:N:P-Läufen

Bei den ersten vier C:N:P-Verhältnissen (100:1:1 bis 100:10:1) verringert sich der Gehalt an Ammonium-N bis gegen Null. Die darauf folgenden Läufe zeigen andere Entwicklungen. Noch eindeutiger wird dies durch die Aufrechnung des Ammonium-N Gehaltes in tabellarischer Form (s. Tabelle 6 und 7).

Eine Erhöhung des Ammonium-N Gehaltes, beginnend ab C:N:P-Verhältnis 100:12:1, verbleibt im Restwasser. Bis zu einem C:N:P von 100:10:1 hingegen wird der angebotene Ammonium-N aus der wässrigen Phase genutzt, d. h. die Mikroorganismen nehmen den angebotenen Ammonium-N, bei einem gleichbleibenden organischen Kohlenstoffangebot, nur bis zu einem Verhältnis von 100:10:1 voll auf. Dies ist insoweit interessant, weil sich in den anschließenden höheren C:N:P-Verhältnissen die Gehalte an Kohlenhydraten, Proteinen, Wasser u.a. im Biofilm verändern.

**Tabelle 6:** Ammonium-N Gehalte in den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 bis 100:10:1, am Start, Ende und die Differenz

C:N:P	100:1:1	100:5:1	100:8:1	100:10:1
NH <sub>4</sub> -N <sub>Start</sub> mg/L	10,3	51,5	82,4	103
NH <sub>4</sub> -N <sub>Ende</sub> mg/L	0	1,8	0	4
NH <sub>4</sub> -N Differenz mg/L = Aufnahme	<b>10,3</b>	<b>49,7</b>	<b>82,4</b>	<b>99</b>

**Tabelle 7:** Ammonium-N Gehalte in den C:N:P-Verhältnissen von 100:12:1 bis 100:20:1, am Start, Ende und die Differenz

C:N:P	100:12:1	100:14:1	100:18:1	100:20:1
NH <sub>4</sub> -N <sub>Start</sub> mg/L	123,6	144,2	185,4	206
NH <sub>4</sub> -N <sub>Ende</sub> mg/L	22	47	92	103
NH <sub>4</sub> -N Differenz mg/L = Aufnahme	<b>101,6</b>	<b>97,2</b>	<b>93,4</b>	<b>103</b>

Tabelle 6 und 7 zeigen die Ergebnisse der Messungen des Ammonium-N-Gehaltes in den synthetischen Medien. Ab einem Verhältnis von 100:12:1 verbleibt der über dem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 liegende Ammonium-N im synthetischen Medium, bzw. im Restwasser. Die Restwassermessungen zeigen die Konzentrationen an Ammonium-N nach Beendigung des C:N:P-Laufes an.

### Ergebnisse der Nitrat-Messung aus den Restwässern der C:N:P-Läufe

In keinem der Restwässer wurde Nitrat nachgewiesen. In der Diskussion wird im Zusammenhang mit Nitrifikanten auf das Ergebnis eingegangen.

#### 4.1.5 Gehalte an Wasserstoff in den Biofilmen

Die Abbildungen 25 und 26 zeigen die Gehalte an Wasserstoff im Biofilm-TM und Biofilm-FM. Die Tabellen mit den Messdaten zu den Abbildungen 25 und 26 sind im Anhang aufgeführt.

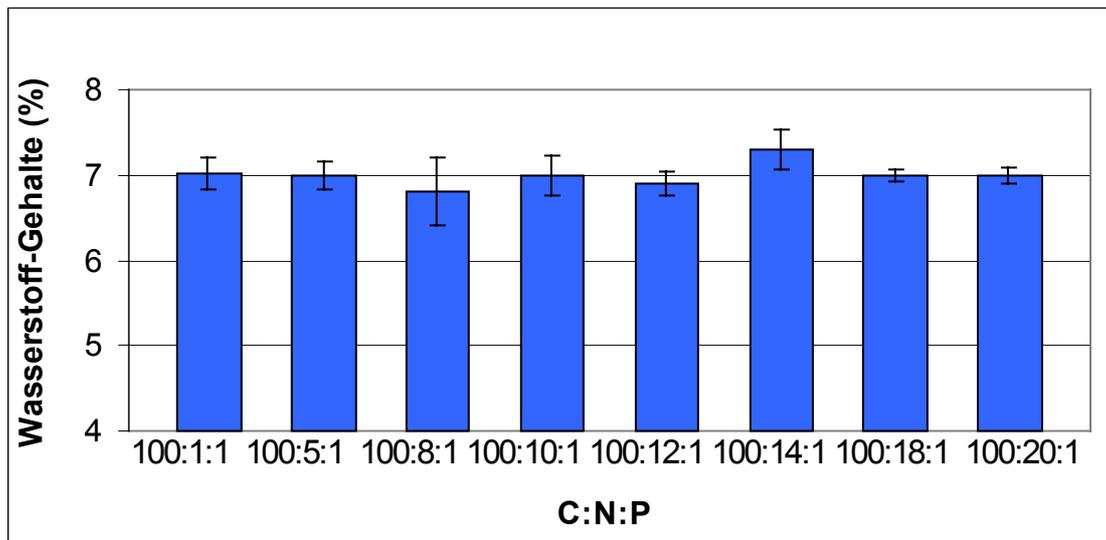


Abbildung 25: Gehalte an Wasserstoff im Biofilm-TM (w/w)

Die Gehalte an Wasserstoff im Biofilm-TM sind in den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen gleichmäßig – wie auch die Gehalte an organischen Kohlenstoff, Sauerstoff und Phosphor. Der durchschnittliche Gehalt an Wasserstoff liegt bei  $7\% \pm 0,19$ . Eine Auswirkung der unterschiedlichen Stickstoffgehalte auf den Wasserstoffgehalt ist nicht zu erkennen.

Die folgende Abbildung 26 zeigt die Gehalte an Wasserstoff im Biofilm-FM.

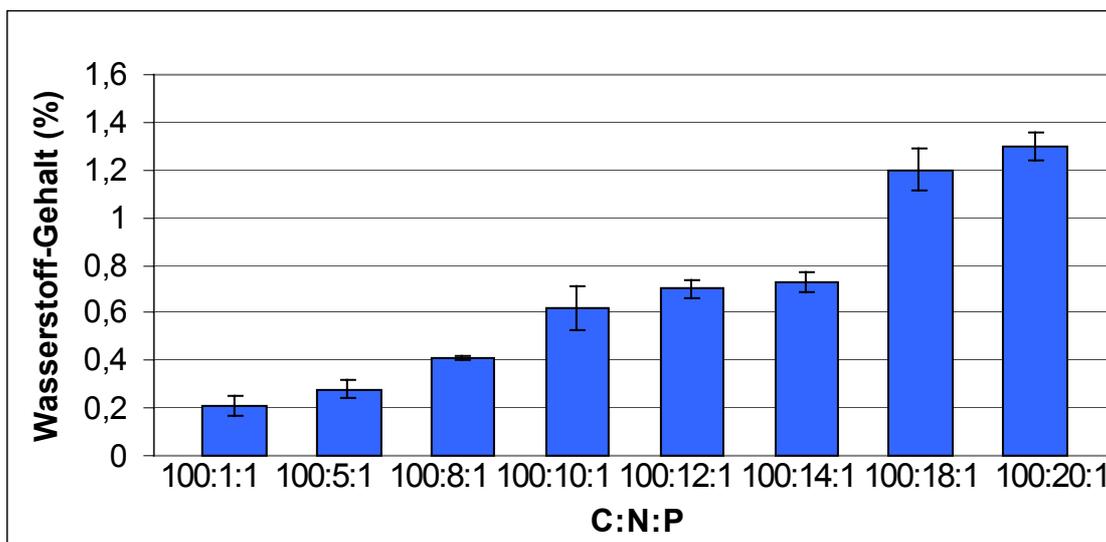


Abbildung 26: Gehalte an Wasserstoff im Biofilm-FM (w/w)

Der Verlauf in der Abbildung 26 zeigt eine Zunahme des Wasserstoffgehaltes im Biofilm-FM. Die augenscheinliche Zunahme ist aber nur auf den geringeren Wasseranteil in den Biofilmen bei zunehmendem Stickstoffanteil bedingt.

#### 4.1.6 Gehalte an Sauerstoff in den Biofilmen

Die Abbildungen 27 und 28 zeigen die Gehalte an Sauerstoff im Biofilm-TM und im Biofilm-FM. Die Tabellen mit den Messdaten zu den Abbildungen 27 und 28 sind im Anhang aufgeführt.

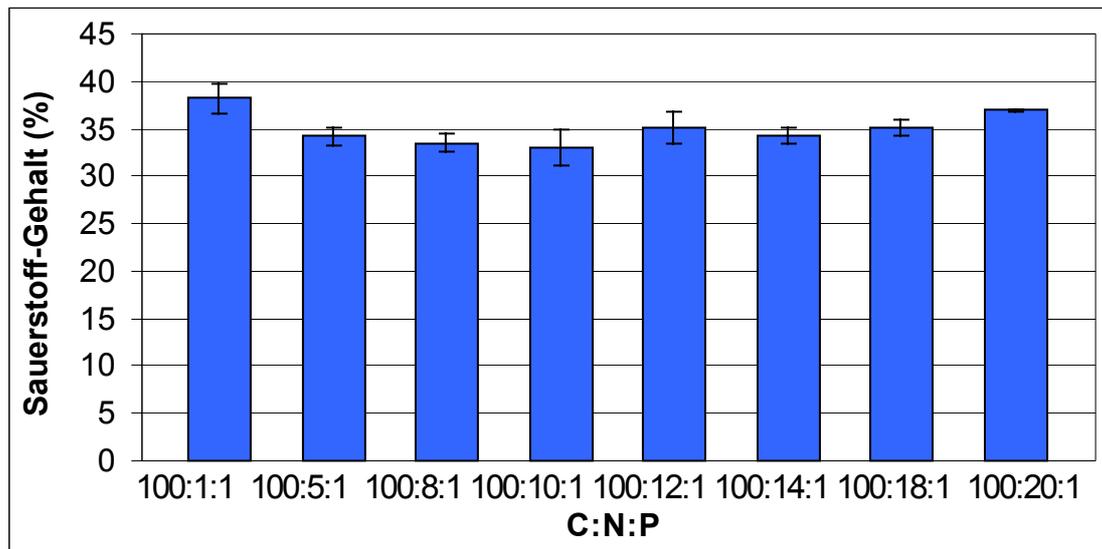


Abbildung 27: Gehalte an Sauerstoff im Biofilm-TM (w/w)

Der prozentuale Anteil an Sauerstoff im gesamt Biofilm-TM ist gleichmäßig – wie die Ergebnisse der Gehalte an  $C_{org.}$ , Wasserstoff und Phosphor. Der durchschnittliche Gehalt an Sauerstoff liegt bei  $35,1\% \pm 1,11$ . Eine Abhängigkeit in Relation zum Stickstoffgehalt ist nicht zu erkennen.

Abbildung 28 zeigt die Gehalte an Sauerstoff im Biofilm-FM.

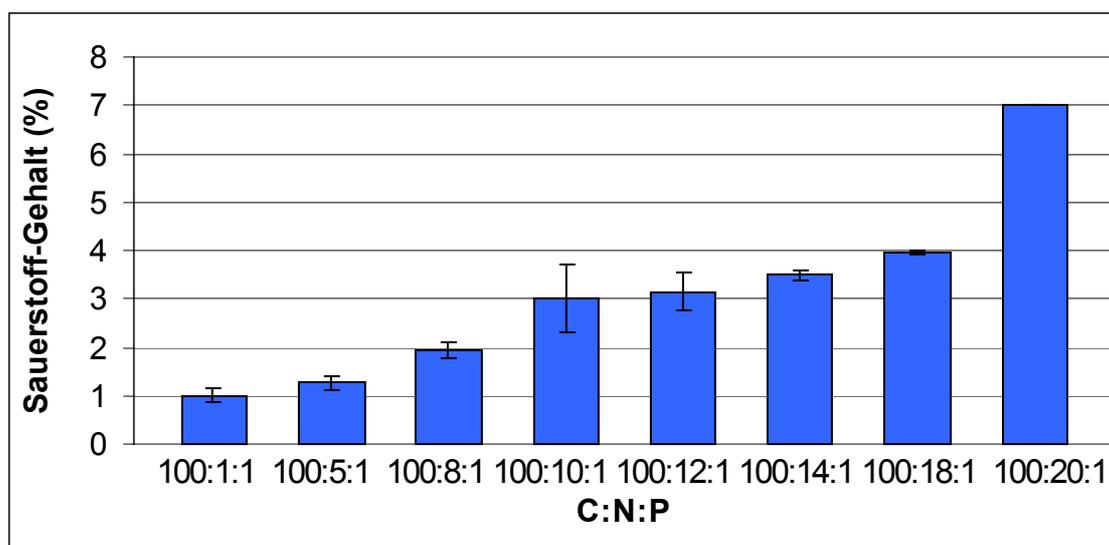


Abbildung 28: Gehalte an Sauerstoff im Biofilm-FM (w/w)

Eine ansonsten gleichmäßiger Gehalt an Sauerstoff, wie im Biofilm-TM dargestellt, ändert sich durch die abnehmenden Wassergehalte im Biofilm-FM bei steigenden C:N:P-Verhältnissen.

#### 4.1.7 Gehalte an Phosphor in den Biofilmen

Die Abbildungen 29 und 30 zeigen die Gehalte an Phosphor im Biofilm-TM und Biofilm-FM. Die Tabellen mit den Messdaten zu den Abbildungen 29 und 30 sind im Anhang aufgeführt.

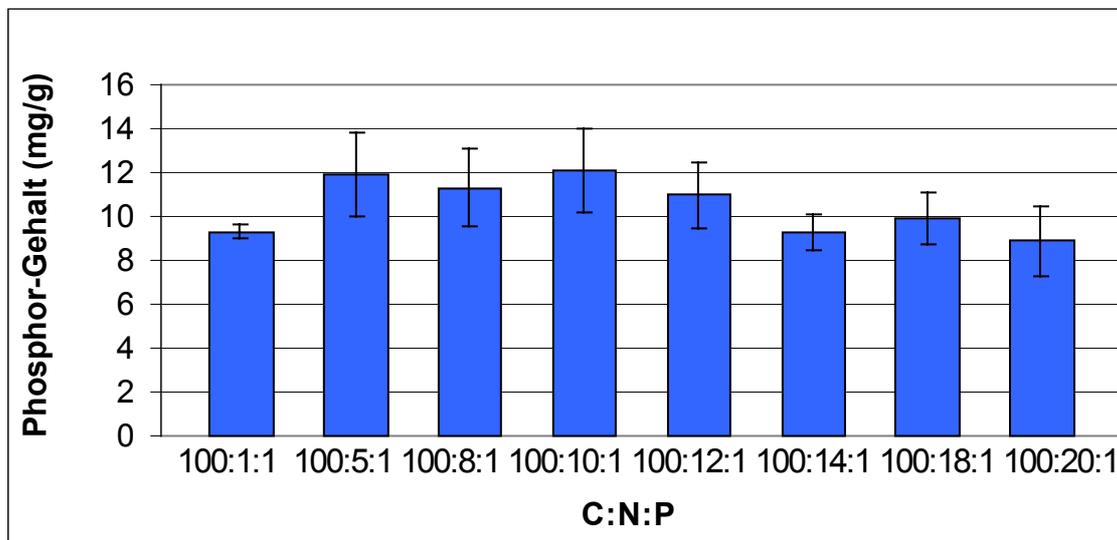


Abbildung 29: Gehalte an Phosphor im Biofilm-TM

Im Biofilm-TM ist eine direkte Abhängigkeit des Phosphorgehaltes vom steigendem Stickstoffgehalt nicht zu erkennen. Wie in Kap. 3.3.7 aufgeführt, sind in jedem Lauf die Gehalte an Phosphor aus dem synthetischen Medium gänzlich sorbiert worden. Dies spiegelt sich in annähernd gleichmäßigen Gehalten im Biofilm-TM wieder.

Die Abbildung 30 zeigt die Gehalte an Phosphor im Biofilm-FM.

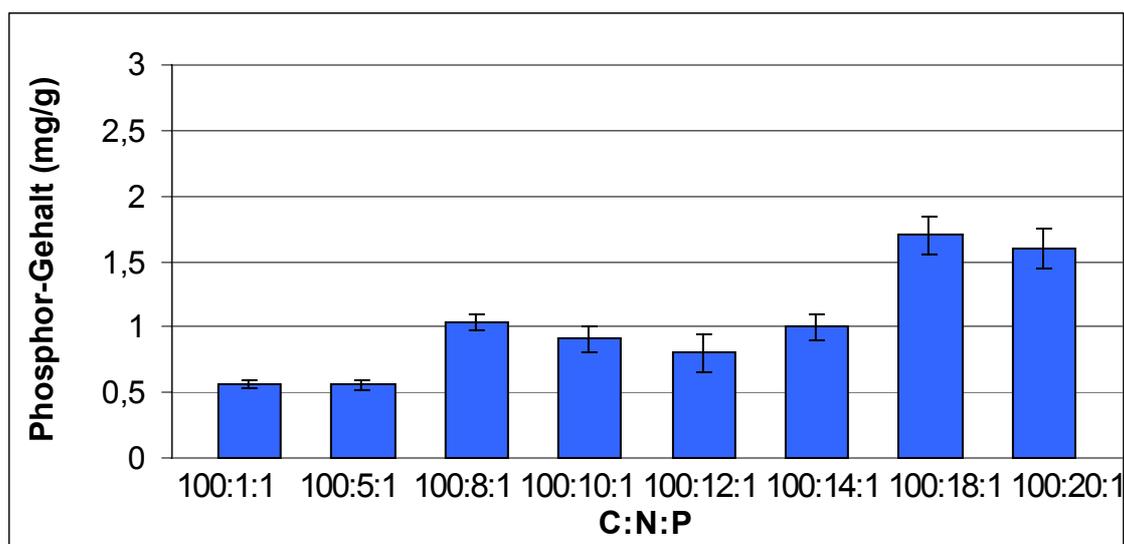
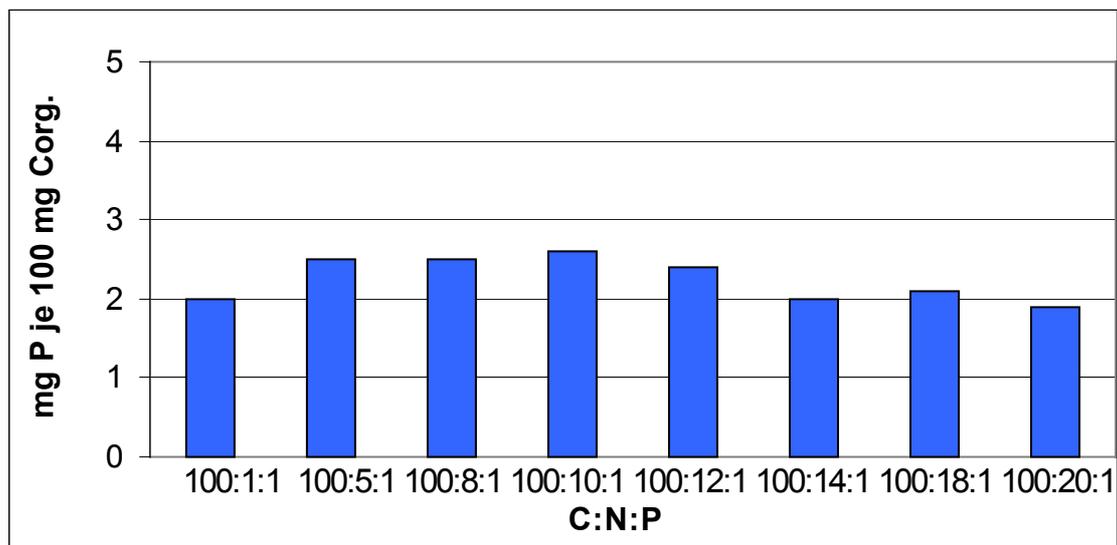


Abbildung 30: Gehalte an Phosphor im Biofilm-FM

Unter Einbeziehung des Wassergehaltes ist ein Ansteigen des Phosphorgehaltes im Biofilm-FM zu erkennen. Der steigende Stickstoffgehalt hatte keinen Einfluss auf die Aufnahme von Phosphor in den Biofilm.

Die Gehalte an Phosphor waren in den C:P-Verhältnissen des synthetischen Medium immer gleich hoch - 100:1. In der folgenden Abbildung 31 ist das Verhältnis von C:P im resultierendem Biofilm-TM dargestellt. Die Tabelle mit den Messdaten zu der Abbildungen 31 ist im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 31:** Verhältnis von  $C_{org}$  und Phosphor im Biofilm-TM

Die Messwerte des Phosphors im Biofilm-TM liegen zwischen 1,9 und 2,6 in Relation zum Gehalt an  $C_{org}$ .

Die C:P-Verhältnisse im Biofilm-TM liegen zwischen 1,9 und 2,6. Eine Abhängigkeit vom Stickstoffverhältnis ist aus den Verlaufskurven in den Abbildungen 30 und 31 nicht zu erkennen. Der Phosphor wurde mit einem durchschnittlichen C:P-Verhältnis von  $100:2,25 \pm 0,26$  aus dem synthetischen Medium in den Biofilm aufgenommen.

#### 4.1.8 Gehalte an Metallen in den Biofilmen

Die Abbildungen 32 und 33 zeigen die Gehalte an Calcium im Biofilm-TM und im Biofilm-FM. Die Tabellen mit den Messdaten zu den Abbildungen 32 und 33 sind im Anhang aufgeführt.

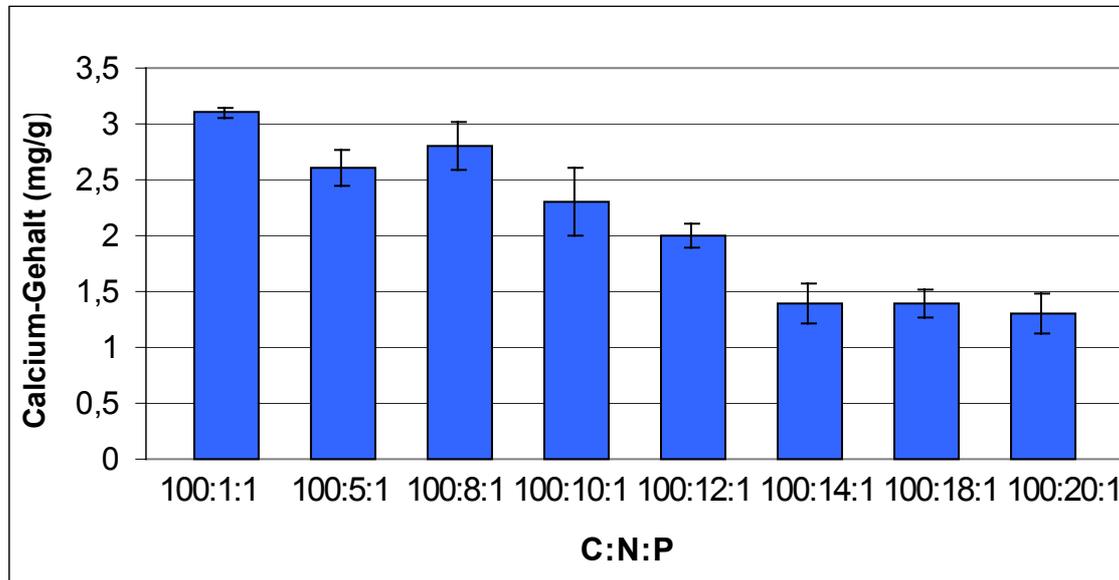


Abbildung 32: Gehalte an Calcium im Biofilm-TM

Abbildung 32 zeigt eine deutliche Abnahme des Calcium-Gehaltes im Biofilm-TM, bedingt durch den zunehmenden Stickstoffgehalt im synthetischen Medium. Die Ausgangskonzentrationen an Calcium waren im synthetischen Medium immer die gleichen (s. Kap. 3.1.4). Der im synthetischen Medium ansteigende Stickstoffanteil hat eine Abnahme des Calcium-Gehaltes im Biofilm verursacht.

Speziell Calcium kann im Hinblick auf die Verknüpfung der EPS wichtig sein. Durch die Verringerung des Calcium-Gehaltes bei wachsendem Stickstoff-Angebot ist anzunehmen, dass sich die Zusammensetzungen innerhalb des Biofilms, bzw. der EPS geändert haben können.

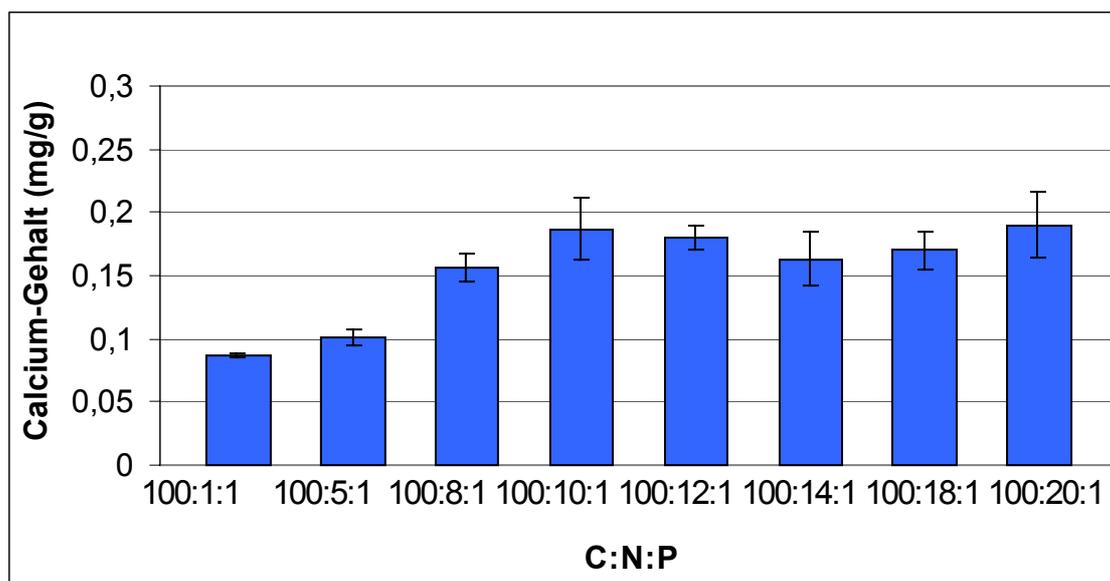
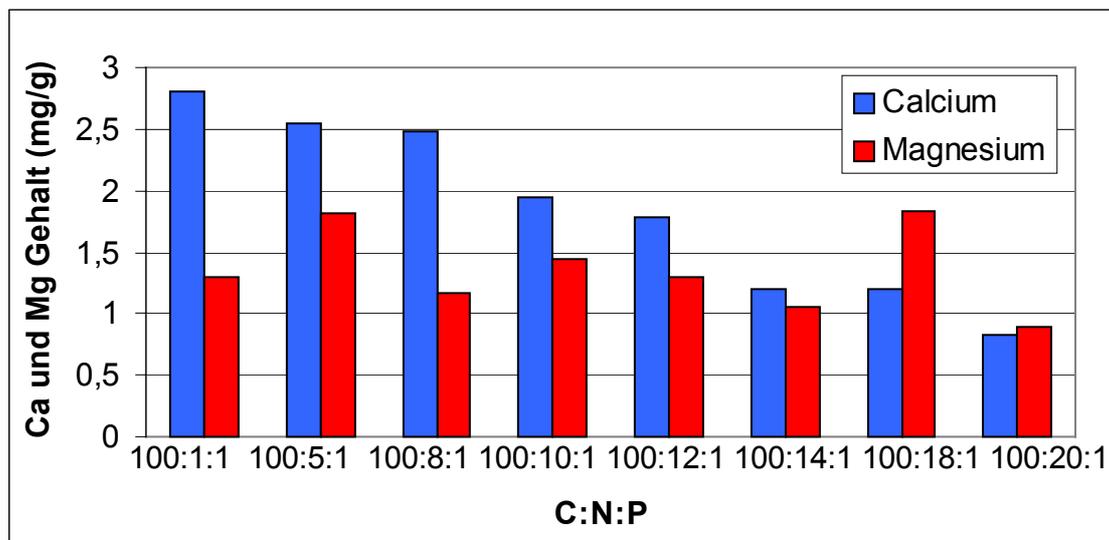


Abbildung 33: Gehalte an Calcium im Biofilm-FM

Abbildung 33 zeigt eine andere Entwicklung des Calcium-Gehaltes im Biofilm-FM an. Dies ist bedingt durch die Änderung des Wassergehaltes in den Biofilmen. Dennoch lässt sich aus dem Verlauf in Abbildung 33 eine Stagnation des Calciumgehaltes ab ca. C:N:P von 100:10:1 erkennen.

Dass der Verlauf des Calciumgehaltes in den Biofilmen ein anderer ist, obwohl immer gleiche Calciumgehalte im synthetischen Medium zur Verfügung standen, wird auch durch Vergleiche mit anderen Nährstoffen deutlich. Der organische Kohlenstoff blieb im Biofilm-TM ebenso konstant, wie der Phosphorgehalt, der Sauerstoffgehalt und der Wasserstoffgehalt. Veränderungen in den Verläufen der Biofilm-FM (Abbildung 33) traten nur durch den unterschiedlichen Wassergehalt auf. Aus diesen Ergebnissen ist ein deutlicher Einfluss des Stickstoffgehaltes auf den Calciumgehalt zu erkennen.

Aus dem Biofilm-TM wurden neben Calcium auch andere Metalle (s. Kap. 3.3.8) gemessen. Die Werte zeigten keine Abhängigkeiten zu den unterschiedlichen Stickstoffeinträgen in das synthetische Medium und sind nicht im Ergebnisteil dargestellt. Repräsentativ sind in folgender Abbildung 34 die Messwerte von Calcium und Magnesium gegenübergestellt.



**Abbildung 34:** Gehalte an Calcium und Magnesium im Biofilm-TM

Der Verlauf der Gehalte an Magnesium und Calcium im Biofilm-TM zeigt nur eine Abhängigkeit vom zunehmenden Stickstoffgehalt bei den Calciumgehalten. Die Magnesium-Gehalte zeigen keine erkennbare Beeinflussung durch die Stickstoffgehalte in den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen.

#### 4.1.9 Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC) und gesamter organischer Kohlenstoff (TOC)

Der DOC aus den wässrigen Medien der C:N:P-Läufe erreichte ab dem Verhältnis von 100:5:1 nach ca. 72 Stunden einen DOC <50 mg/L. Lediglich die Läufe aus den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 erreichten nach 72 Stunden nicht einen DOC unter 50 mg/L. Die in diesen Verhältnissen nach 72 Stunden erreichte Werte lagen zwischen 400 und 500 mg/L. Die Läufe wurden dennoch nach Ablauf der 72 Stunden beendet.

Der DOC in der Waschphase variierte von ca. 4% bis 10% des gesamten organischen Kohlenstoffs im Biofilm-TM. Die Waschphase-Bestandteile wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da sie definitionsgemäß nicht unter die EPS fallen (s. Einleitung).

#### 4.1.10 Zusammenstellung von physikalisch/chemischen Ergebnissen aus dem Biofilm-TM in Summenformeln

Aus den Ergebnissen der Elementaranalysen für C<sub>org.</sub> (s. Kap. 4.1.3), Wasserstoff (s. Kap. 4.1.5), Sauerstoff (s. Kap. 4.1.6), Stickstoff (s. Kap. 4.1.4) und den Analyseergebnissen mit der ICP, Phosphor (s. Kap. 4.1.7) und Calcium (s. Kap. 4.1.8), werden im folgenden Summenformeln aus den Biofilm-TM in den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen gebildet. Es werden die Elemente in die Summenformel aufgenommen, die statistisch auswertbar sind.

**Tabelle 8:** Konzentrationen an C, H, O, N, P, Ca pro Gramm Biofilm-TM

C:N:P	C	H	O	N	P	Ca
	mg/g Biofilm-TM	mg/g Biofilm-TM	mg/g Biofilm-TM	mg/g Biofilm-TM	mg/g Biofilm-TM	mg/g Biofilm-TM
100:1:1	469	70	382	38	9,3	3,1
100:5:1	474	70	342	66	11,9	2,6
100:8:1	458	68	335	79	11,3	2,8
100:10:1	471	70	331	91	12,1	2,3
100:12:1	468	69	351	86	11,0	2,0
100:14:1	482	73	343	76	9,3	1,4
100:18:1	470	70	352	85	9,9	1,4
100:20:1	459	70	370	79	8,9	1,3

Die in Tabelle 8 angegebenen Konzentrationen werden in der Tabelle 9 auf mol umgerechnet.

**Tabelle 9:** mol C, H, O, N, P, Ca pro Gramm Biofilm-TM

C:N:P	C	H	O	N	P	Ca
	mol · 10 <sup>-2</sup>					
100:1:1	3,90	69,5	2,4	0,27	0,030	0,0077
100:5:1	3,95	69,5	2,1	0,47	0,038	0,0065
100:8:1	3,81	67,5	2,1	0,56	0,036	0,0070
100:10:1	3,92	69,5	2,1	0,65	0,039	0,0057
100:12:1	3,90	68,5	2,2	0,61	0,036	0,0050
100:14:1	4,00	72,4	2,1	0,54	0,030	0,0035
100:18:1	3,91	69,5	2,2	0,61	0,032	0,0035
100:20:1	3,82	69,5	2,3	0,56	0,029	0,0032

Die mol-Angaben aus Tabelle 9 werden in Tabelle 10 auf 1 mol Calcium umgerechnet.

**Tabelle 10:** Angleich von mol C, H, O, N, P, Ca auf 1 mol Calcium

	<b>C</b>	<b>H</b>	<b>O</b>	<b>N</b>	<b>P</b>	<b>Ca</b>
<b>C:N:P</b>	mol	mol	mol	mol	mol	mol
<b>100:1:1</b>	506,5	902,6	311,7	35,1	3,9	1
<b>100:5:1</b>	607,7	1069,3	329,2	72,3	5,8	1
<b>100:8:1</b>	544,3	964,3	298,6	80,0	5,1	1
<b>100:10:1</b>	687,7	1219,3	363,2	114,0	6,8	1
<b>100:12:1</b>	780,0	1370,0	438,0	122,0	7,2	1
<b>100:14:1</b>	1142,8	2068,5	611,4	154,3	8,6	1
<b>100:18:1</b>	1117,1	1985,6	628,5	174,3	9,1	1
<b>100:20:1</b>	1193,8	2171,9	721,9	175,0	9,1	1

Die Werte aus Tabelle 10 werden in Tabelle 11 in Summenformeln für die Biofilme aus unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen wiedergegeben (gerundet).

**Tabelle 11:** Summenformeln aus den Analyseergebnissen von Biofilmen aus unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen

<b>C:N:P</b>	<b>=&gt;</b>	<b>Summenformeln</b>
100:1:1	=>	$C_{507}H_{903}O_{312}N_{35}P_4Ca$
100:5:1	=>	$C_{608}H_{1069}O_{329}N_{72}P_6Ca$
100:8:1	=>	$C_{544}H_{964}O_{299}N_{80}P_5Ca$
100:10:1	=>	$C_{688}H_{1219}O_{363}N_{114}P_7Ca$
100:12:1	=>	$C_{780}H_{1370}O_{438}N_{122}P_7Ca$
100:14:1	=>	$C_{1143}H_{2069}O_{611}N_{154}P_9Ca$
100:18:1	=>	$C_{1117}H_{1986}O_{629}N_{174}P_9Ca$
100:20:1	=>	$C_{1194}H_{2172}O_{721}N_{175}P_9Ca$

Die Darstellung der Ergebnisse aus dem Biofilm-TM in Form von Summenformeln kann für anderweitig angelegte Untersuchungen Vergleichsmöglichkeiten geben.

## 4.2 Ergebnisse der mikrobiologischen und biochemischen Parameter

Zur Homogenisierung (s. Kap. 3.2.2): Vergleichsmessung (als KBE) zwischen der Handhomogenisation und der Homogenisierung des Biofilms durch die Behandlung mit dem Ultra Turrax wurden durchgeführt, um eine Abtötung der Mikroorganismen durch die hohen Scherkräfte des Ultra Turrax zu überprüfen. Die Vergleichsmessungen wurden an verschiedenen Biofilm-FM Proben durchgeführt und zeigten gleiche bis gering höhere Ergebnisse an KBE durch die Probenvorbereitung mit dem Ultra Turrax. Eine Inaktivierung der Mikroorganismen durch die Probenvorbereitung mit dem Ultra Turrax ist durch die Ergebnisse nicht zu erkennen.

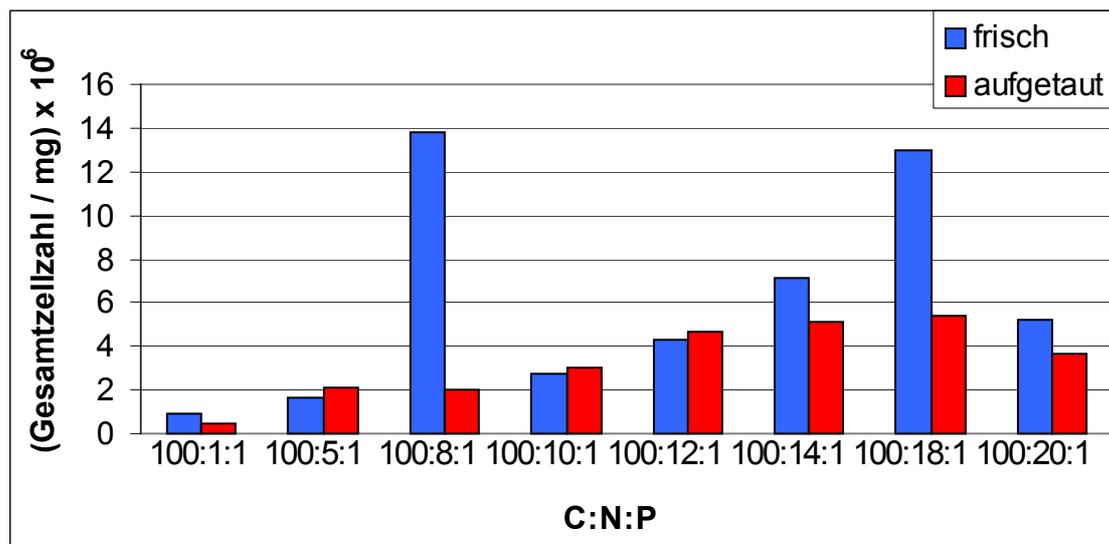
Die mikroskopische Betrachtung machte zusätzlich deutlich, dass die Probenvorbereitung der Matrix der Biofilme mit dem Ultra Turrax zu einer besseren Vereinzelung der Mikroorganismen führte. Dies war durch weniger Zellagglomerate unter fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung erkennbar, im Gegensatz zu der Homogenisierung mit dem Handhomogenisator.

Die intensive Vereinzelung der im Biofilm befindlichen Mikroorganismen durch mechanisches Mixen oder durch Ultraschall wird bei Costerton (1995) als notwendige Voraussetzung beschrieben, bevor die Mikroorganismen durch KBE-Bestimmung ausgezählt werden können. Desgleichen gilt natürlich auch für die mikroskopische Auszählung mit Fluoreszenzanfärbungen.

### 4.2.1 Gesamtzellzahl in den Biofilmen

Aus insgesamt 16 Biofilmen wurden die Auszählungen mit dem Fluoreszenzmikroskop durchgeführt. Davon waren 8 aus „frischen“ und 8 aus „aufgetauten“ Biofilmen. Diese Untersuchungen wurden aus Zeitgründen aus den „frischen“ und „aufgetauten“ Biofilmen jeweils einmal durchgeführt. Mit den gleichen Biofilmen wurden die Analysen zur EPS-Analytik durchgeführt.

Abbildung 35 zeigt die Gesamtzellzahl in den „frischen“ und „aufgetauten“ Biofilmen. Die Dichten wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop (s. Kap. 3.4.1) unter Anfärbung mit Acridinorange bestimmt. Die Messdaten zur Abbildung 35 sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 35:** Gesamtzellzahl der Mikroorganismen im Biofilm-FM – Auszählung mit dem Fluoreszenzmikroskop

Die Ergebnisse der Auszählungen der Mikroorganismendichte mit Acridinorange unter dem Fluoreszenzmikroskop zeigen bei den Zellzahlen aus den „aufgetauten“ Bio-

filmen eine steigende Mikroorganismendichte bis zu einem C:N:P-Verhältnis von 100:18:1. Danach fällt sie wieder leicht ab. Bei den Auszählungen aus den „frischen“ Biofilmen liegt ein Maximum ebenfalls bei 100:18:1 – das Verhältnis von 100:8:1 ausgenommen. Die Zellzahlen je mg Biofilm-FM aus den „frischen“ und „aufgetauten“ Biofilmen unterscheiden sich in einigen Verhältnissen deutlich. Sie zeigen jedoch vergleichbare Entwicklungen in den verschiedenen C:N:P-Verhältnissen.

Auffällig sind hier die geringeren Dichten der Mikroorganismen im Biofilm, in Relation zu den Dichten der Auszählung als KBE (s. Kap. 4.2.2).

#### 4.2.2 Lebendzellzahl in den Biofilmen

Die Abbildung 36 zeigt die Lebendzellzahl als KBE im Biofilm-FM (s. Kap. 3.4.2). Die Zahlenwerte zur Abbildung 36 sind im Anhang aufgeführt.

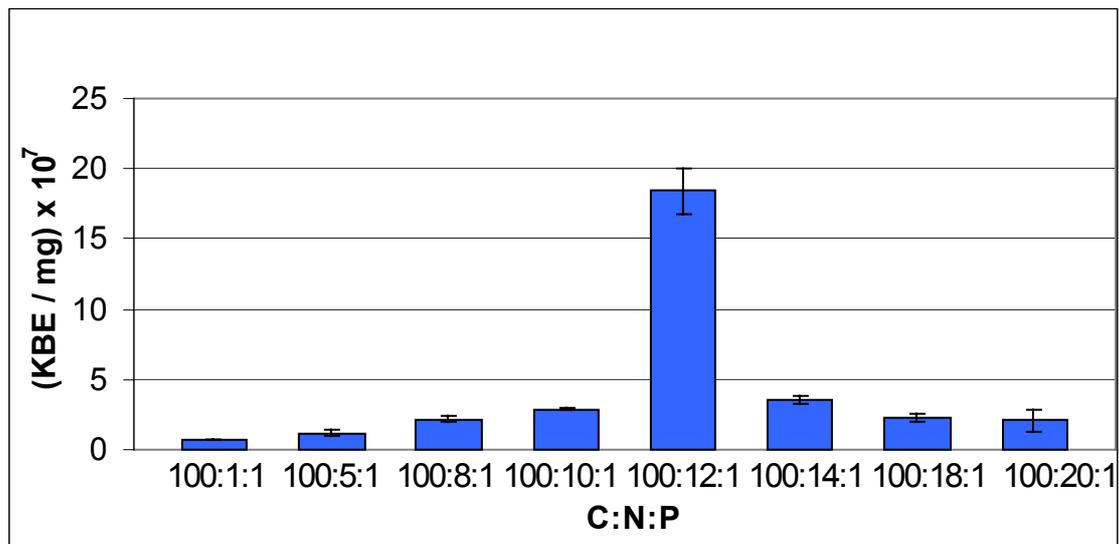
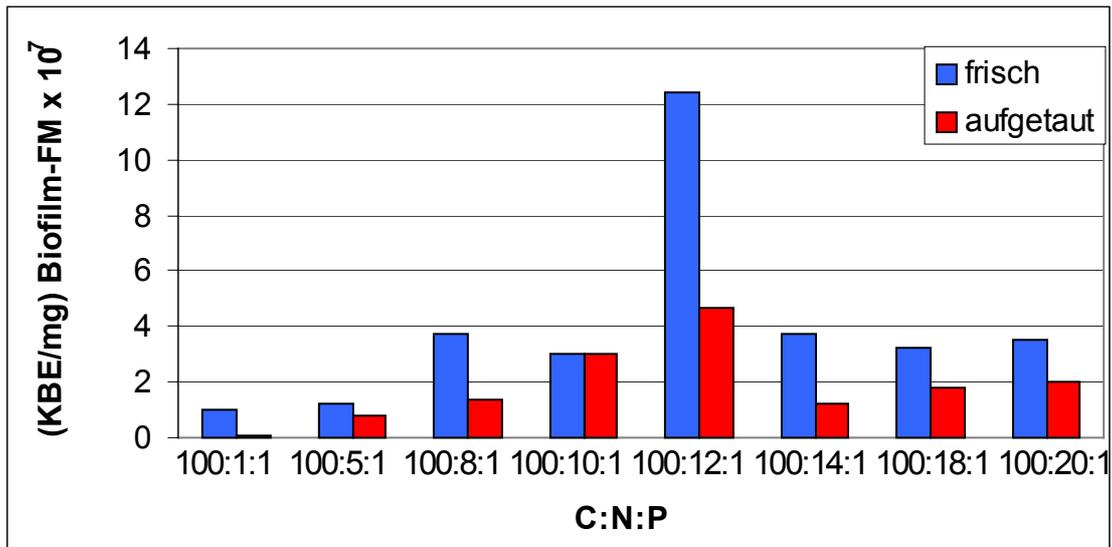


Abbildung 36: Lebendzellzahl im Biofilm-FM als KBE

Die KBE im Biofilm-FM erhöhen sich bis 100:10:1 und steigt bei 100:12:1 auf ein vielfaches der vorhergehenden und nachfolgenden Lebendzellzahlen als KBE im Biofilm-FM an. Die Dichten beim 100:1:1 lagen bei  $0,7 \cdot 10^7$  KBE/mL am niedrigsten und mit  $18,4 \cdot 10^7$  KBE/mL bei 100:12:1 am höchsten.

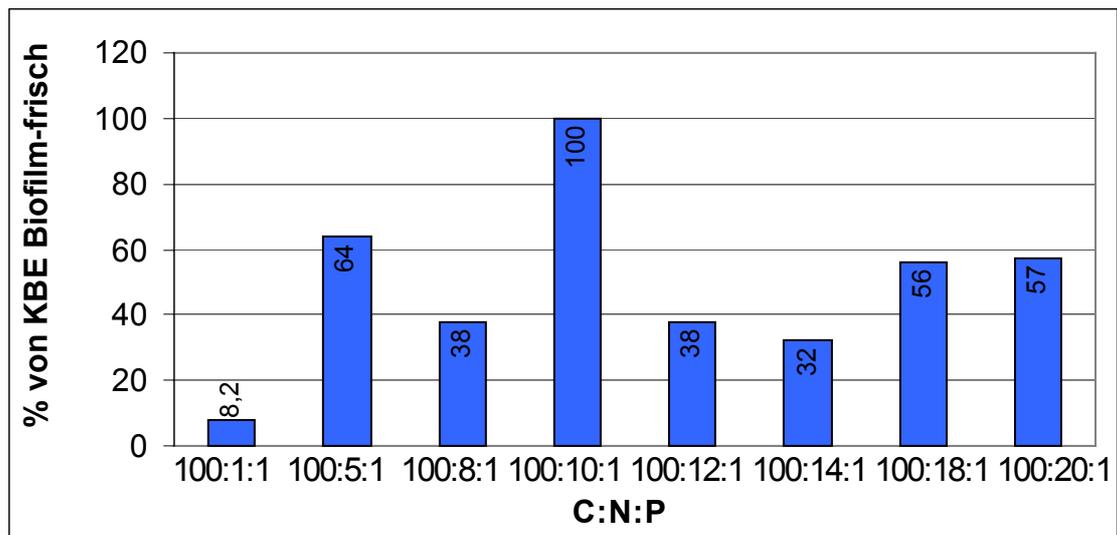
Die Lebendzellzahlen im Biofilm-FM zeigten alle KBE-Werte über  $10^7$ /mg. Dies ist eine deutliche Differenz zu der Bestimmung der Mikroorganismendichte mit dem Fluoreszenzmikroskop. Hier liegen die Dichten fast alle im Bereich von  $10^6$  pro mg Biofilm-FM.

Abbildung 37 zeigt die Lebendzellzahl der Mikroorganismen als KBE im „aufgetauten“ und im „frischen“ Biofilm. Die Tabelle mit den Messdaten zur Abbildung 37 ist im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 37:** Lebendzellzahl der Mikroorganismen im „aufgetauten“ und „frischen“ Biofilm-FM als KBE

Die Abbildung 38 zeigt prozentual die Lebendzellzahl an KBE aus den „aufgetauten“ Biofilmen, in Relation zu den KBE aus den „frischen“ Biofilmen. Bei diesen Biofilmen handelt es sich um die gleichen, mit denen die CER-Extraktionen durchgeführt wurden.



**Abbildung 38:** Prozentuale Überlebensrate von Mikroorganismen aus eingefrorenem Biofilm als KBE

Der prozentuale Anteil der Lebendzellzahl aus teilweise drei Jahren eingefrorenen Biofilmen ist recht hoch und erreicht immer noch  $10^7$  KBE/mg im Biofilm-FM.

#### Animpfdichte der C:N:P-Läufe

Die mehrfache Auszählung des Inokulum (s. Kap. 3.1.5) zur Animpfung der Reaktorläufe zeigte im Ergebnis eine Mikroorganismendichte von  $2 \cdot 10^7$  KBE im 2 mL Eppendorfgefäß. Umgerechnet auf das Reaktorvolumen von 5 Litern des Reaktor 1 wurde jeder der C:N:P-Läufe mit einer Dichte von  $4 \cdot 10^3$  KBE/mL angeimpft. Eine Artenbestimmung ist aus den in der Einleitung erwähnten Gründen aus dem Inokulum heraus nicht durchgeführt worden. Eine visuelle Darstellung der auf Stan-

Standard I Nähragar (Merck 7881) kultivierbaren Mikroorganismen zeigt folgende Abbildung 39. Auf der Darstellung sind deutlich zahlreiche farblich als auch vom Kolonientyp unterschiedliche Wachstumsformen zu erkennen.



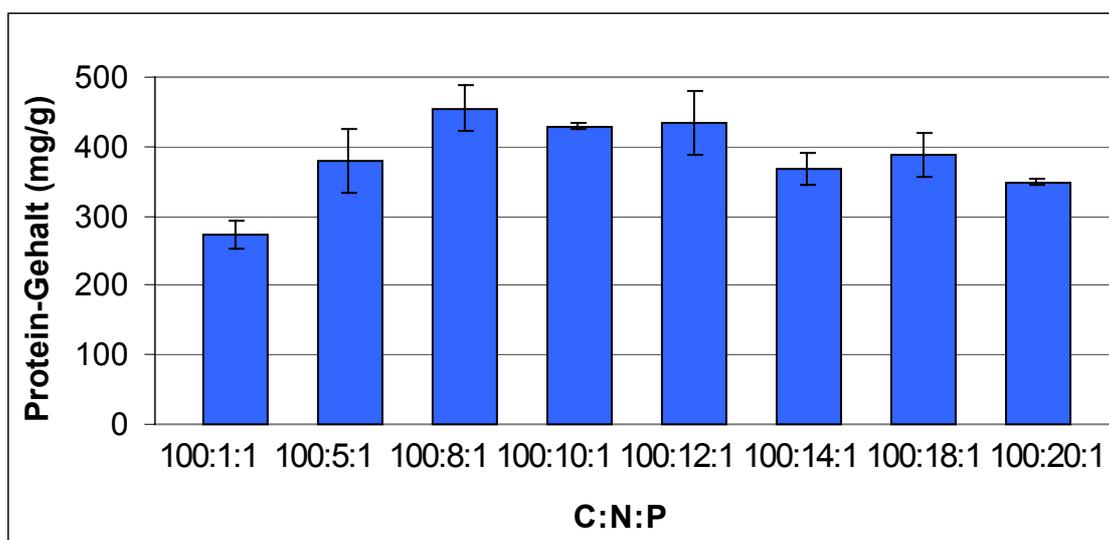
**Abbildung 39:** Darstellung der Artenvielfalt aus dem aufgetauten Inokulum auf Standard I Nähragar

Das gleiche Inokulum aus der kommunalen Kläranlage wurde auch mit der Fluoreszenzmethode (Gesamtzellzahl) ausgezählt. Die Anfärbungen waren jedoch nicht auszählbar. Bei der Auszählung mit KBE, von nicht an das Nährmedium der synthetischen Läufe „adaptierten“ Mikroorganismen, können die Werte wesentlich niedriger liegen, als mit der mikroskopischen Methode.

Die Voraussetzung des homogenen Animpfens jedes Versuchslaufes war durch die beschriebene Vorgehensweise (s. Kap. 3.5.1) dennoch gewährleistet.

#### 4.2.3 Gehalte an Proteinen in den Biofilmen

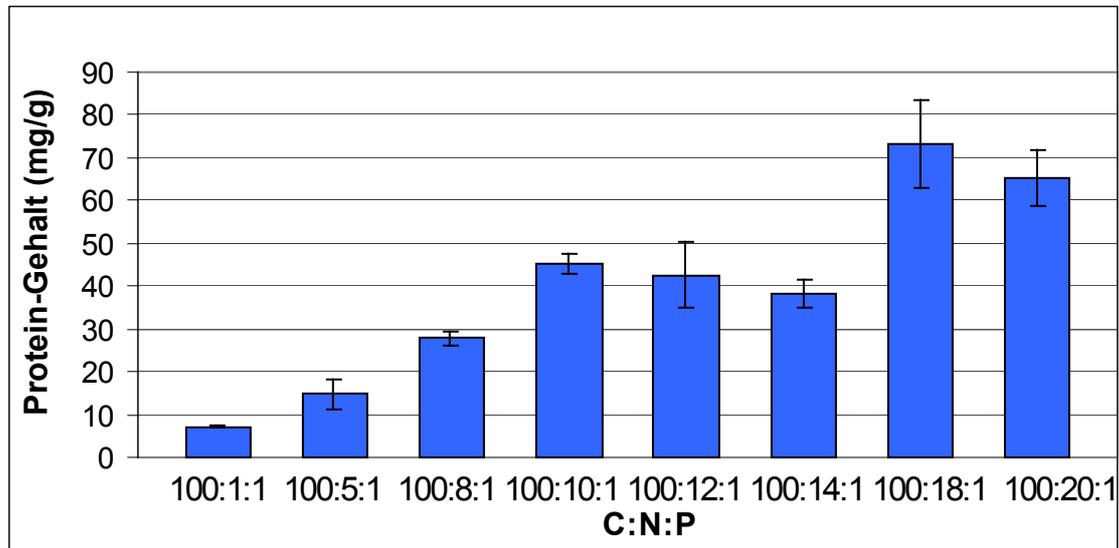
Die folgenden Abbildungen 40 und 41 zeigen die Ergebnisse der Proteinmessungen aus dem Biofilm-TM (s. Kap. 3.4.3) und Biofilm-FM. Die Messdaten zu den Abbildungen 40 und 41 sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 40:** Gehalte an Proteinen im Biofilm-TM

Abbildung 40 zeigt den Proteingehalt in den Biofilmen der unterschiedlichen C:N:P-Verhältnisse. Die Entwicklung des Proteingehaltes mit steigendem Stickstoffgehalt zeigt Maxima bei 100:8:1 bis 100:12:1. Davor und danach ist der Proteingehalt niedriger.

Die Proteinfraktionen des Biofilm-TM und die Kohlenhydratfraktionen sind nicht unabhängig voneinander zu sehen. In Kap. 4.2.4 werden die Fraktionen in Relationen gesetzt.



**Abbildung 41:** Gehalte an Proteinen im Biofilm-FM

Der Protein-Gehalt im Biofilm-FM spiegelt den unterschiedlichen Wassergehalt im Biofilm wieder. Bis zum C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 ist ein Anstieg des Proteinanteils im Biofilm zu erkennen. Dann sinkt er wieder ab. Beim C:N:P von 100:18:1 und 100:20:1 steigt er wiederum stark an. Die Werte im Biofilm-FM zeigen eine Abhängigkeit vom steigenden Stickstoffgehalt in den synthetischen Medien. Auf den Zusammenhang mit dem Kohlenhydrat- und Stickstoffgehalten in den Biofilmen wird im Kapitel 4.2.4 eingegangen.

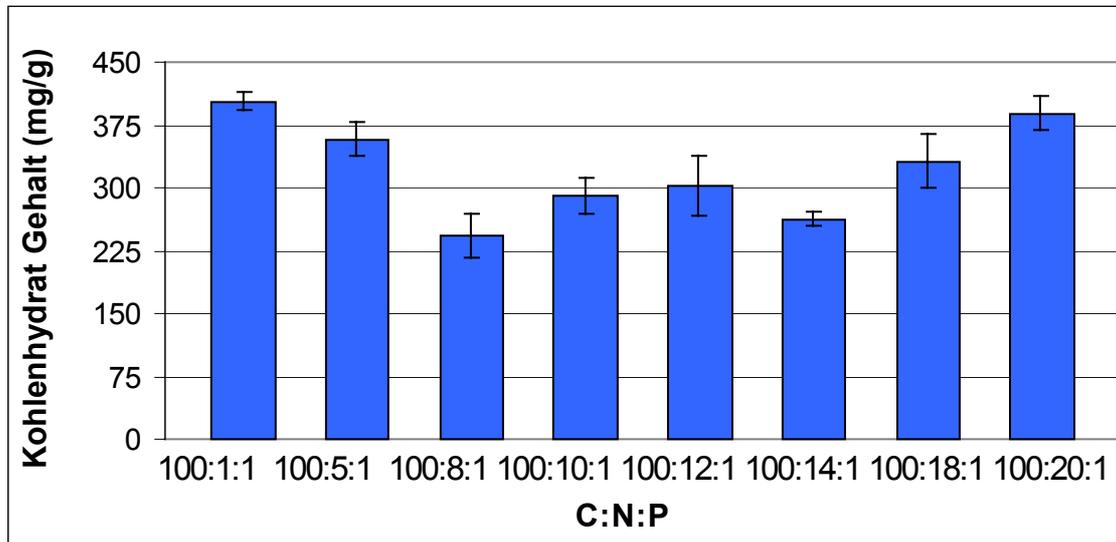
Der Proteinanteil in der Waschphase variierte von 2,5% bis 5,6% des Gesamtgehaltes an Proteinen in der Biofilm-TM Fraktion. Die Waschphase-Bestandteile wurden in dieser Arbeit nicht berücksichtigt, da sie definitionsgemäß nicht unter die EPS fallen (s. Einleitung).

#### **Proteingehalt-Vergleichsmessungen aus Biofilm-TM und Biofilm-FM**

Direkte Vergleichsmessungen aus Biofilm-FM (gleiche Vorbehandlung wie Biofilm-TM, s. Kap. 3.4.3) und Biofilm-TM Proben zeigten Abweichungen von 5-7% an. Die Biofilm-TM Proben wiesen immer einen höheren Anteil an Proteinen aus. Die vorausgehende Trocknung des Biofilms zeigte keinen Einfluss auf die Proteinmessungen. Die Messung der Protein-Gehalte aus dem Biofilm-TM Proben war gut durchführ- und reproduzierbar.

#### 4.2.4 Gehalte an Kohlenhydraten in den Biofilmen

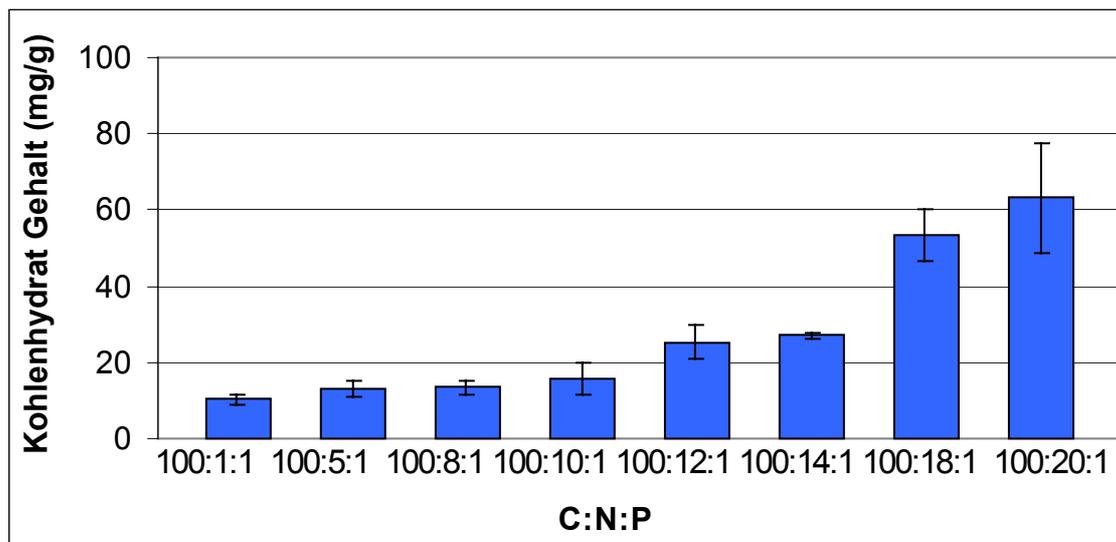
Die Abbildungen 42 und 43 zeigen die Gehalte an Kohlenhydraten im Biofilm-TM und Biofilm-FM. Die Messdaten zu den Abbildungen 42 und 43 sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 42:** Gehalte an Kohlenhydraten im Biofilm-TM

Der Verlauf in der Abbildung 42 zeigt eine deutliche Abhängigkeit des Kohlenhydratgehaltes vom Stickstoffangebot im resultierenden Biofilm-TM. Bei einem geringen Angebot an Stickstoff ist der Gehalt an Kohlenhydraten zunächst hoch. Die Abnahme der Gehalte setzt sich bis zum C:N:P-Verhältnis von 100:8:1 fort und bleibt bis ca. 100:14:1 konstant. Ab 100:18:1 steigen sie wiederum bis auf Werte an, die auch bei niedrigen Stickstoffgehalten vorhanden sind.

Abbildung 43 zeigt die Gehalte an Kohlenhydraten im Biofilm-FM.



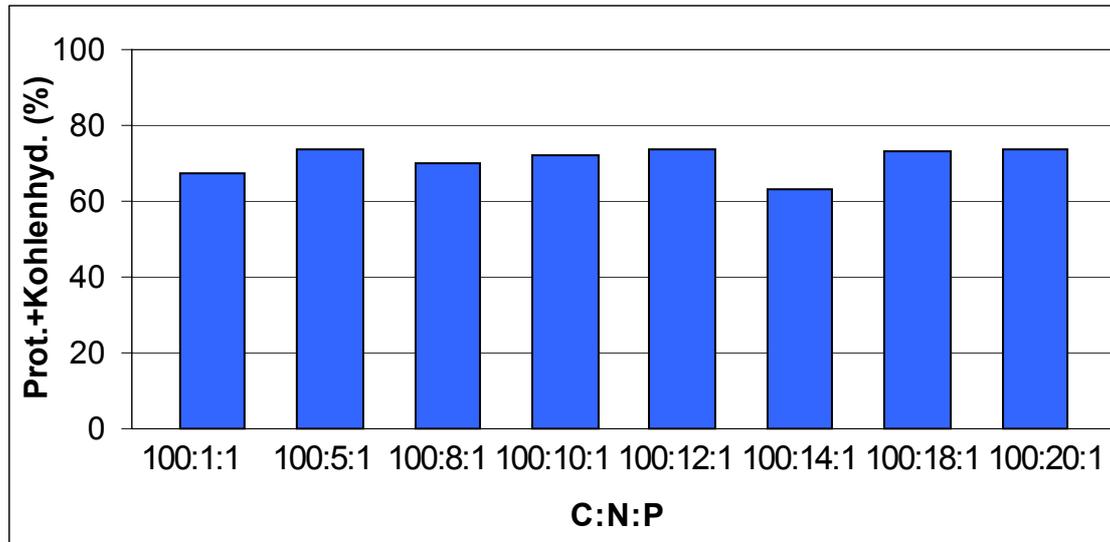
**Abbildung 43:** Gehalte an Kohlenhydraten im Biofilm-FM

Bei der Darstellung des Kohlenhydratgehaltes - unter Berücksichtigung des Wassergehaltes - ist der Verlauf des Anteils an Kohlenhydraten im Biofilm-FM (Abbildung 43) deutlich unterschiedlich zu dem Biofilm-TM (Abbildung 42). Die Gehalte erhöhen

sich mit abnehmendem Wassergehalt. Dieser Anstieg kann nur auf das erhöhte Angebot an Stickstoff zurückzuführen sein. Auch diese Werte können nicht unabhängig von anderen Fraktionen des Biofilms bewertet werden. Unter Kapitel 4.2.4 wird auf mögliche Zusammenhänge eingegangen.

### Summe der Gehalte an Kohlenhydraten und Proteinen in den Biofilmen

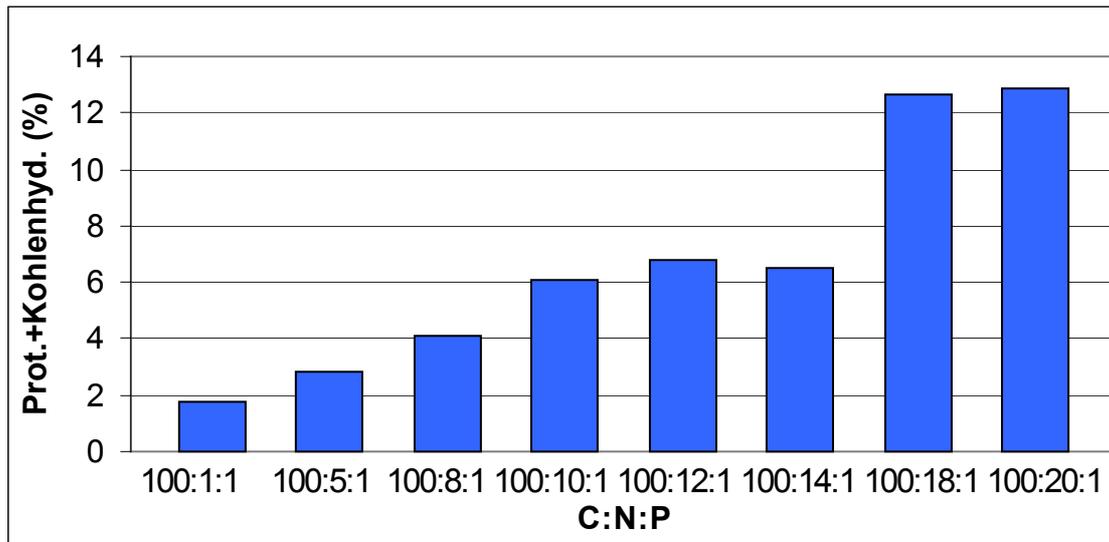
Die Abbildungen 44 und 45 zeigen prozentual die Summen von Proteinen und Kohlenhydraten im Biofilm-TM und Biofilm-FM. Die Messdaten zu den Abbildungen 44 und 45 sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 44:** Summe der Proteine und Kohlenhydrate im Biofilm-TM (w/w)

Die Summen von Proteinen und Kohlenhydraten im Biofilm-TM liegen zwischen 63 und 73%, mit einem Mittelwert von  $70,8\% \pm 3,59$ . Die Summe bleibt im Biofilm-TM aus allen C:N:P-Verhältnissen vergleichbar. Eine Abhängigkeit vom Stickstoffgehalt aus dem synthetischen Medium ist aus der Summe von Proteinen und Kohlenhydraten nicht zu erkennen. Eine gleichmäßige Verteilung der Summen in allen C:N:P-Verhältnissen spiegelt sich auch in den Gehalten an  $C_{org}$ . (s. Kap. 4.1.3) wieder, die mit den Gehalten an Proteinen und Kohlenhydraten über die Verfügbarkeit des organischen Kohlenstoffes in Verbindung stehen.

Abbildung 45 zeigt prozentual die Summe der Gehalte von Proteinen und Kohlenhydraten pro Gramm Biofilm-FM.



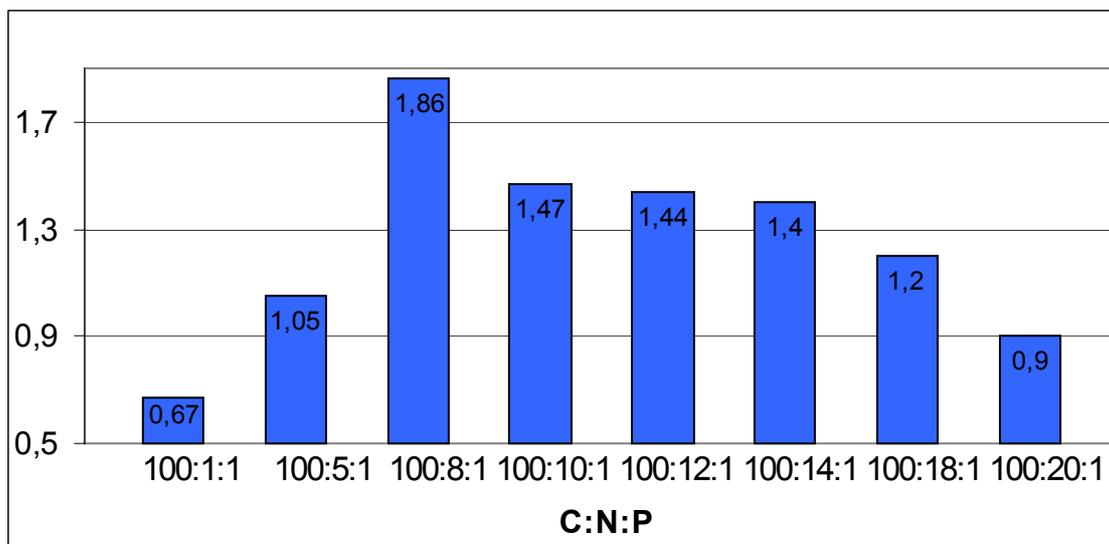
**Abbildung 45:** Summe der Proteine und Kohlenhydrate im Biofilm-FM (w/w)

Der Verlauf in Abbildung 45 zeigt keine einheitlichen Summen an Proteinen und Kohlenhydraten im Biofilm-FM. Dies ist wiederum bedingt durch die unterschiedlichen Wassergehalte im Biofilm. Nach einem Anstieg der Summe von Proteinen und Kohlenhydraten wird bei ca. 100:10:1 bis 100:14:1 ein Plateau erreicht. In den nachfolgenden C:N:P-Verhältnissen steigt die Summe sehr stark an.

Diese Ergebnisse sind in Verbindung mit den anderen Fraktionen des Biofilms zu sehen – speziell, weil die Verläufe der Gehalte an Kohlenhydraten (s. Kap. 4.2.4) und Proteinen (s. Kap. 4.2.3) gegenläufig sind, aber in Biofilm-TM die Summe in allen C:N:P-Verhältnissen gleiche Werte erreichen. Auf diese Verhältnismäßigkeit haben die Gehalte an organischen Kohlenstoff und Stickstoff Auswirkungen.

#### Quotienten aus Protein-, Kohlenhydrat- und Stickstoffgehalten in den Biofilmen

Abbildung 46 zeigt die Quotienten aus Proteinen/Kohlenhydraten im Biofilm-TM.

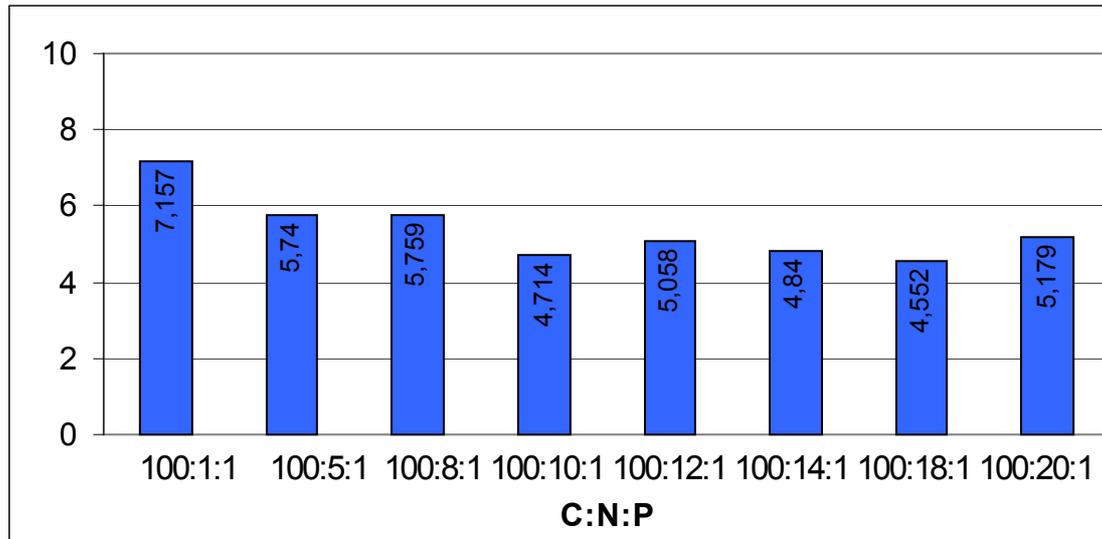


**Abbildung 46:** Quotienten aus Proteine/Kohlenhydratgehalte im Biofilm-TM

Abbildung 46 zeigt den Einfluss der unterschiedlichen Stickstoffgehalte in den synthetischen Medien auf die Quotienten der Protein/Kohlenhydratgehalte.

Die Entwicklungen der Proteine/Kohlenhydrat-Verhältnisse sind anfangs zunehmend. Ab 100:10:1 bis 100:14:1 wird ein Plateau erreicht (100:8:1 ausgenommen). Bei höheren Stickstoffgehalte verringert sich das Verhältnis wieder. Die Entwicklung der Quotienten ist auffällig, weil die Aufnahme an zusätzlich angebotenen Stickstoff aus dem synthetischen Medium (s. Kap. 4.1.4) schon bei 100:10:1 – 100:12:1 stoppt. Der Quotient aus Proteinen/Kohlenhydraten verändert sich aber dennoch.

Abbildung 47 zeigt die Quotienten aus Protein-Gehalt und Stickstoff-Gehalt im Biofilm-TM.



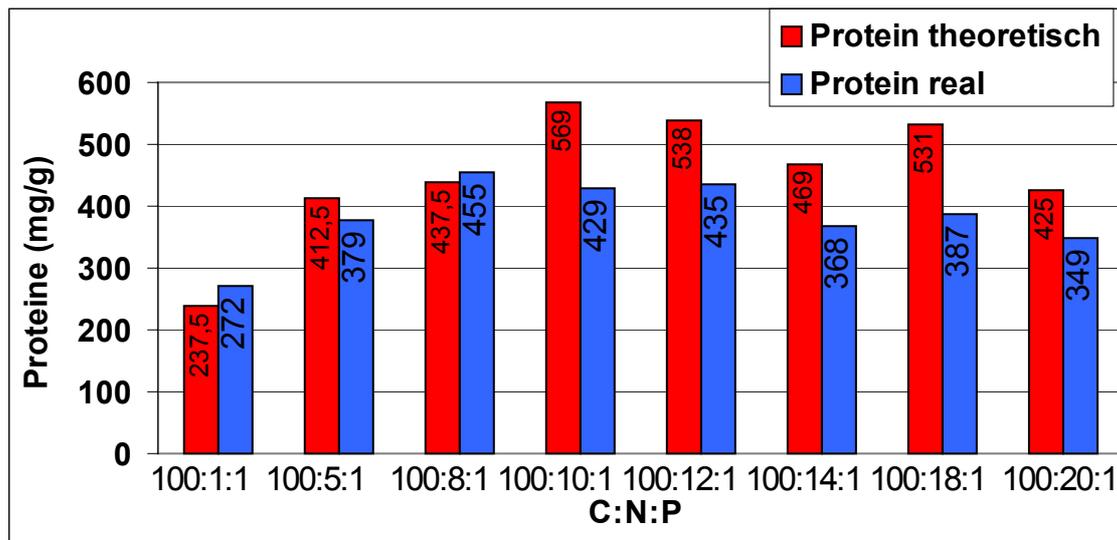
**Abbildung 47:** Quotient aus Protein-Gehalt und N-Gehalt im Biofilm-TM

Die Quotienten aus Proteingehalt und N-Gehalt liegen zwischen 4,5 und 7,2. Wird das Verhältnis von 100:1:1 ausgenommen, liegen die Quotienten in einem Bereich von 4,6 bis 5,8. Der Mittelwert beträgt  $5,12 \pm 0,44$ .

### Umrechnung vom Stickstoffgehalt auf den Proteingehalt

Als Umrechnungsfaktor für Protein-Gehalte wird der Stickstoffgehalt zugrunde gelegt. Dabei wird der Stickstoffgehalt mit Faktor 6,25 multipliziert, um den Proteinwert auszurechnen.

Abbildung 48 zeigt die Gehalte an Protein-theoretisch, d. h. den ausgerechneten Proteinwert (Multiplikationsfaktor  $N \cdot 6,25$ , in Frølund et al., 1996) nach dem gemessenen Stickstoffgehalt aus Biofilm-TM. In Relation wird der aus den Biofilm-TM Proben gemessene Proteingehalt gesetzt.

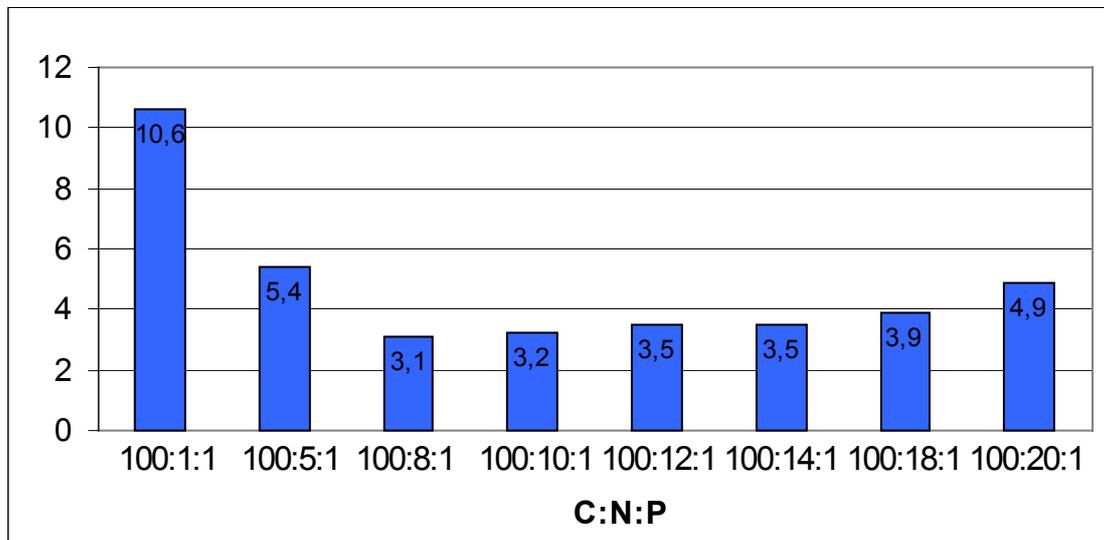


**Abbildung 48:** Protein-real und Protein-theoretisch aus Biofilm-TM

Die Werte in Abbildung 48 zeigen einen fast durchgehend niedrigeren Gehalt an Protein-real, als er theoretisch zu erwarten ist. Die in Abbildung 48 dargestellten Ergebnisse machen deutlich, dass der Umrechnungsfaktor von  $N \cdot 6,25$  in Biofilmen nicht zu den prognostizierten Ergebnissen führte. Bei fast allen C:N:P-Verhältnissen lagen die theoretischen Werte der Proteine über dem real gemessenen. Der Umrechnungsfaktor von 6,25 wird auch bei Raunkjer et al. (1994) als nicht exakt dargestellt, da in die Messwerte der Stickstoffbestimmung – Raunkjer et al. (1994) benutzten die Kjeldahl-Methode – auch Stickstoff erfasst wird, der nicht in Proteinen gebunden ist. Der aus den Werten der Abbildung 47 gebildete Mittelwert aus den Quotienten von Proteingehalt und Stickstoffgehalt liegt konstant bei  $5,12 \pm 0,44$  und eignet sich besser zur Umrechnung der Protein- Stickstoffgehalte in diesen Biofilmen. Dennoch kann die Frage gestellt werden, wo verbleibt der Differenz-Stickstoff, der nicht in Proteinen gebunden ist? Möglicherweise ist der Stickstoff für andere Bindungen als in den Proteinen des Biofilms verwendet worden. Deutlicher wird dies bei den Vergleichen der Stickstoff- und Proteingehalte in den EPS, s. unten.

### Quotienten aus Kohlenhydrate/Stickstoff-Gehalt

Abbildung 49 zeigt die Quotienten aus dem Kohlenhydratgehalt und dem Stickstoffgehalt im Biofilm-TM.



**Abbildung 49:** Quotienten aus dem Kohlenhydratgehalt und dem Stickstoffgehalt im Biofilm-TM

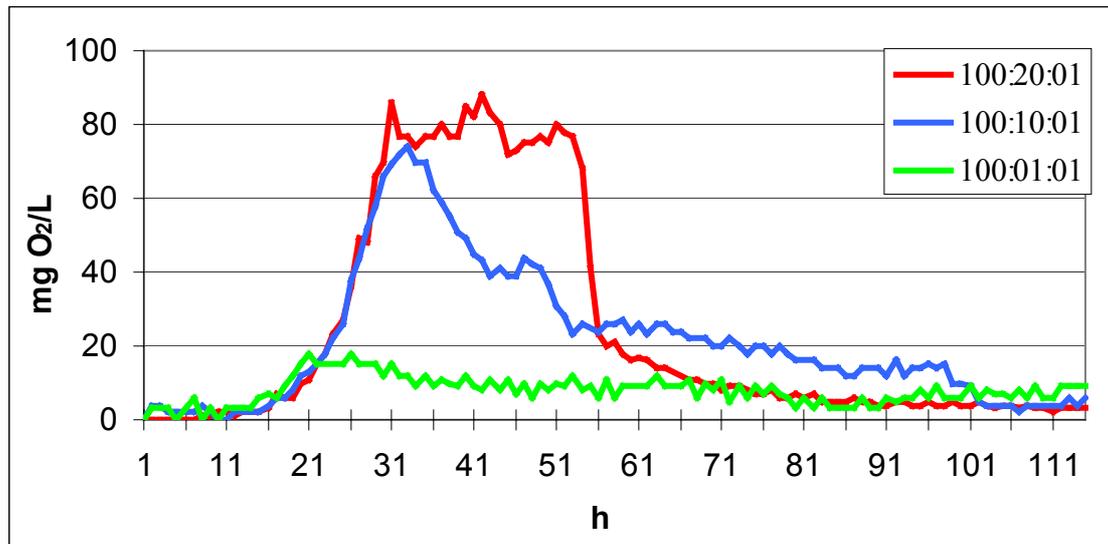
Die Quotienten aus Kohlenhydraten und Stickstoffgehalten zeigen im Verhältnis von 100:1:1 und 100:5:1 einen stickstofflimitierenden Einfluss. Ab dem Verhältnis von 100:8:1 bleibt der Quotient annähernd konstant, erhöht sich aber wieder leicht ab dem Verhältnis von 100:18:1 und 100:20:1. Dieses Ergebnis zeigt an, dass sich – obwohl die Stickstoffaufnahme aus dem synthetischen Medium ab dem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 nicht erhöht wird – die Gehalte an Kohlenhydraten im Biofilm weiter verändern. Diese Veränderung ist nicht nur auf den in den Biofilm aufgenommenen Stickstoff zurückzuführen, sondern auch auf dem im synthetischen Medium verbliebenen, der einen genotypischen Einfluss auf die Mikroorganismen wirksam machen könnte.

#### 4.2.5 Ergebnisse zum MPN der Nitrifikanten

Bei keiner der angesetzten Verdünnungsreihen war nach der MPN-Methode ein farblicher Umschlag zu erkennen.

#### 4.2.6 Biochemischer Sauerstoffbedarf (BSB) aus den C:N:P-Verhältnissen

Abbildung 50 zeigt die Verläufe von BSB-Ansätzen im Sapromaten.



**Abbildung 50:** BSB-Verlaufskurven unterschiedlicher C:N:P-Verhältnisse im Sapromaten

Aus diesen planktonischen BSB-Läufen wurde der Einfluss unterschiedlicher C:N:P-Verhältnisse auf Mikroorganismen untersucht. Die drei unterschiedlichen C:N:P-Verhältnisse zeigen einen Einfluss des Stickstoffgehaltes auf die Sauerstoffzehrungsrate und damit auf die physiologische Aktivität der Mikroorganismen. Die Anlaufphase, die lag-Phase, ist bei allen Ansätzen noch gleich. Dann zeigt sich der mangelnde Stickstoffgehalt im 100:1:1 Verhältnis. Der fehlende Stickstoff beeinflusst die physiologische Leistungsfähigkeit der Mikroorganismen recht deutlich, im Vergleich zu den beiden höher mit Stickstoff dotierten C:N:P-Läufen. Die 100:10:1 und 100:20:1 Läufe liegen in der log-Phase noch zusammen. Der 100:20:1 Ansatz zeigt ein längeres Verbleiben in dieser Phase. Der 100:10:1 hält sich kaum in die Plateau-Phase und fällt schnell ab in die Absterbephase. Der 100:20:1 Ansatz zeigt eine lange Plateau-Phase und fällt in der Absterbephase unter die Sauerstoffzehrung des 100:10:1-Ansatzes.

Der 100:10:1-Ansatz zeigt in der Absterbephase noch höhere Sauerstoffzehrungen, weil durch Zellyse wieder Stickstoff verfügbar wurde und der noch vorhandene organische Kohlenstoff weiter oxidiert werden konnte. Noch 120 Stunden lagen die 100:10:1 und der 100:20:1 Ansätze in der gesamten Sauerstoffzehrungsrate beieinander. Der 100:1:1-Ansatz hatte dagegen wesentlich niedrigere Gesamt-Sauerstoffzehrungsraten.

### 4.3 Ergebnisse zur EPS-Analytik

#### 4.3.1 Erträge aus den CER-Extraktionen

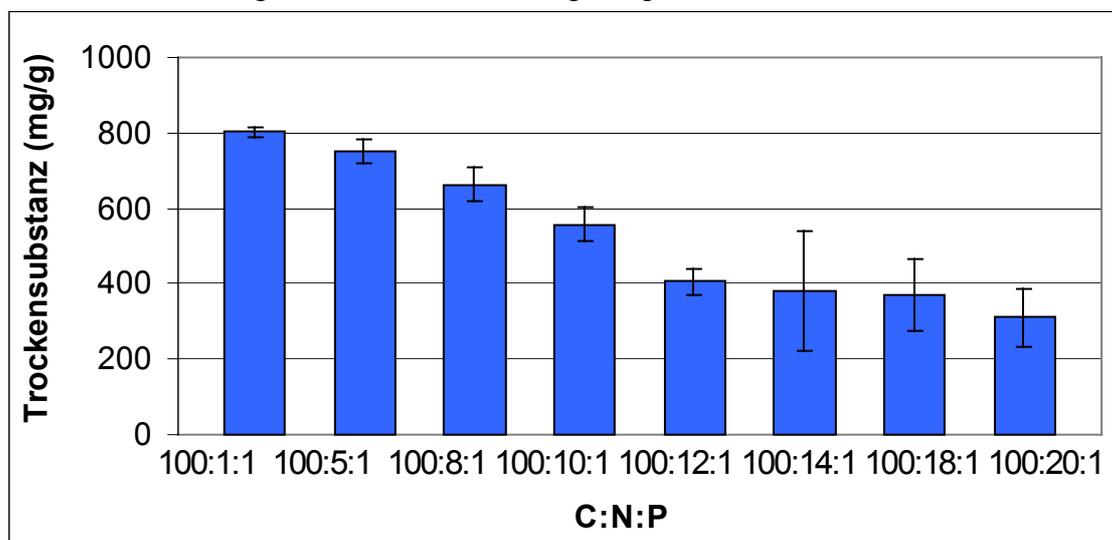
Die Destabilisierung und damit teilweise Auflösung der EPS durch Ionenaustauscher (CER) ist momentan die Methode mit den höchsten Ausbeuten an EPS (Flemming u. Wingender, 2002).

In folgenden Kapiteln werden die Ergebnisse zu Untersuchungen der EPS-Extrakte gezeigt – Trockensubstanz s. Kap. 4.3.2, organischer Kohlenstoff s. Kap. 4.3.3, Stickstoff s. Kap. 4.3.4, Metalle s. Kap. 4.3.5, Protein SDS-Gele s. Kap. 4.3.6, Proteine s. Kap. 4.3.8, Kohlenhydrate s. Kap. 4.3.9, G6PDH-Aktivitätstest s. Kap. 4.3.11, N-Acyl-Homoserinlactone s. Kap. 4.3.7. Die Extraktionsmethode ist unter 3.5.1 beschrieben.

Aus 16 Versuchsläufen wurden die EPS aus den Biofilmen mit der in Kap. 3.5.1 beschriebenen Methode extrahiert. Die Methode bietet zwei Variationen der Extraktion. Die milde Extraktion (600 rpm für 0,5 – 1 h) und die effektive Extraktion (900 rpm für >12 h). Mit der zuletzt genannten Version wurden der Biofilm für 2 h bei 900 rpm behandelt. Von den so extrahierten 16 EPS-Extrakten stammten 8 aus Rückstellproben (-18°C) und 8 aus „frischem“ Biofilm. Die jeweils gemessenen Werte werden im Ergebnisteil nach „frisch“ und „aufgetaut“ wiedergegeben.

#### 4.3.2 Gehalte an Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten

Die Gewinnung der Trockensubstanz (TS) aus den EPS-Extrakten ist unter 3.5.2 beschrieben. Abbildung 51 zeigt die Gehalte an TS aus der CER-Extraktion. Die Zahlenwerte zu dem Diagramm sind im Anhang dargestellt.



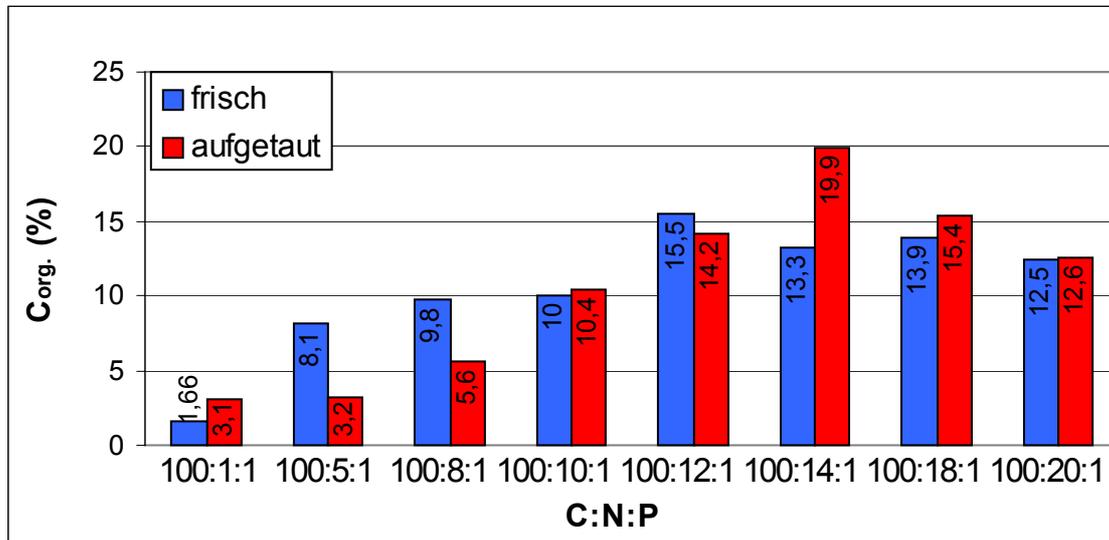
**Abbildung 51:** Gehalte an Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten

Die Erträge aus der Extraktionen mit CER sind abhängig von der Konzentration an zweiwertigen Ionen. Calcium kann in dieser Hinsicht eine wichtige Rolle spielen. Der Verlauf in Abbildung 51 macht deutlich, dass mit zunehmendem Stickstoffanteil die Feststofferträge aus der CER-Extraktion abnehmen.

Die Abnahme der Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten kann in Verbindung mit dem abnehmenden Calciumgehalt gesehen werden, der aus dem Biofilm-TM gemessen (s. Kap. 4.1.8) wurde.

### 4.3.3 Gehalte an organischem Kohlenstoff in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte

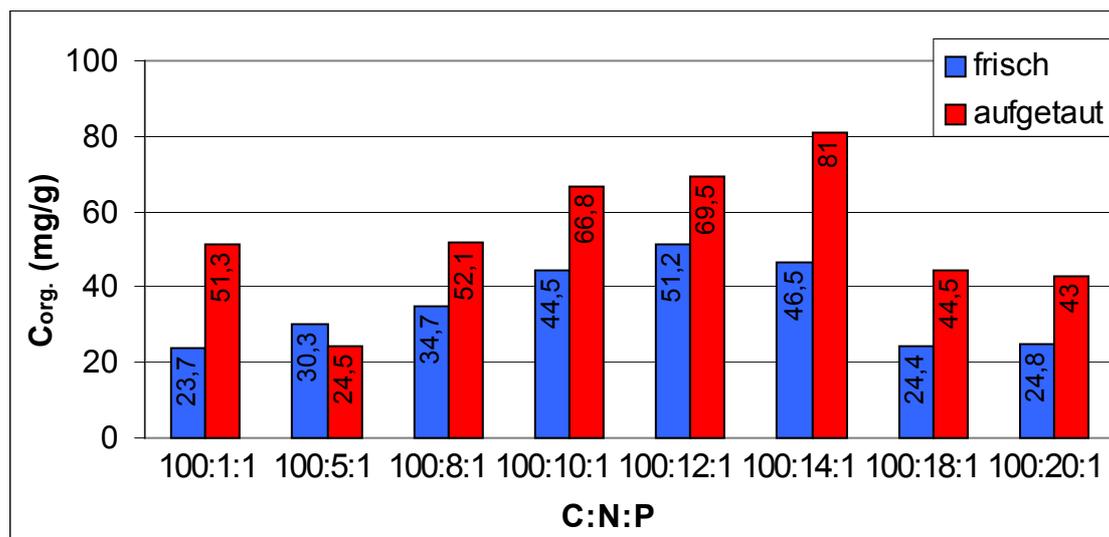
Abbildung 52 zeigt die Gehalte an  $C_{org.}$  in der Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten der unterschiedlichen C:N:P-Verhältnisse.



**Abbildung 52:** Gehalte an  $C_{org.}$  in den EPS-Extrakten (w/w)

Der Verlauf der Abbildung 52 zeigt die prozentualen Gehalte an  $C_{org.}$  aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte. Das Maximum des  $C_{org.}$  der „frischen“ EPS liegt bei 100:12:1. Der  $C_{org.}$  aus den „aufgetauten“ Biofilmen zeigt in etwa gleiche Entwicklungen – das Auftreten einer Zellyse ist aus diesen Daten nicht anzunehmen.

Abbildung 53 zeigt die Gehalte an  $C_{org.}$  in den EPS-Extrakten, je Gramm Biofilm-TM Einwaage, für die CER-Extraktion.

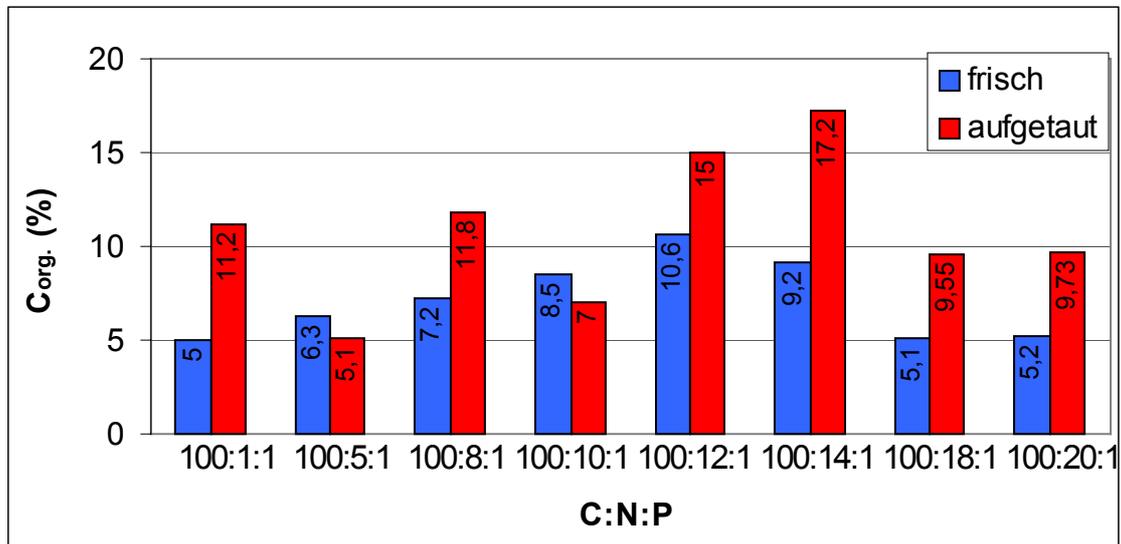


**Abbildung 53:**  $C_{org.}$  in den EPS-Extrakten, bezogen auf ein Gramm Biofilm-TM für die CER-Extraktion (w/w)

Der qualitative Bezug des Gehaltes an  $C_{org.}$  auf ein Gramm Biofilm-TM Einwaage für die CER-Extraktion zeigt einen anderen Verlauf, als die quantitative Darstellung im

Abbildung 52. Aber auch hier wird ein Maximum bei 100:12:1 bei den Extrakten aus dem „frischen“ Biofilm erreicht.

Abbildung 54 zeigt den prozentualen Anteil an organischen Kohlenstoff in den EPS-Extrakten, bezogen auf den gesamten organischen Kohlenstoff im Biofilm-TM.

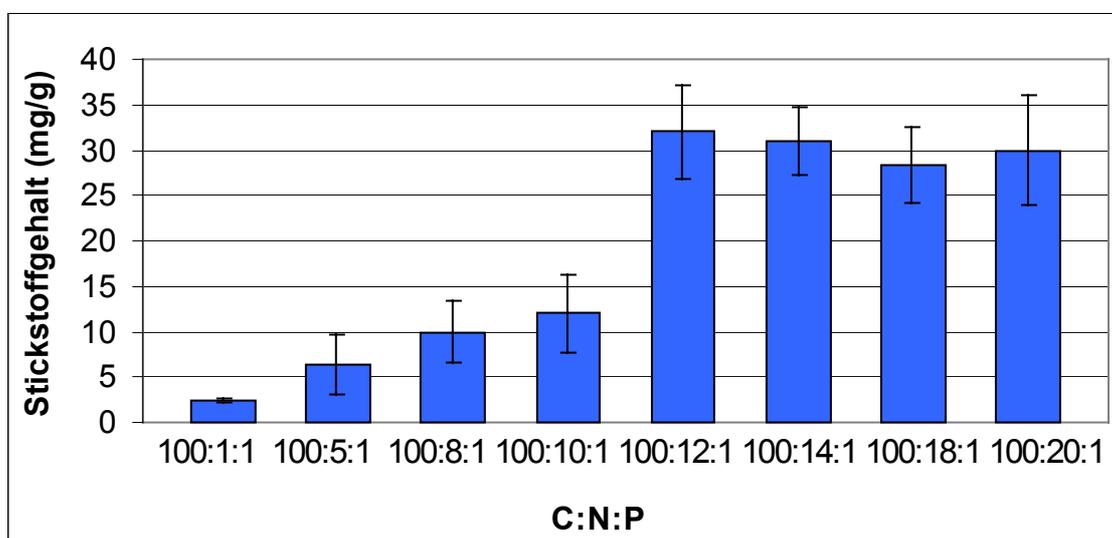


**Abbildung 54:** Anteil von C<sub>org.</sub> in den EPS-Extrakten an C<sub>org.</sub> des Biofilm-TM (w/w)

Der Verlauf des C<sub>org.</sub> aus den EPS-Extrakten aus den „frischen“ Biofilmen zeigt auch hier ein Maximum beim C:N:P-Verhältnis von 100:12:1. Der Verlauf der C<sub>org.</sub> Gehalte vom „aufgetauten“ Biofilm zeigt in Abbildung 54 einen möglichen Einfluss einer Zellyse durch das Einfrieren der Biofilme.

#### 4.3.4 Gehalte an Stickstoff in der Trockensubstanz (TS) der EPS-Extrakte

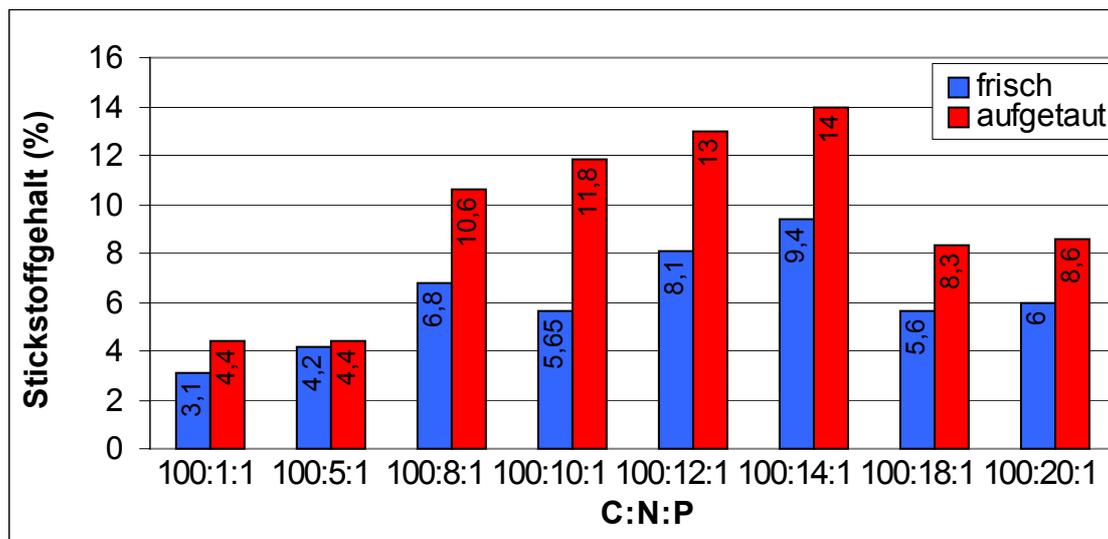
Abbildung 55 zeigt qualitativ die Gehalte an Stickstoff aus den CER-Extrakten (s. Kap. 3.5.4). Die Darstellung in Abbildung 55 ist nicht nach Stickstoff aus „frischen“ und „aufgetauten“ Biofilmen getrennt. Die Messdaten zur Abbildung 55 sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 55:** Stickstoffgehalte in der TS aus den EPS-Extrakten

Die Gehalte an Stickstoff in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte nehmen mit steigendem Stickstoffanteil in den synthetischen Medien zu. Ein starkes Ansteigen des Stickstoffgehaltes erfolgt ab 100:12:1. Bei höheren Stickstoffgehalte verbleibt der resultierende Stickstoffgehalt in den EPS-Extrakten in etwa gleichen Anteilen. Obwohl die erhaltene Trockensubstanz (s. Kap. 4.3.2) aus den EPS-Extrakten mit zunehmendem Stickstoffanteil im synthetischen Medium abnimmt – erhöht sich der Stickstoffanteil in der Trockensubstanz. Parallel zu dieser Entwicklung stagniert die Aufnahme von Ammonium-N (s. Kap. 4.1.4) aus dem synthetischen Medium ab C:N:P 100:12:1.

Abbildung 56 zeigt die prozentualen Gehalte an N in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte, je Gramm Biofilm-TM Einwaage für die CER-Extraktion.

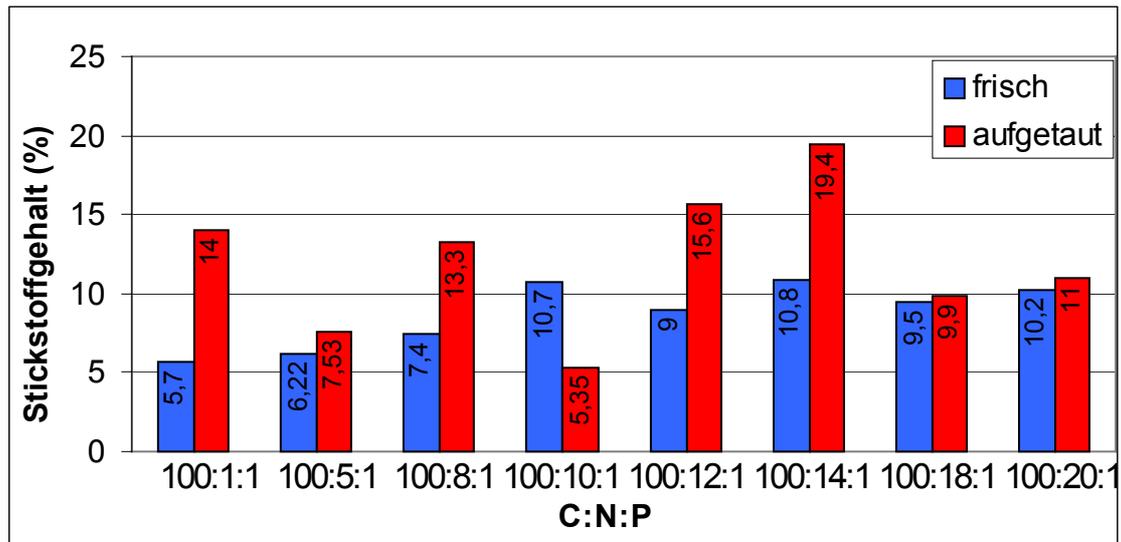


**Abbildung 56:** N-Gehalt in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte je Biofilm-TM Einwaage für die CER-Extraktion (w/w)

Der prozentuale Anteil des Stickstoff-Gehaltes in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte der „frischen“ Biofilme zeigt eine Steigerung des Stickstoffgehaltes bis zu einem Verhältnis von 100:14:1 (ausgenommen 100:8:1). Bei den C:N:P-Verhältnissen von 100:18:1 und 100:20:1 fällt der prozentuale Stickstoff-Gehalt wieder deutlich ab.

Der prozentuale Anteil des Stickstoff-Gehaltes in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte aus den „aufgetauten“ Biofilmen liegt durchgehend, teilweise wesentlich, höher als in den „frischen“. Die höheren Gehalte können auf eine Zellyse hindeuten.

Abbildung 57 zeigt den N-Anteil in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte an dem Gehalt an  $N_{\text{gesamt}}$  aus dem Biofilm-TM.



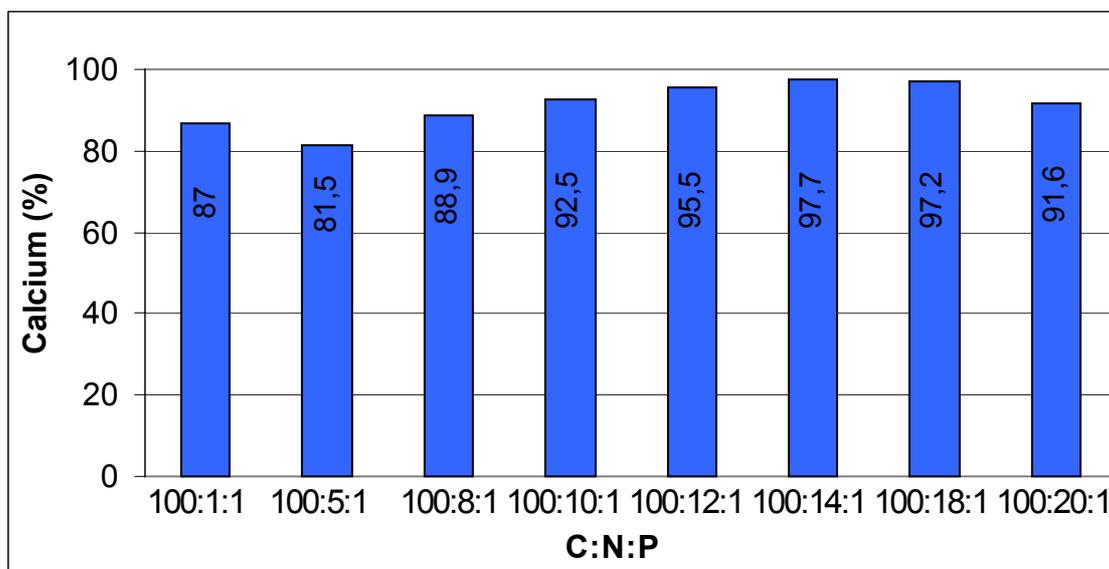
**Abbildung 57:** Anteil N aus EPS an  $N_{\text{gesamt}}$  im Biofilm-TM

Der Verlauf des Abbildung 57 zeigt eine Zunahme des prozentualen N-Anteils in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte aus den Biofilm-TM „frisch“-Proben bis zu einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1. Danach bleibt der prozentuale Stickstoffgehalt in einem Bereich von ca. 10%. Vergleichend zu den Messungen des Ammonium-N Gehaltes in den Restwässern der Versuchsläufe ist ab einem Verhältnis von ca. 100:10:1 eine Stagnation der Stickstoffsorption festzustellen.

Die prozentualen N-Anteil der „aufgetauten“ Biofilme zeigt hingegen eine andere Entwicklung. Dieser könnte durch den Einfluss einer Zellyse verursacht sein.

#### 4.3.5 Gehalte an Metallen aus den EPS-Extrakten

Um die Effektivität der CER-Extraktion auf die Komplexierung der zweiwertigen Kationen festzustellen, wurden die Gehalte an Calcium in den EPS-Extrakten gemessen und auf die Gehalte an Calcium im Biofilm-TM für die CER-Extraktion rückgerechnet.



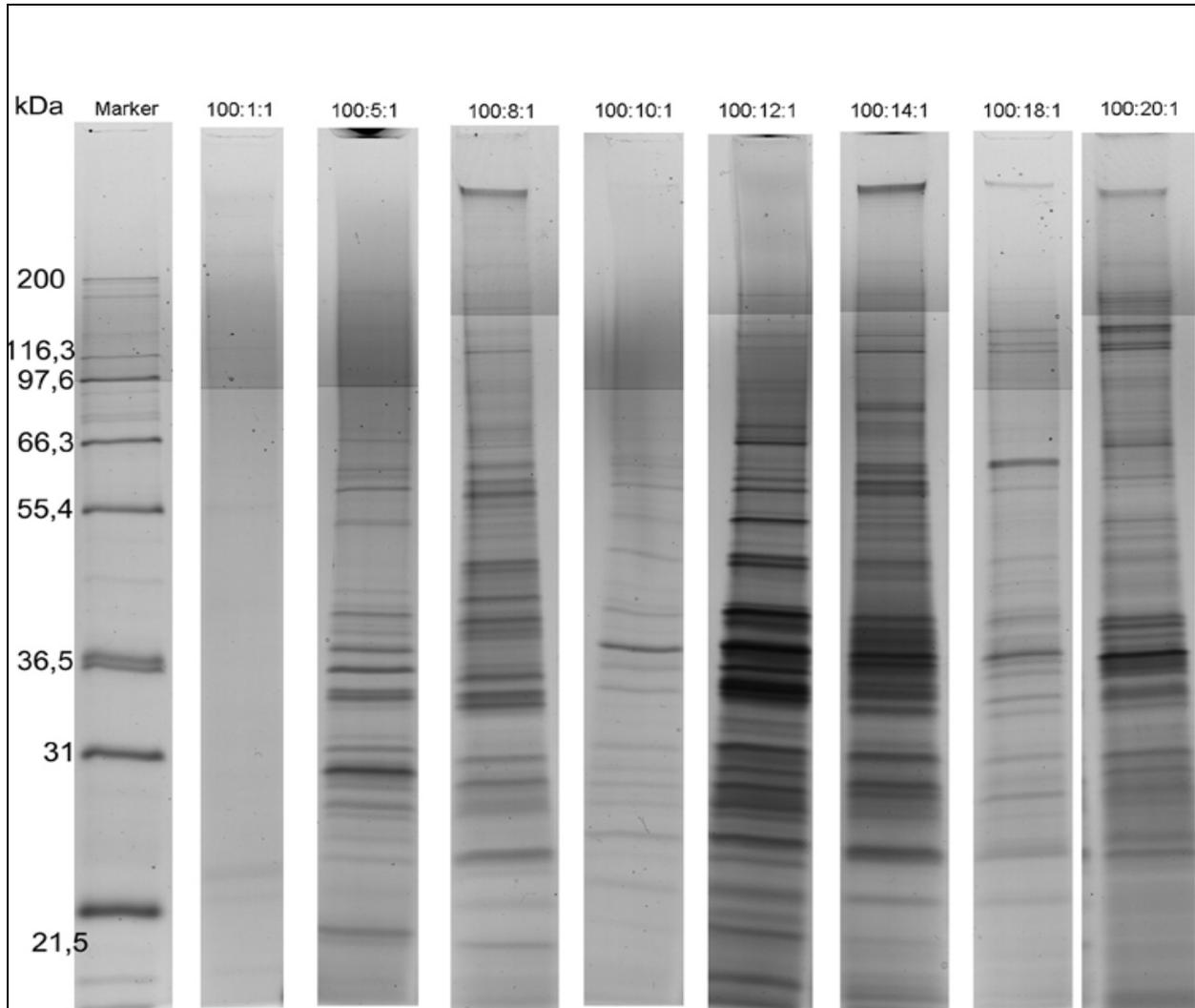
**Abbildung 58:** Effektivität der Calciumrückhaltung durch CER (w/w)

Die prozentualen Werte in den Balken geben an, wieviel Calcium nach der CER-Extraktion im abzentrifugierten Biofilm rückgehalten wurde.

Es ist eine leicht steigende Tendenz der Rückhaltung mit zunehmendem Stickstoffanteil zu erkennen - 100% wurden aber nicht erreicht.

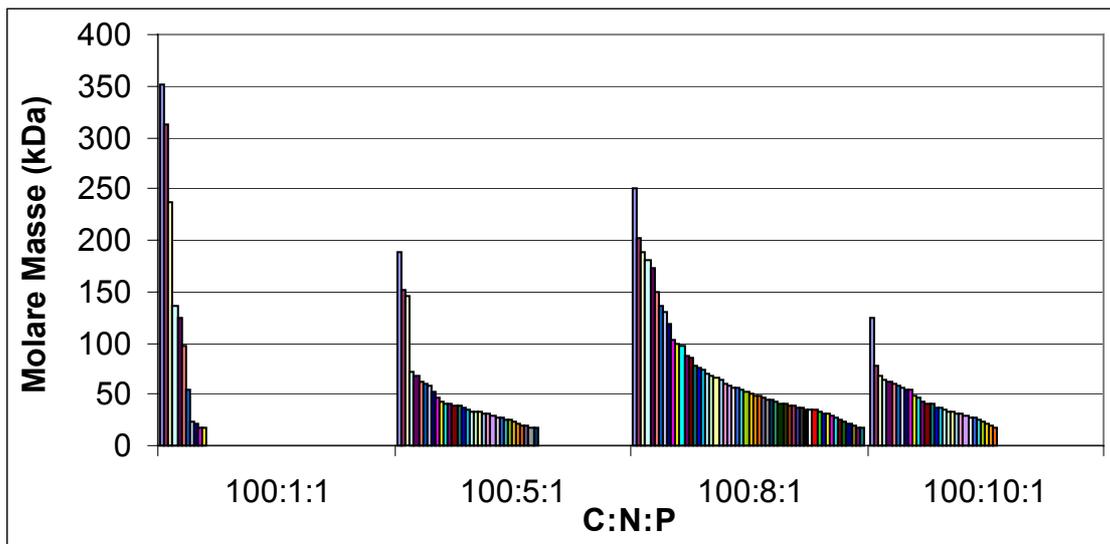
#### 4.3.6 Proteinbanden aus den EPS-Extrakten mit SDS-Page

Abbildung 59 zeigt die Proteine als Bandenmuster aus den EPS-Extrakten vom „frischem“ Biofilm, d. h. der Biofilm war vor der CER-Extraktion nicht eingefroren.

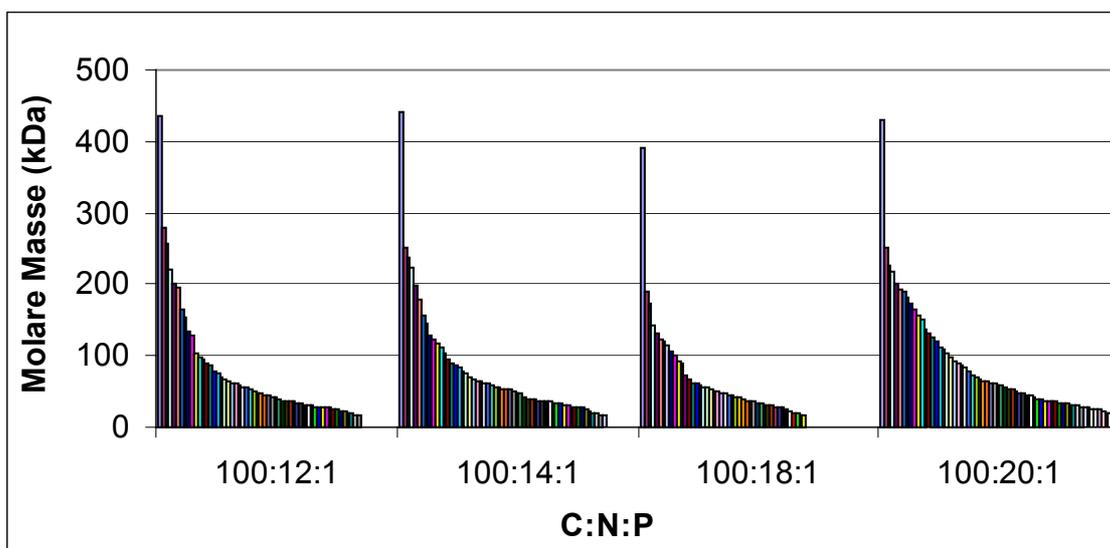


**Abbildung 59:** Proteinbanden auf den Gelen aus EPS-Extrakten unterschiedlicher C:N:P-Verhältnisse

Aus der Bandenverteilung ist eine deutliche Änderung der Protein-Banden bei zunehmenden Stickstoffgehalten in den C:N:P-Verhältnissen zu erkennen. Einzelne Proteinbanden wurden von Hand auf ihre molare Masse zugeordnet. Die Daten werden in den folgenden Abbildungen dargestellt.



**Abbildung 60:** Bandenmuster der Proteine mit SDS-Page aus den EPS-Extrakten von 100:1:1 bis 100:10:1



**Abbildung 61:** Bandenmuster der Proteine mit SDS-Page aus den EPS-Extrakten von 100:12:1 bis 100:20:1

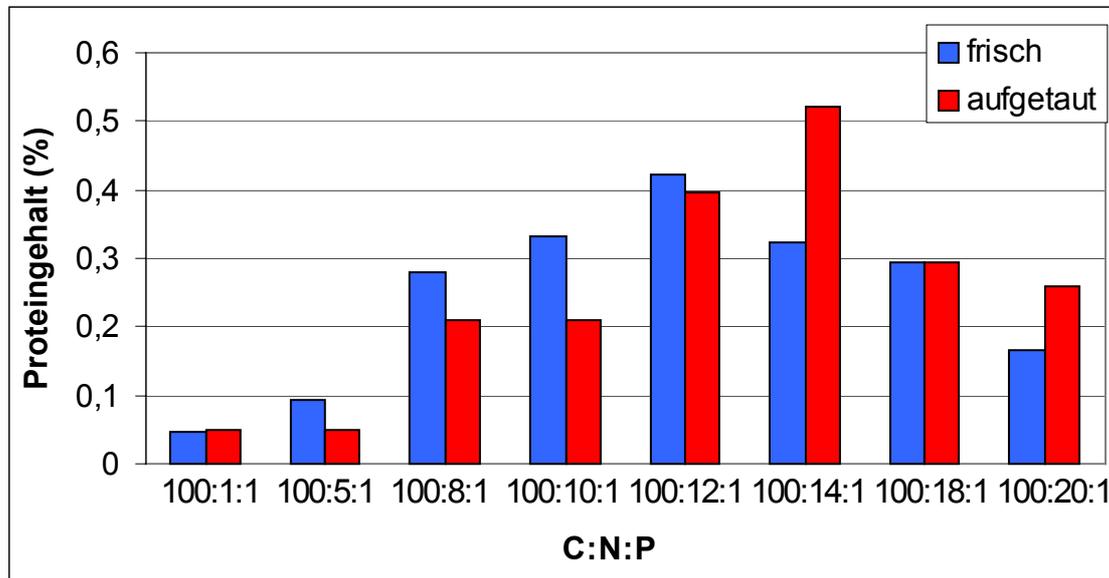
Die Abbildungen 60 und 61 zeigen eine Veränderung der Bandenmuster der Proteine mit steigendem Stickstoffanteil in den EPS-Extrakten aus den Biofilmen mit unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen im synthetischen Medium. Die C:N:P-Verhältnisse 100:10:01 und 100:18:01 fallen auf, da die Proteinkonzentrationen in den EPS-Extrakten bei der Gelauftragung (1,25 µg in 25 µl; s. Kap. 3.5.6) geringer war. Dennoch werden die Unterschiede der Proteinband aus den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen deutlich.

#### 4.3.7 Nachweis von N-Acyl-L-Homoserinlactonen (AHL) in den EPS-Extrakten

Die Ergebnisse zu beiden AHL-Versuchen waren negativ. Das Resultat zum Nachweis von AHL mit kurzer Acyl-Seitenkette zeigte keine violette Hofanfärbung und die Bestimmung von AHL mit längerer Acyl-Seitenkette zeigte keine positive Reaktion durch den Verbleib eines farblosen Hofes um das Probenloch.

#### 4.3.8 Gehalte an Proteinen aus den EPS-Extrakten

Die Abbildungen 62 und 63 zeigen die Gehalte an Proteinen in den EPS-Extrakten – differenziert nach „frisch“ und „aufgetaut“ und berechnet auf g der Biofilm-FM und Biofilm-TM Einwaage für die CER-Extraktion. Die Messdaten zu den Abbildungen 62 und 63 sind im Anhang aufgeführt.

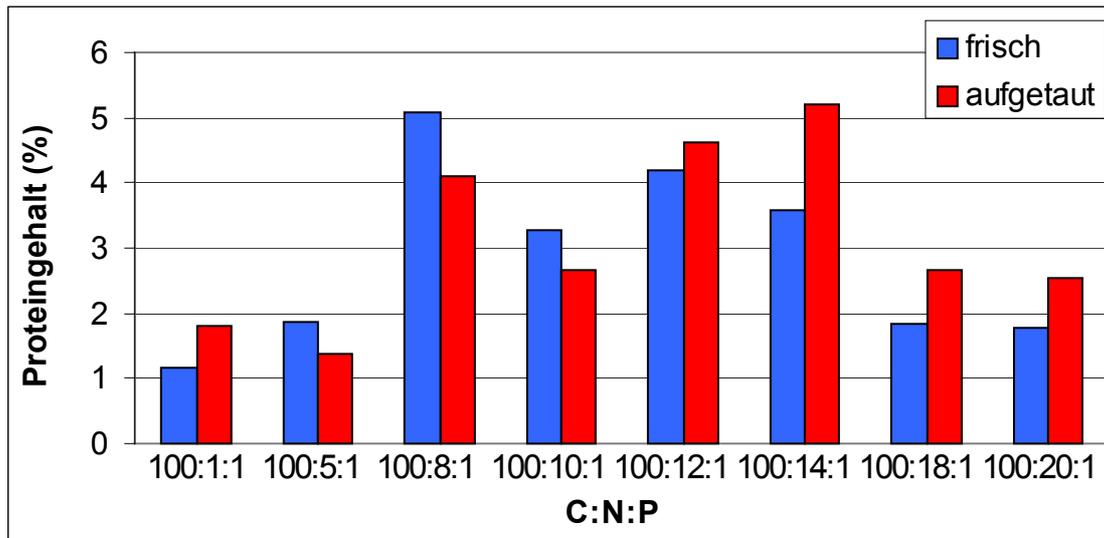


**Abbildung 62:** Proteingehalte in den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-FM Einwaage (w/w)

Abbildung 62 zeigt in den EPS-Extrakten aus „frischen“ Biofilmen die Proteingehalte mit einem Anstieg bis 100:12:1. Danach verringert sich der Proteinanteil wieder. Wird dieser Verlauf des Proteinanteils mit dem Gehalt an Stickstoff in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte (s. Kap. 4.3.4) verglichen, wird deutlich, dass der nach 100:12:1 in etwa gleich hoch bleibende Stickstoffanteil in der Trockensubstanz der EPS, nicht auf Proteingehalte zurückzuführen ist.

Der Vergleich zwischen den „frischen“ und „aufgetauten“ extrahierten EPS aus den Biofilmen macht deutlich, dass eine Zellyse stattgefunden haben kann. Die Zellyse ist bei der Messung der Aktivität von G6PDH (s. Kap. 4.3.11) nicht nachgewiesen worden. Der unregelmäßige Verlauf der Proteingehalte in den aus „aufgetauten“ Biofilmen extrahierten EPS weist dennoch darauf hin. Die fast durchgehend geringeren Gehalte an Proteinen in den „aufgetauten“ EPS spricht hingegen nicht für eine Zellyse. Ob der geringere Gehalt an Proteinen in den „aufgetauten“ EPS durch den Einfluss von Proteasen hervorgerufen ist, kann anhand der Ergebnisse nicht beurteilt werden.

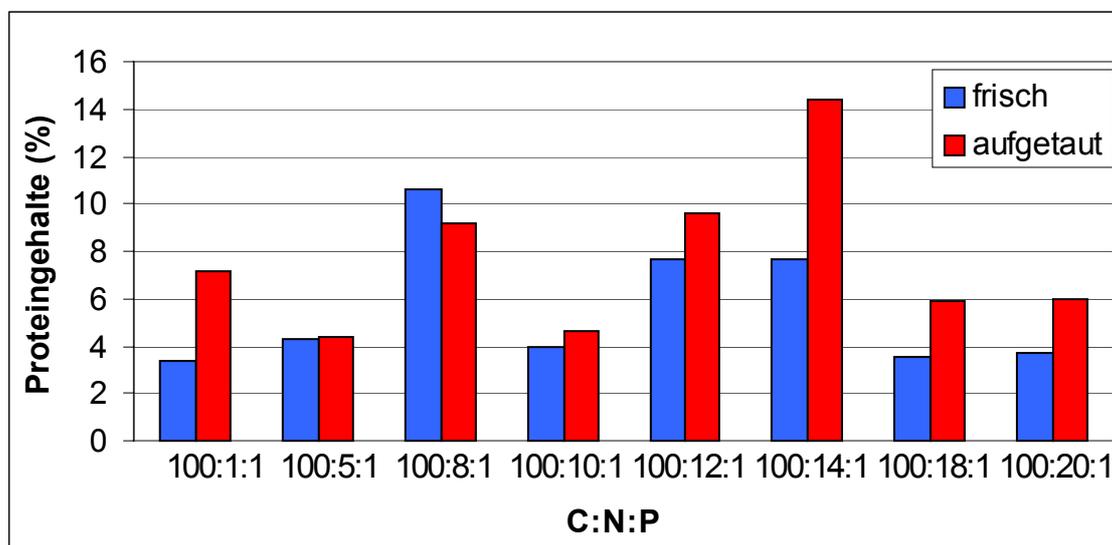
Abbildung 63 zeigt die Proteingehalte in den EPS-Extrakten, bezogen auf g Biofilm-TM Einwaage.



**Abbildung 63:** Proteingehalte in den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-TM Einwaage (w/w)

Abbildung 63 spiegelt die gleichen Aussagen wieder, die bereits in Abbildung 62 – Proteingehalte in Biofilm-FM - dargestellt wurden. Die Ausnahme ist der Gehalt an Proteinen im 100:8:1-Verhältnis und die höheren Proteingehalte in den „aufgetauten“ EPS.

Abbildung 64 zeigt die prozentualen Proteingehalte in den EPS-Extrakten zu den gesamten Proteingehalten im Biofilm-TM. Die Messdaten zur Abbildung 64 sind im Anhang aufgeführt.



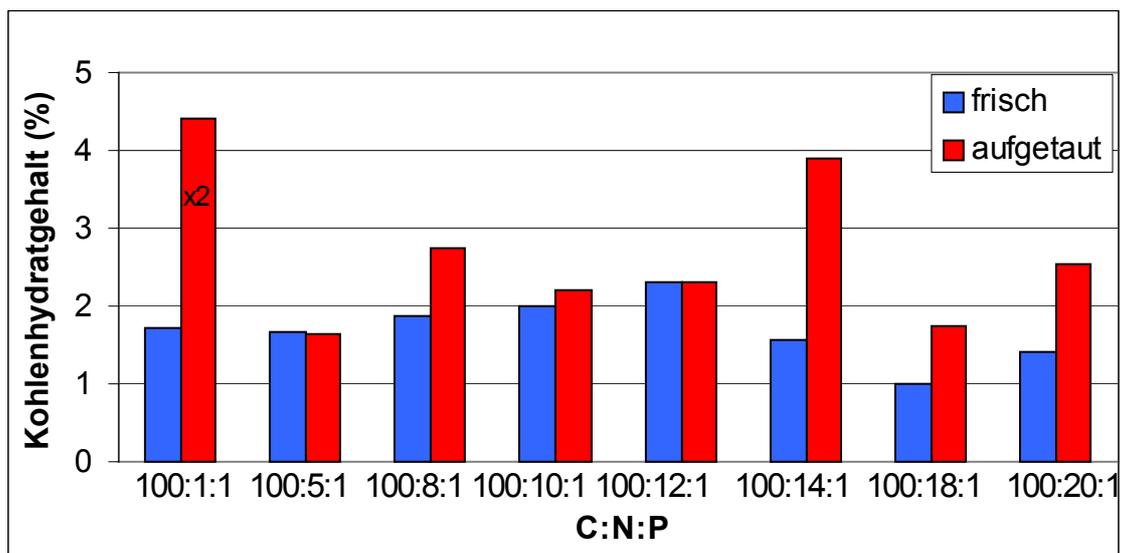
**Abbildung 64:** Prozentualer Anteil des Protein-Gehaltes in den EPS-Extrakten zum gesamten Proteingehalt im Biofilm-TM (w/w)

Der Verlauf des prozentualen Proteinanteils aus dem „frischen“ Biofilm in den EPS-Extrakten zeigt einen steigenden Verlauf des Proteinanteils bis zum C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 bis 100:14:1 – das Verhältnis von 100:8:1 ausgenommen. Die deutlich unterschiedliche Extrahierbarkeit der Proteine in den einzelnen C:N:P-Verhältnissen könnte auf eine qualitative Veränderung der Proteine in den EPS hindeuten. Wie aus der Abbildung 55 zu den Gehalten an Stickstoff in den EPS-Extrakten hervor-

geht, erhöht sich der Anteil an Stickstoff in den EPS-Extrakten ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1. Wenn dieser erhöhte Stickstoffgehalt in den EPS-Extrakten in die Proteinfraction der EPS eingegangen wäre, sollten die Gehalte an Proteinen in den C:N:P-Verhältnissen ab 100:10:1 bis 100:20:1 wesentlich höher liegen. In der Diskussion wird auf diesen Punkt in Form der Gegenüberstellung des theoretischen und praktischen Proteingehaltes in den EPS-Extrakten eingegangen.

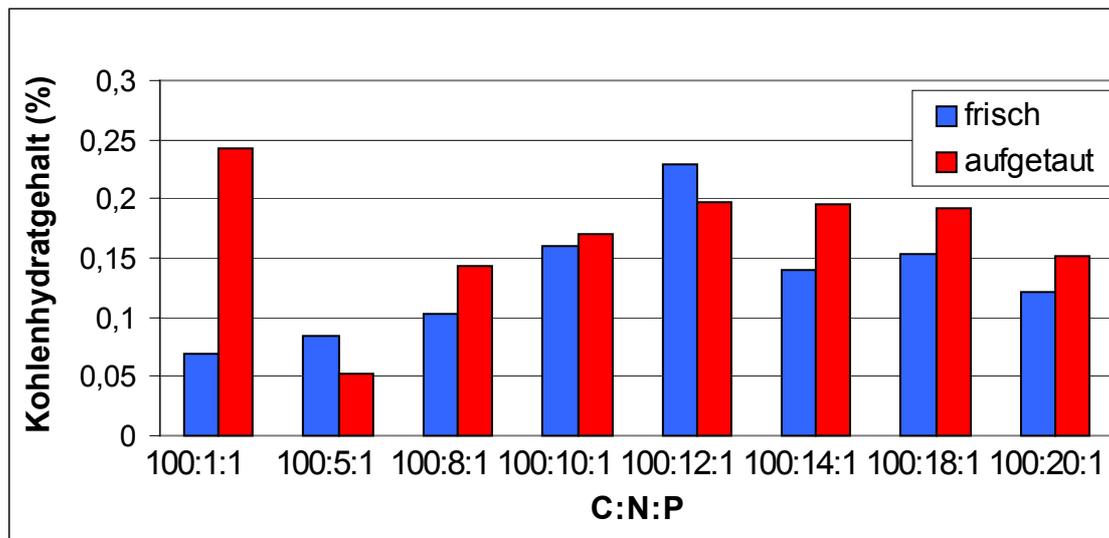
#### 4.3.9 Gehalte an Kohlenhydraten aus den EPS-Extrakten

Die Abbildungen 65 und 66 zeigen die Gehalte an Kohlenhydraten in den EPS-Extrakten, berechnet aus g der Biofilm-TM und Biofilm-FM Einwaage. Der Balken für 100:1:1 „aufgetaut“ wurde um Faktor 2 gestaucht, um die Abbildung übersichtlicher zu halten. Die Messdaten zu den Abbildungen 65 und 66 sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 65:** Kohlenhydratgehalte in den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-TM Einwaage (w/w)

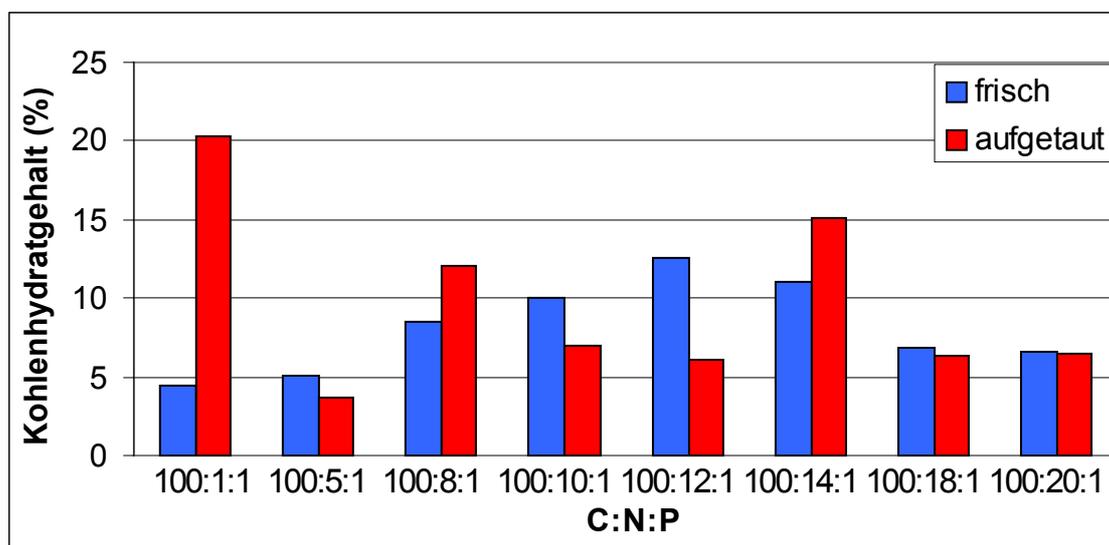
Der Verlauf in Abbildung 65 zeigt bei den Gehalten an Kohlenhydraten im „frischen“ Biofilm eine Zunahme der Gehalte bis zu einem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1. Danach erniedrigt sich der Gehalt an Kohlenhydraten wieder. Die Kohlenhydratgehalte im „aufgetauten“ Biofilm zeigen die Auswirkungen einer möglichen Zellyse, die Gehalte an Kohlenhydraten sind schwankend und zeigen keine abhängige Entwicklung vom C:N:P-Verhältnis an.



**Abbildung 66:** Kohlenhydratgehalte in den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-FM Einwaage (w/w)

Der prozentuale Anteil des Kohlenhydratgehaltes in den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-FM Einwaage zur CER-Extraktion, zeigt einen gleichmäßigen Anstieg des Kohlenhydratanteils vom C:N:P-Verhältnis 100:1:1 bis 100:12:1, aus dem „frisch“ gemessenen Biofilmen. Die Entwicklung in den „aufgetauten“ Biofilmen ist damit vergleichbar, wenn die Verhältnisse von 100:1:1 und 100:14:1 ausgenommen werden.

Abbildung 67 zeigt den prozentualen Anteil des Kohlenhydratgehaltes in den EPS-Extrakten am gesamten Kohlenhydratgehalt im Biofilm-TM. Die Messdaten zur Abbildung 67 sind im Anhang aufgeführt.



**Abbildung 67:** Prozentualer Anteil der Kohlenhydrate in den EPS-Extrakten an den Gehalten der Kohlenhydrate im Biofilm-TM (w/w)

Der Verlauf der Kohlenhydratanteile aus dem Biofilm „frisch“ zeigt einen Anstieg der extrahierten Kohlenhydrate bis zu einem Verhältnis von 100:12:1. Danach fällt der extrahierte Anteil bei den C:N:P-Verhältnissen von 100:18:1 und 100:20:1 wieder deutlich ab. Die Extrahierbarkeit der Kohlenhydrate folgt in etwa den Gehalten der Gesamt-Kohlenhydratgehalte im Biofilm-TM.

Der Verlauf des Kohlenhydratgehaltes aus dem Biofilm „aufgetaut“ zeigt den möglichen Einfluss einer Zellyse und lässt keinen Bezug zum C:N:P-Verhältnis erkennen.

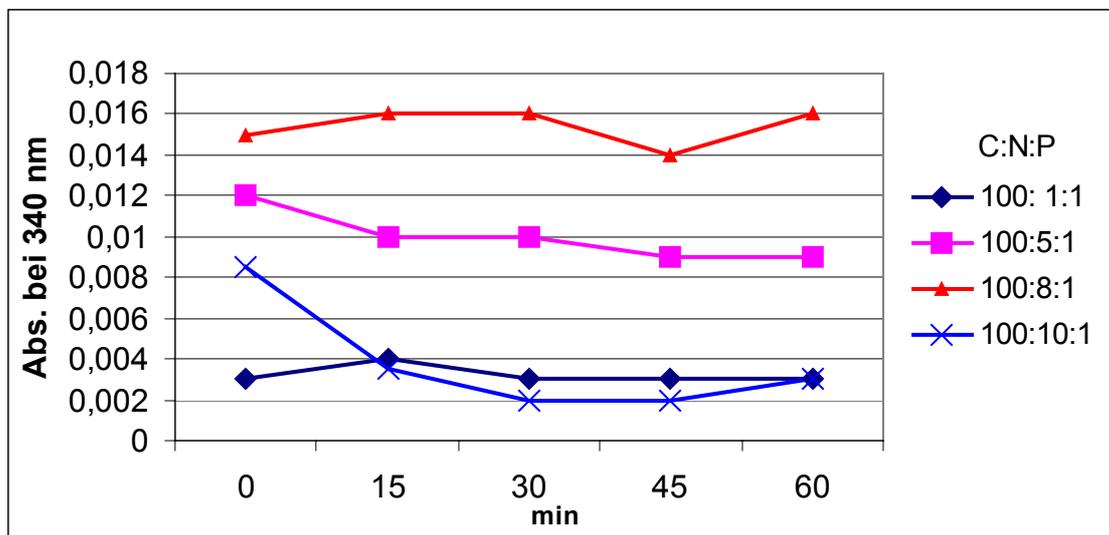
#### 4.3.10 Gehalte an Uronsäuren aus den EPS-Extrakten

Aus vier EPS-Extrakten von „aufgetauten“ Biofilmen und vier von „frischen“ Biofilmen wurde der Gehalt an Uronsäuren gemessen. Die Ergebnisse waren alle negativ. Auf mögliche Gründe für diese Ergebnisse wird in der Diskussion eingegangen.

#### 4.3.11 Ergebnisse zum Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Aktivitätstest (G6PDH) mit den EPS-Extrakten

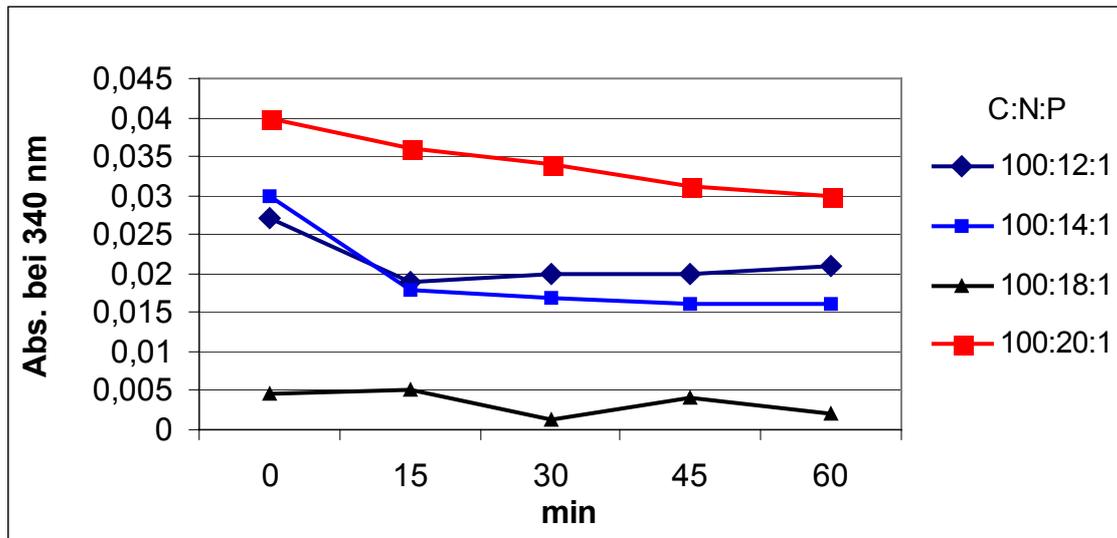
Die EPS-Extrakte waren wie im Kap. 3.5.11 beschrieben mit dem G6PDH-Aktivitätstest gemessen worden.

Die folgenden Abbildungen 68 und 69 zeigen die Ergebnisse (Absorption = Abs.) von 8 „frischen“ EPS-Extrakten und aus 8 „aufgetauten“ EPS-Extrakten aus Biofilmen. Aus jedem Biofilm eines C:N:P-Verhältnisses ist ein EPS-Extrakt mit dem G6PDH-Test untersucht worden.



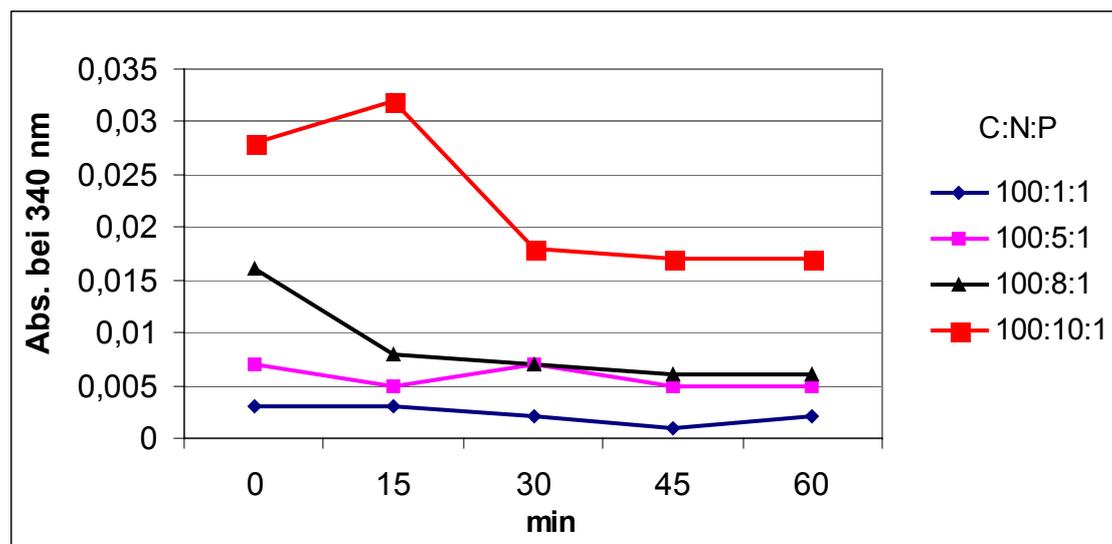
**Abbildung 68:** G6PDH-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten aus den „frischen“ Biofilmen mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 bis 100:10:1

Aus Abbildung 68 lässt sich eine geringe Steigerung der Absorption bei 340 nm nur in den EPS-Extrakten aus den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 und bei 100:8:1 erkennen.



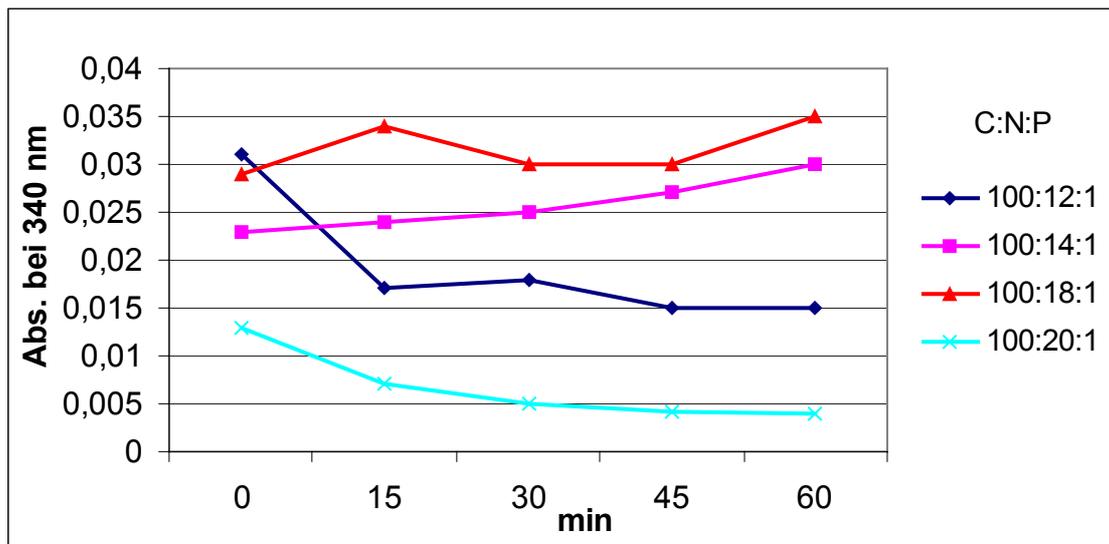
**Abbildung 69:** G6PDH-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten aus den „frischen“ Biofilmen mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:12:1 bis 100:20:1

Aus den Verlaufskurven in Abbildung 69 lässt sich keine Erhöhung der Absorption bei 340 nm erkennen.



**Abbildung 70:** G6PDH-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten aus den „aufgetauten“ Biofilmen mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 bis 100:10:1

Aus Abbildung 70 ist eine mögliche Enzymaktivität aus den EPS-Extrakten von 100:5:1 bei 340 nm zu erkennen.



**Abbildung 71:** G6PDH-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten aus den „aufgetauten“ Biofilmen mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:12:1 bis 100:20:1

Aus der Abbildung 71 sind geringe Steigerungen der Absorption in den C:N:P-Verhältnissen von 100:14:1 und 100:18:1 zu erkennen.

## 5 Diskussion

### Die Biofilmreaktoranlage

Die Ergebnisse aus den Versuchsläufen mit unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen machen deutlich, dass die Reaktoranlage in ihrer Auslegung für die reproduzierbare, quantitative Bildung von Biofilmen gut geeignet ist. Dadurch ist es in dieser Arbeit erreicht worden, eine Biofilmreaktoranlage zu planen, aufzubauen und zu betreiben, mit dem Biofilme reproduzierbar gebildet werden können. Die Reproduzierbarkeit ist bei den hier dargelegten Untersuchungen auch dadurch nachgewiesen, dass die Ergebnisse der jeweiligen C:N:P-Verhältnisse gut miteinander vergleichbar sind. Ein Beleg dafür sind die Gehalte der unterschiedlichen Fraktionen des Biofilms und deren tolerierbaren Abweichungen der Messergebnisse gleicher C:N:P-Verhältnisse, z. B. Wassergehalte, Erträge an Biofilm, Kohlenstoff-, Sauerstoff-, Wasserstoff-, Phosphorgehalte u. a.

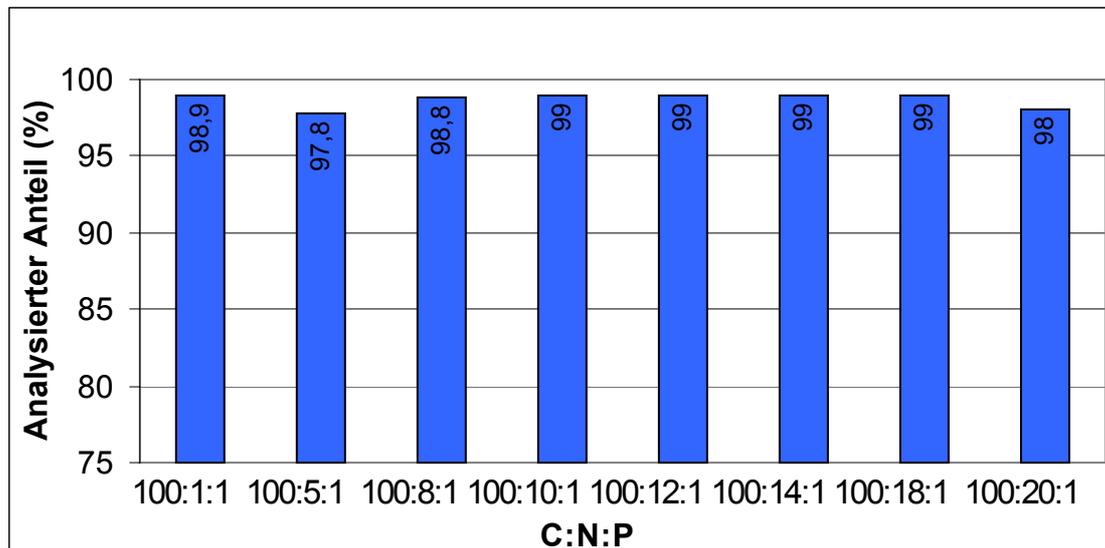
Mit dieser Anlagenkonfiguration wird es möglich sein, auch zukünftig unterschiedliche Fragestellungen bezüglich Biofilme zu untersuchen. Darunter fällt z. B. der biologische Abbau von Frachten aus realen Abwässern – dabei kann der aerobe als auch der anaerobe Abbau in der Anlage durchgeführt werden. Außerdem könnten z. B. Xenobiotika auf ihre biologische Abbaubarkeit durch Biofilme untersucht werden. Gerade dieser Bereich zeigt viele Möglichkeiten auf. Bisher wurden Xenobiotika in standardisierten, planktonisch angelegten Versuchen auf ihre biologische Abbaubarkeit untersucht. Diese Ergebnisse haben Einfluss auf die gesetzgeberischen Reaktionen in der Anwendung und Behandlung der Xenobiotika. Solche Untersuchungen sollten auf Biofilme bezogen werden, da in der Umwelt die Mikroorganismen zum Großteil in Biofilmen organisiert sind und nur im geringeren Maße in planktonischen Systemen.

Auch können in der Reaktoranlage Versuche zur Frachtenreduzierung durch parallele Nitrifikation, Denitrifikation in Abwässern (Helmer et al., 1999), oder die Erprobung von biofilmvermeidenden Substanzen, Biokorrosion u. a. durchgeführt werden.

Die EPS sind ein weiteres Untersuchungsfeld. Mit der hier entwickelten Anlagenkonfiguration ist es möglich, quantitativ ausreichend Biofilme zu produzieren, damit die geforderten Mengen für die CER-Extraktion (ca. 2 g TS) zur Verfügung stehen. Dadurch ergibt sich die Möglichkeit, Einflussgrößen auf die Bildung der EPS systematisch zu untersuchen. Sutherland, 2001a geht auf das Problem der mangelnden Verfügbarkeit von EPS ein.

### Summe der analytisch erfassten Biofilm-TM Zusammensetzung

Abbildung 72 zeigt die prozentuale Erfassung aller analysierten Biofilm-TM Fraktionen aus den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen. Der Bezug ist qualitativ und bezieht sich jeweils auf ein Gramm Biofilm-TM. Die Summe setzt sich aus den Einzelfraktionen Kohlenstoff<sub>org.</sub>, Stickstoff, Wasserstoff, Sauerstoff, Metalle und Phosphor zusammen.



**Abbildung 72:** Summe der analytisch erfassten Zusammensetzung aus dem Biofilm-TM (w/w)

Die in Abbildung 72 dargestellten Summen erreichen Werte von 97,8-99%. Die einzelnen Fraktionen reichen aber zur Beschreibung von Änderungen im Biofilm durch die verschiedenen C:N:P-Verhältnisse nicht aus. Die organische Kohlenstofffraktion wurde weiter auf ihre Kohlenhydrat- und Proteingehalte hin untersucht. Die Einflussnahme des Stickstoffanteils auf diese Fraktionen des Biofilms konnte dadurch deutlich gemacht werden (s. unten).

Die in dieser Arbeit an verschiedenen Biofilmen durchgeführte EPS-Analytik geht noch einen Schritt weiter und zeigt die Auswirkungen des unterschiedlichen Stickstoffangebotes auf die Schlüsselfraktion von Biofilmen, die EPS. Bei der EPS-Analytik besteht die Schwierigkeit, dass die Trennung noch nicht ausreichend ist. Neben einer möglichen Zellyse der Mikroorganismen durch die Methode an sich, können nur Teile der EPS aus der Biofilmmatrix extrahiert werden (s. unten). Dies macht die Zuordnung von Einflussgrößen durch die unterschiedlichen Stickstoffgehalte im synthetischen Medium auf einzelne organische Verbindungen schwierig. Ein Schritt zu Verbesserung der Trennmethode könnte es sein, vor der Behandlung mit CER, den zu fraktionierende Biofilm mit dem Ultra Turrax zu behandeln, um die Matrix des Biofilms mechanisch aufzuschließen. Dadurch könnte ein höherer Wirkungsgrad der CER-Methode erreicht werden.

Durch die Behandlung des Biofilms mit dem Ultra Turrax konnte keine Zerstörung der Mikroorganismen nachgewiesen werden. Dadurch wird ausgeschlossen, dass durch die Homogenisierung des Biofilms mit dem Ultra Turrax intrazelluläre Bestandteile der Mikroorganismen in die EPS-Extrakte gelangen.

### **Erträge an Biofilm-FM und Biofilm-TM (s. Kap. 4.1.1)**

Wie aus den Abbildungen in Kap. 4.1.1 zu erkennen ist, nimmt der Ertrag an Biofilm-TM mit zunehmendem Stickstoffgehalt zu. Die Abbildung zum Verlauf des Biofilm-FM zeigt hingegen einen Anstieg bis zum Verhältnis von ca. 100:12:1 (das Verhältnis von 100:5:1 ausgenommen). Bei höheren Verhältnissen fällt der quantitative Ertrag des Biofilm-FM wieder ab. Die Biofilm-TM Erträge bleiben ab einem Verhältnis von 100:12:1 in einem konstanten Bereich. Der unterschiedliche Verlauf in den Biofilm-TM und Biofilm-FM Abbildungen ab 100:10:1 ist durch den abnehmenden Wassergehalt bedingt. Wie aus den Analysen der Stickstoffgehalte im Restwasser der Versuchsläufe hervorgeht (s. Kap. 4.1.4), ist ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 ein Stopp der Stickstoffaufnahme zu beobachten. Der Verlauf in der Biofilm-FM Abbildung zeigt dennoch weitere Änderungen an. Die Biofilme haben ab einem C:N:P-Verhältnis von ca. 100:12:1 deutlich weniger Wasser aufgenommen.

Neben den weiteren Untersuchungen der einzelnen Stofffraktionen muss auch der Einfluss der Scherkräfte auf diese Änderungen berücksichtigt werden. Der physikalische Einfluss von Scherkräften kann Auswirkungen auf den Biofilm haben. Der erhöhte Druck innerhalb des Biofilmreaktorsystems und die Durchflussgeschwindigkeit kann dazu beigetragen haben, dass ein Biofilm mit höherer Dichte entwickelt wurde – abhängig vom verfügbaren Stickstoffgehalt. Dieser dichtere Biofilm könnte den Mikroorganismen besseren Schutz bieten mit Auswirkungen auf die Wasserverfügbarkeit. Stoodley et al. (1999) setzte bei seinen Untersuchungen eine definierte Mischpopulation aus vier unterschiedlichen Gram-negativen Mikroorganismen ein und zeigt den Einfluss von Scherkräften und von Nährstoffen auf die Morphologie der Biofilme.

Auch van Loosdrecht et al. (1995) weist auf den Einfluss der Scherkräfte auf die Dichte in Biofilmen hin. Demnach entwickelten Nitrifikanten, unter ansonsten gleichen Reaktorbedingungen, durch veränderte Scherkräfte und Temperaturbedingungen einen dichteren Biofilm als heterotrophe Mikroorganismen.

### **Wassergehalte (s. Kap. 4.1.2)**

Die Bindung von Wasser ist eine sehr wichtige physikalisch-chemische Eigenschaft von Biofilmen und anderen mikrobiellen Aggregaten (Schmitt u. Flemming, 1999). Die Angaben über den Wassergehalt in Biofilmen sind in der Literatur unterschiedlich. Es werden Wassergehalte in Biofilmen bis ca. 97% angeführt (Zhang et al., 1998). Sutherland (2001a) und Flemming u. Wingender (2000b) führen mangelnde Informationen über die Wassergehalte, bzw. über die Wasserdiffusion in Biofilmen/EPS an.

Die in dieser Arbeit gebildeten und untersuchten Biofilme zeigen Wassergehalte von 81-98%. Der unterschiedliche Wassergehalt kann nur durch die unterschiedliche Zugabe von Stickstoff in den C:N:P-Verhältnissen ursächlich gewesen sein, da ansonsten alle anderen Parameter konstant blieben. Aus den Ergebnissen ist deutlich erkennbar, dass der zum Biofilmaufbau zur Verfügung gestellte Stickstoff die Wassergehalte des Biofilms maßgeblich beeinflusste.

Unterschiedliche Konsistenzen des Biofilms – auch aufgrund der unterschiedlichen Wassergehalte – waren bereits bei der Homogenisierung der geernteten Biofilme (s. Kap. 3.2.4) auffällig. Biofilme mit einem niedrigen Stickstoffgehalt - C:N:P von 100:1:1 und Wassergehalte von ca. 98% - hatten eine deutlich andere Konsistenz. Sie können mit dem Term „dickflüssig“ beschrieben werden. Der visuelle Eindruck und die mechanische Verarbeitungsfähigkeit des Biofilms mit steigenden C:N:P-Verhältnissen bis 100:20:1 und Wassergehalten von 81% hatten eine „pastöse“

Konsistenz. Eine graduelle Einteilung der Konsistenz der Biofilme aus den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen ist unter Kap. 4.1.2 dargestellt.

Die ermittelten Wassergehalte aus den Untersuchungen zeigen, dass eine Abhängigkeit zwischen der Stickstoffverfügbarkeit zum Aufbau des Biofilms und dem Wassergehalt des resultierenden Biofilms besteht. Die EPS spielen bei der Wasserhaltekapazität eine maßgebliche Rolle. Durch die Steigerung des Stickstoffangebotes ist anzunehmen, dass die EPS in ihrer Zusammensetzung verändert worden sind. Wolfaardt et al. (1999) bestätigt einen Einfluss der EPS-Bildung durch Mikroorganismen zur Vermeidung der Austrocknung. Er sieht aber die potentielle Rolle der EPS in natürlich vorkommenden mikrobiellen Gemeinschaften, bezüglich des Wassergehaltes, noch als unklar an und räumt ein, dass auch andere Mechanismen eine Rolle spielen können.

Aus den in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen und den Ergebnissen wird deutlich, dass bei Biofilmuntersuchungen zwischen der Biofilm-Trockenmasse und deren qualitativen Bestandteilen und der Biofilm-Feuchtmasse unbedingt analytisch unterschieden werden muss. Dies wird in dieser Arbeit durch die Darstellung der Ergebnisse gezeigt, die nach Biofilm-TM und Biofilm-FM unterschieden wurden. Aus den Abbildungen sind in den Fraktionen deutliche Unterschiede zwischen den Entwicklungen der Biofilm-TM-Gehalte und Biofilm-FM-Gehalte zu erkennen. Bei einer einseitigen Betrachtungsweise, das heißt, nur die Werte im Biofilm-TM oder nur die Werte im Biofilm-FM, wären z. B. die Auswirkungen der unterschiedlichen Wassergehalte durch die unterschiedlichen Stickstoffgehalte in den synthetischen Medien auf die Biofilme nicht erkennbar gewesen. Die Betrachtungsweise gilt auch für die EPS-Analytik, da sich die Gründe für die Veränderungen im Wassergehalt der Biofilme in der EPS-Zusammensetzung widerspiegeln.

### **Organischer Kohlenstoff in den Biofilmen (s. Kap. 4.1.3)**

Der für den Aufbau von Biofilm angebotene organische Kohlenstoff war aus allen synthetischen Medien immer in gleicher Menge verfügbar. Der organische Kohlenstoff im resultierenden Biofilm-TM war mit einem Mittelwert von  $46,9\% \pm 0,7$  konstant (s. Kap. 4.1.3). Diese Ergebnisse zeigen, dass die Mikroorganismen den zur Verfügung gestellten organischen Kohlenstoff, unabhängig vom Stickstoffgehalt des synthetischen Mediums, in alle gebildeten Biofilmen zu gleichen Teilen für den Aufbau des Biofilms genutzt haben.

Bei Flemming (1995c) wurde aus einem mikrobiellen Belag auf einer Polyamidmembran, also aus einem realen Biofilm, ein organischer Kohlenstoffgehalt von 47,7% ( $46,9\% \pm 0,7$ ) aus der Trockensubstanz gemessen. Der Wasserstoffgehalt in diesem Biofilm betrug 6,3% ( $7\% \pm 0,19$ ), der Sauerstoffgehalt 32,2% ( $35,1 \pm 1,11$ ) und der Phosphorgehalt 0,6% ( $1,05 \pm 0,14$ ) – in Klammern gesetzt sind die durchschnittlichen Werte aus den in dieser Arbeit untersuchten Biofilmen. Ein Vergleich zwischen den Werten aus dem realen Biofilm und den Biofilmen, die in dieser Arbeit analysiert wurden, zeigt ähnliche Werte. Bei den angegebenen Ergebnissen des organischen Kohlenstoffes, Sauerstoff, Wasserstoff und Phosphor ist der Wassergehalt nicht ausschlaggebend, da die Analysen aus der Trockensubstanz gemessen wurden. Der Stickstoffgehalt in der Trockensubstanz des Biofilms auf der Polyamidmembran betrug 7,7%, der Wassergehalt 75%. Der Wassergehalt und der Stickstoffgehalt der Biofilme aus dieser Arbeit können nicht direkt mit den Werten aus dem Biofilm auf der Polyamidmembran verglichen werden, da sie von der Stickstoffverfügbarkeit in den C:N:P-Verhältnissen abhängig sind. Wird aber nur der Wassergehalt von 75% im realen Biofilm betrachtet, können Vergleiche zu den Biofilmen aus höheren C:N:P-Verhältnissen gezogen werden, die bei 100:20:1 ein Wassergehalt von 81% und ei-

nen Stickstoffgehalt von  $7,9\% \pm 1,2$  zeigen. Diese Vergleiche zu Analysen aus realen Biofilmen und die ähnlichen Ergebnisse zeigen, dass die Biofilmreaktoranlage und das angelegte Konzept dieser Arbeit, Ergebnisse mit realem Bezug haben.

Die Gesamtgehalte an organischen Kohlenstoff zeigen aber nicht die Veränderungen in anderen organischen Fraktionen des Biofilms an. Darunter fallen als größte Fraktion die Gehalte an Kohlenhydraten und Proteinen. Diese Fraktionen haben sich durch die unterschiedlichen Stickstoffgehalte im synthetischen Medium der resultierenden Biofilme verändert. Darauf wird im Folgenden noch eingegangen.

Auch die organische Fraktion der extrahierten EPS hat sich durch die unterschiedlichen Stickstoffgehalte in den Ausgangsmitteln verändert. Aus Gründen der bereits beschriebenen Schwierigkeiten mit der EPS-Extraktion, kann aber nicht bestimmt werden, ob die quantitative Änderung durch die unterschiedlichen Stickstoffgehalte, oder durch eine veränderte EPS-Zusammensetzung, oder beides, hervorgerufen wurde.

Die CER-Extraktion beruht in ihrer Wirkung auf der Komplexbildung mit zweiwertigen Kationen. Keiding u. Nielsen (1997) heben in ihrer Untersuchung an Belebtschlamm (Flemming et al., 2000c), die Bedeutung von Calcium zur Komplexbildung von EPS-Polymeren besonders hervor. Wie aus denen in dieser Arbeit festgestellten Ergebnissen der Metallmessungen aus dem Biofilm-TM hervorgeht, verringern sich die Gehalte an Calcium mit zunehmendem Stickstoffgehalt im synthetischen Medium. Dadurch wird die Umkomplexierung des Calciums beeinträchtigt. Diese Zusammenhänge werden durch die Messungen der Trockensubstanz aus den EPS deutlicher - je höher der Stickstoffanteil im synthetischen Medium war, desto geringer wurden die Erträge an Trockensubstanz in den EPS-Extrakten. Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass der vertieften Strukturaufklärung der EPS aus Mischpopulationen noch Grenzen gesetzt sind (Sutherland 2001a). Diese Grenzen werden erst durch eine höhere Ausbeute an EPS aus der Biofilmmatrix verbessert. Nach Nielsen u. Jahn, 1999 kann damit gerechnet werden, dass zwischen 32-97% der EPS mit der CER-Methode nicht extrahiert und damit nicht analysiert werden können.

#### **Stickstoffgehalte im Biofilm (s. Kap. 4.1.4)**

Stickstoff war die einzige variable Nährstoffzugabe im synthetischen Medium. Die Veränderungen des Stickstoffgehaltes in den synthetischen Medien reflektierten sich in den Fraktionen des Biofilms. Eine dieser Auswirkungen wurde bereits beim Wassergehalt beschrieben.

Die gesteigerte Zugabe von Stickstoff zeigte im resultierenden Biofilm-TM einen qualitativ maximalen Stickstoffgehalt bei C:N:P von 100:10:1 und 100:12:1. Bei höheren Stickstoffgehalten im synthetischen Medium verringerte sich der Stickstoffgehalt im Biofilm-TM wieder. Die Beobachtung der geringeren Stickstoffaufnahme - trotz höherer Stickstoffverfügbarkeit im synthetischen Medium - wird durch die Messungen von Ammonium-N im Restwasser der Versuchsläufe deutlicher. Die Ergebnisse der Messungen zeigen, dass die Konzentrationen an Ammonium-N, die über dem Verhältnis von 100:10:1-100:12:1 liegen, im Restwasser verbleiben und nicht in den Biofilm aufgenommen werden. Die Nicht-Aufnahme des noch zur Verfügung stehenden Stickstoffs kann auch durch eine organische Kohlenstofflimitierung bedingt sein. Auffallend ist jedoch, dass der Biofilm bei höheren C:N:P-Verhältnissen als 100:10:1 dennoch seine Wassergehalte verringert. Zudem ändern sich bei den C:N:P-Verhältnissen über 100:10:1-100:12:1 auch die Gehalte an Proteinen und Kohlenhydraten. Diese Entwicklung könnte durch genotypische Reaktionen der Mikroorganismen erklärbar sein. Der noch zur Verfügung bleibende Stickstoff im wässrigen Medium könnte andere Bindestrukturen innerhalb des Biofilms, bzw. in den EPS

durch genotypische Reaktionen der Mikroorganismen, hervorrufen haben. Die Reaktion durch Mikroorganismen auf sich ändernde Milieubedingungen ist bekannt und werden von Decho (1999) beschrieben.

Eine Auswirkung von Stickstofflimitierung wird durch die Gehalte an Kohlenhydraten im C:N:P-Verhältnis von 100:1:1 deutlich. Abbildung 42 zeigt den hohen Anteil an Kohlenhydraten im Biofilm-TM. Hoffman u. Decho (1999) beschreiben eine erhöhte Bildung von Kohlenhydraten im Biofilm, aber nur bedingt durch eine Stickstofflimitierung. Der Vergleich des Kohlenhydratgehaltes bei C:N:P von 100:1:1 im Vergleich zu den höheren C:N:P-Verhältnissen zeigt, dass sich ein hoher Kohlenhydratgehalt im Biofilm-TM auch in höheren C:N:P-Verhältnissen wiederfindet. Aus der Abbildung geht somit nicht nur hervor, dass bei niedrigen Stickstoffgehalten der Kohlenhydratanteil hoch sein kann, sondern ebenso bei hohen Stickstoffgehalten.

Die Ergebnisse des C:N:P-Verhältnis von 100:1:1 zeigen noch eine andere Besonderheit. Zwar sind auch die Gehalte wie der organische Kohlenstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Summe aus Kohlenhydraten und Proteinen etc., in diesem Biofilm vergleichbar zu den anderen Biofilmen aus höheren C:N:P-Verhältnissen. Aber die Aufnahme des zur Verfügung stehenden organischen Kohlenstoffs aus der wässrigen Phase stoppte bei diesem C:N:P-Verhältnis bei ca. 300-400 mg/L – als Resultat der Stickstofflimitierung. Der Stickstoff ist in diesem C:N:P-Verhältnis das Maß für die Entwicklung des Biofilms, als auch für die Aufnahme des organischen Kohlenstoffs. Die Stickstofflimitierung führte somit nicht nur zu einem erhöhten Wassergehalt in den Biofilmen, sondern auch zu einer Nicht-Aufnahme des organischen Kohlenstoffs aus der wässrigen Phase. Für die Praxis bedeutet dies, den Abbau von organischer Phase aus, z. B. Abwässern, mit genügend und verfügbarem Stickstoff durchzuführen.

Durch ein Übermaß an verfügbarem Stickstoff in höheren C:N:P-Verhältnissen wurde der Aufbau des Biofilms verändert – er wurde dichter. Die höhere Dichte des Biofilms hat zu einem veränderten Wassergehalt des Biofilms in den unterschiedlichen C:N:P-Versuchsläufen beigetragen. Einen möglichen Einfluss von Stickstoff auf die Dichte von Biofilmen wird von Wolfaardt et al. (1994) gegeben. Wolfaardt et al. (1994) führten Untersuchungen mit dem konfokalen Laser Mikroskop durch. Dabei wurde bei höheren Konzentrationen an TSB (Tryptone-Soya-Broth – d. h. viel zur Verfügung stehender Stickstoff) eine höhere Dichte des Biofilms beobachtet als es bei niedrigen Konzentrationen an TSB.

#### **Ammonium-N im Restwasser der synthetischen Medien (s. Kap. 4.1.4)**

Die Gehalte an Ammonium-N im synthetischen Medium wurden bis zu einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 fast vollständig aufgenommen. Ab dem Verhältnis von 100:12:1 verbleiben die Zusätze, die über dem Verhältnis von 100:10:1 liegen, im Restwasser. Die Ammonium-N Zugaben über einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 wurden nicht aufgenommen. Auffallend dabei ist, dass andere Biofilmfraktionen wie Wassergehalte, Kohlenhydratgehalte, Proteingehalte, Calciumgehalte etc. weiter Änderungen unterliegen. Eine Erklärung für diese Entwicklungen könnten genotypische Reaktionen der Mikroorganismen sein. Die Mikroorganismen nehmen ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 kein Ammonium-N mehr auf, aber das Ammonium-N ist dennoch in der wässrigen Phase verfügbar – und wirkt sich induktiv auf das Genom der Mikroorganismen aus. Als Reaktion darauf wird die Morphologie des Biofilms verändert – z. B. nimmt der Biofilm mit zunehmenden C:N:P-Verhältnis weniger Wasser auf. Die Verstärkung der Biofilmmatrix wird im geringeren Maße durch biva-

lente, kationische Bindungen bewirkt und die Gehalte an Calcium nehmen mit zunehmenden C:N:P-Verhältnis ab. Die reduzierte Ammonium-N Aufnahme kann möglicherweise auch durch den organischen Kohlenstoff ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 hervorgerufen sein, der dann im Nährstoffangebot limitierende Auswirkungen hat.

#### **Nitrifikanten und Nitrat (s. Kap. 4.1.4)**

In den hier dargestellten Untersuchungen zum Einfluss der unterschiedlichen C:N:P-Verhältnisse auf Biofilme, wurden im Biofilm und in der restlichen wässrigen Phase des synthetischen Mediums keine Nitrifikanten und kein Nitrat nachgewiesen.

Nitrifikanten können sich im Biofilmen ansiedeln (Choi et al., 2001). Die extrem langsame Wachstumsrate von Nitrifikanten und die Konkurrenzsituation zu den heterotrophen Mikroorganismen lässt sie aber erst in älteren Biofilmen auftreten. Bei Ohashi et al. (1995) traten bei einem C:N-Verhältnis von 1,5 (C:N von 100:66) keine Nitrifikanten im Anfangsstadium des Biofilms auf. Ohashi et al. (1995) stellt fest, dass die Anzahl der Nitrifikanten in seiner Laboranlage mit zunehmenden C:N-Verhältnis abnahm.

In dieser Arbeit wurden C:N-Verhältnisse im synthetischen Medium (s. Kap. 3.1.4) von 100 bis 5 (C:N:P-Verhältnis von 100:1:1 und 100:20:1) eingesetzt. Die Versuchsdauer für jeden Versuchslauf von ca. 3 Tagen, ließ ein Auftreten von Nitrifikanten nicht erwarten. Dies schließt nicht die Möglichkeit aus, dass bei längerer Versuchsdauer und mit zunehmendem Alter des Biofilms bei Abbaubersuchen mit Realabwässern, Nitrifikanten in den konkurrenzärmeren, tieferen Bereichen des Biofilm vorkommen können.

Mit der Biofilmreaktoranlage wurden Versuchsläufe über 4 Wochen und mehrmaliger Zugaben des synthetischen Mediums durchgeführt. Nach ca. 9 Tagen konnten visuell anaerobe Bereiche im Biofilmreaktor erkannt werden (s. Kap. 4.1.1).

#### **Wasserstoff im Biofilm (s. Kap. 4.1.5)**

Der Mittelwert des Wasserstoffgehaltes lag in allen Biofilmen (Trockenmasse) bei 7%  $\pm 0,19$ . Die Gehalte blieben konstant wie auch aus dem konstanten Gehalt an organischem Kohlenstoff zu erwarten war. Auswirkungen der unterschiedlichen Stickstoffgehalte im synthetischen Medium sind auf den Gehalt an Wasserstoff im Biofilm-TM nicht zu erkennen. Der Wasserstoffanteil aus einem bereits oben erwähnten, realem Biofilm auf einer Polyamidmembran betragen 6,3% der Trockensubstanz (Flemming, 1995c).

#### **Sauerstoff im Biofilm (s. Kap. 4.1.6)**

Der Mittelwert der Sauerstoffgehalte lag in allen Biofilmen (TM) bei 35,1%  $\pm 1,11$ . Auch diese Gehalte blieben konstant - aus den gleichen Gründen wie bereits oben erwähnt. Eine Einflussnahme der unterschiedlichen Stickstoffgehalte im synthetischen Medium auf die Gehalte an Sauerstoff im Biofilm-TM ist nicht zu erkennen. Der Sauerstoffanteil aus einem oben erwähnten, realen Biofilm auf einer Polyamidmembran betrug 32,2% (Flemming, 1995c).

#### **Phosphor im Biofilm (s. Kap. 4.1.7)**

Phosphor gehörte zu den konstanten Nährstoffzugaben im synthetischen Medium. Das Verhältnis C:P im Ausgangsmedium war immer 100:1 – im resultierenden Biofilm-TM lag das Verhältnis von C:P bei 100:1,9-2,6. Der Gehalt an Phosphor hatte einen Mittelwert von 1,05%  $\pm 0,14$  im Biofilm-TM. Die Werte zeigen die gleiche Entwicklung wie beim organischen Kohlenstoff. Phosphor wurde in allen Biofilmen - un-

abhängig von der Stickstoffzugabe - zu gleichen Teilen für die Bildung des Biofilms aufgenommen. Die Phosphor-Messungen aus den Restwässern der Versuchsläufe bestätigen dies – aus allen synthetischen Medien wurde der Phosphor gänzlich sorbiert. Vergleiche aus einem bereits oben erwähnten realen Biofilm auf einer Polyamidmembran zeigten einen Phosphorgehalt von 0,6% (Flemming, 1995c).

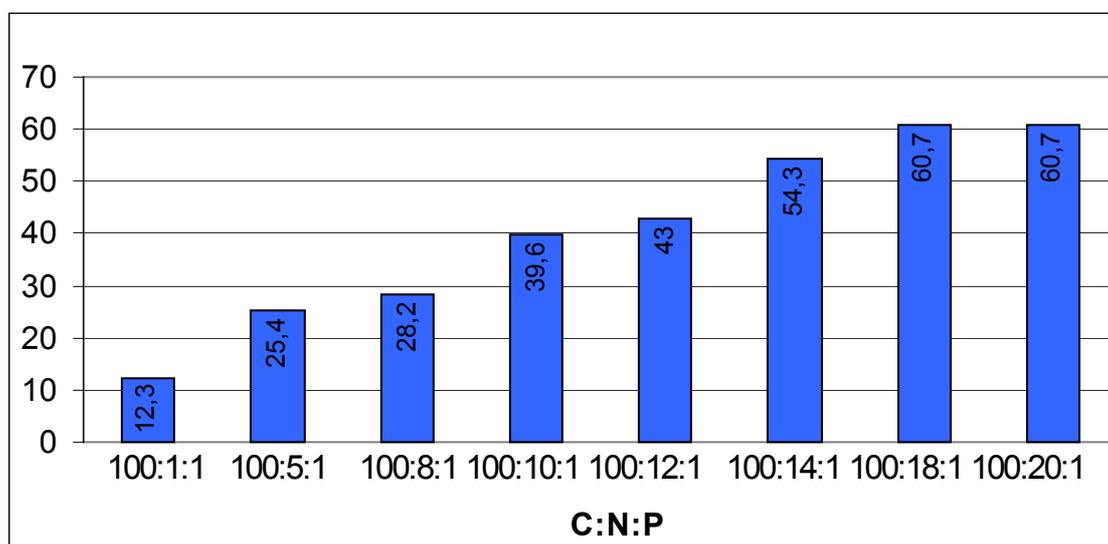
### Metalle, speziell Calcium im Biofilm (s. Kap. 4.1.8)

Bei der Auswertung der gemessenen Metalle wurden die Gehalte an Calcium und vergleichend die Gehalte an Magnesium ausgewertet. Die Gehalte an Magnesium zeigten, wie die anderen gemessenen Metalle, keine erkennbaren Abhängigkeiten bei unterschiedlichen Stickstoffgehalten im synthetischen Medium.

Calcium verknüpft Bestandteile der EPS und wird als das wichtigste zweiwertige Kation für die Verknüpfungen innerhalb der EPS angesehen. Dieses wird z. B. von Örmeci u. Vesilind (2000) beschrieben, die bei ihren Untersuchungen mit synthetischem Belebtschlamm ein Unterbleiben der Flockenbildung nachwiesen, wenn kein Calcium im synthetischen Medium eingesetzt wurde. Yu et al. (2001) stellen in ihrer Untersuchung zum Einfluss der Calcium-Konzentration auf die Bildung von anaeroben Belebtschlamm fest, dass Calcium-Konzentrationen unter 300 mg/L einen positiven und Calcium-Konzentrationen über 600 mg/L einen negativen Einfluss auf die Bildung des Belebtschlammes haben. Die Relation zwischen Stickstoff- und Calciumgehalten wurde in der Arbeit von Yu et al. (2001) aber nicht gezogen. Die Ergebnisse von Yu et al. (2001) zeigen den nicht unwesentlichen Einfluss von Calcium auf Morphologie der Belebtschlamm-Bildung, worauf auch bei Flemming et al. (2000c) hingewiesen wird.

Bei der CER-Extraktion werden die Verknüpfungen in der EPS durch die Umkomplexierung des Calciums an das Austauschharz aufgehoben und die wasserlöslichen Bestandteile der EPS können extrahiert werden. Vor diesem Hintergrund sind die Calciummessungen aus dem Biofilm-TM zu betrachten.

Calcium wurde in allen Versuchsläufen mit konstanten Konzentrationen im synthetischen Medium zugegeben. Die Gehalte im resultierenden Biofilm-TM waren quantitativ nicht gleich. Hier liegt ein deutlicher Unterschied zu anderen Fraktionen wie dem organischen Kohlenstoff, Phosphor, Wasserstoff und Sauerstoff vor. Diese Fraktionen wurden in allen Biofilm-TM zu gleichen Teilen aufgenommen und durch die unterschiedlichen Zugaben von Stickstoff nicht wesentlich beeinflusst.



### **Abbildung 73:** Quotienten aus den Stickstoff/Calcium-Gehalten im Biofilm-TM

Die Gehalte an Calcium im Biofilm-TM nahmen hingegen mit zunehmendem Stickstoffanteil im synthetischen Medium ab. Die Abnahme des Calcium-Gehaltes kann auf eine Änderung der Verknüpfungen in den EPS hinweisen. Mit zunehmender Stickstoffverfügbarkeit wurden die Calcium-Verknüpfungen durch stabilere Verbindungen ersetzt. Dies wird besonders deutlich, wenn die Entwicklungen der Gehalte an Stickstoff im Biofilm-TM mit den Calcium-Gehalten verglichen werden. Der Stickstoff-Gehalt bleibt ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 im Biofilm-TM in etwa gleich (s. Kap. 4.1.4). Die Gehalte an Calcium im Biofilm-TM nehmen nach einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 ab (s. Kap. 4.1.8). Das heißt, dass ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 zwar die Aufnahme von Stickstoff in den Biofilm gleich bleibt, was auch an den Gehalten an Stickstoff im Restwasser zu erkennen ist (s. Kap. 4.1.4), die Calcium-Gehalte werden aber geringer. Dies kann seine Ursache durch andere Bindungsformen im Biofilm/EPS haben. Die Komplexierung mit Calcium in den EPS kann durch andere Bindungsformen, möglicherweise mit Stickstoffbeteiligung, ersetzt worden sein. Die Abbildung 73 zeigt das Verhältnis des Stickstoff-Gehaltes im Biofilm-TM zum Calcium-Gehalt und bestätigt die oben beschriebenen Abläufe bzw. Annahmen.

Eine weitere Bestätigung der obigen Ergebnisse und Annahmen findet sich in den Erträgen der CER-Extraktion. Mit zunehmendem Stickstoffgehalt im synthetischen Medium werden die Erträge an Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten geringer (s. Kap. 4.3.2). Dieses Ergebnis spiegelt sich in den gemessenen, abnehmenden Gehalten an Calcium im Biofilm-TM wieder. Je weniger Calcium in der Biofilm-TM Fraktion gemessen werden konnte, desto geringer fiel der Ertrag an Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten aus. Auch diese Ergebnisse weisen auf eine Änderung der Bindungsstrukturen im Biofilm/EPS, unter Einfluss des steigenden Stickstoffgehaltes, hin. Weiterführende Untersuchungen sind hier notwendig.

#### **Der DOC in den wässrigen Medien der Versuchsläufe (s. Kap. 4.1.9)**

Der Anfangs-DOC von ca. 1.030 mg/L wurde in allen Läufen – ausgenommen die C:N:P-Verhältnisse von 100:1:1 – nach ca. 72 Stunden auf Werte <50 mg/L aus der wässrigen Phase sorbiert. Der in diesen Läufen zur Verfügung stehende organische Kohlenstoff wurde demnach fast vollständig umgesetzt. Die gleichmäßige Sorption des Biofilms wird aus den Gehalten an organischen Kohlenstoff im Biofilm-TM deutlich. Die qualitativen Gehalte an organischem Kohlenstoff wurden bei allen C:N:P-Verhältnissen zu  $46,9\% \pm 0,7$  (s. Kap. 4.1.3) bestimmt.

Dieses Ergebnis wird auch bei den C:N:P-Verhältnis von 100:1:1 erreicht, obwohl der angebotene organische Kohlenstoff in diesen Läufen nicht vollständig aufgenommen wurde. Es verbleiben ca. 300-400 mg/L DOC im Restwasser der entsprechenden Läufe. Die Ergebnisse aus den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 in den Versuchsläufen zeigen den Einfluss der Stickstofflimitierung an.

Im synthetischen Medium mit einem C:N:P-Verhältnis von 100:1:1 wird nur soviel Kohlenstoff verbraucht, wie Stickstoff zur Verfügung stand. Das qualitative Resultat war dennoch, bezüglich des organischen Anteils im Biofilm-TM, das gleiche wie in den anderen C:N:P-Verhältnissen. Die Auswirkungen der Stickstofflimitierung zeigen auch die BSB-Bestimmungen (s. Kap. 4.2.6). Bei einem Verhältnis von C:N:P von 100:1:1 wird auch hier der angebotene Kohlenstoff im planktonischen Versuch nicht voll oxidiert werden. Für die Praxis der biologischen Abwasserreinigung bedeutet dies, dass der Stickstoff der limitierende Faktor für den Abbau der organischen Fracht sein kann.

### **Kolonienzahlbestimmung der Mikroorganismen als kolonienbildende Einheiten (KBE) und mit dem Fluoreszenzmikroskop (s. Kap. 4.2.2 und Kap. 4.2.1)**

Der Vergleich zwischen den Dichten an Mikroorganismen im Biofilm aus der fluoreszenzmikroskopischen Auszählung und der Auszählung als KBE zeigt Unterschiede. Die KBE-Auszählungen liegen alle im Bereich von  $10^7$  Mikroorganismen mg/Biofilm-FM. Die Auszählung mit dem Fluoreszenzmikroskop erreichen diese Dichten nur bei den C:N:P-Verhältnissen von 100:8:1 und 100:18:1. Die Auszählungen mit dem Fluoreszenzmikroskop sind nur aus den Biofilmen gemacht worden, aus denen auch die EPS bestimmt wurde – also acht „frische“ Biofilme, die nicht eingefroren waren und acht „aufgetaute“ Biofilme, die über längere Zeit bei  $-18^\circ\text{C}$  eingefroren waren.

Werden die Dichten aus den Verhältnissen von 100:8:1 und 100:14:1 aus der Betrachtung gezogen, liegen die Dichten an Mikroorganismen aus den „aufgetauten“ Biofilmen und den „frischen“ Biofilmen in vergleichbaren Größen vor. Dies war auch zu erwarten, da die Messmethode darauf beruht, dass das fluoreszierende Acridinorange mit DNA und RNA reagiert und die Reaktionsprodukte unter dem Fluoreszenzmikroskop visuell auszählbar sind. Bei Azeredo et al. (1999) wird darauf hingewiesen, dass in juvenilen Biofilmen (dort 10 Tage) kaum damit zu rechnen ist, DNA im extrazellulären Raum des Biofilms zu finden. Dies kann auf die noch nicht eingetretene Autolyse der Mikroorganismen zurückzuführen. Gleiches gilt auch für die in dieser Arbeit untersuchten Biofilme.

Die Dichte der Mikroorganismen im Biofilm sollten mit der Fluoreszenzmethode erwartungsgemäß höher liegen als die Auszählungen mit KBE. Bei Kalmbach et al., 2000 wird die Kultivierbarkeit mit KBE von Mikroorganismen aus oligotrophen Bedingungen in einem Bereich von 0,01-1% angegeben. Oligotrophe Bedingungen lagen in den durchgeführten Untersuchungen dieser Arbeit nicht vor.

Die Bestimmung der Dichte an Mikroorganismen im Biofilm-FM zeigten mit der KBE-Methode höhere Werte. Die Dichte an Mikroorganismen erhöhte sich mit zunehmendem C:N:P-Verhältnis bis auf 100:12:1. Bei 100:12:1 wurde ein vielfaches an Mikroorganismen im Biofilm-FM gemessen, als bei allen anderen C:N:P-Verhältnissen. Die Dichten an Mikroorganismen verringerten sich nach dem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 wieder bei steigenden C:N:P-Verhältnissen. Dieses Ergebnis ist erstaunlich und zeigt, dass die Dichten an Mikroorganismen vom C:N:P-Verhältnis abhängig sein können. Das C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 ist nach den Ergebnissen der Dichtebestimmung mit KBE bevorzugt, was die Anzahl an Mikroorganismen betrifft. Worauf diese deutlich höhere Dichte bei C:N:P von 100:12:1 zurückzuführen ist, kann nur angenommen werden. Dieses Nährstoffverhältnis kann für die Reproduktion sehr vorteilhaft sein und die Mikroorganismen reagieren darauf durch erhöhte Reproduktionsraten. Möglicherweise sind aber auch Einflüsse von Botenstoffen beteiligt, wie sie bereits durch die AHL's bekannt sind. Über die Rolle von Botenstoffen müssten weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

Der in dieser Arbeit mit den EPS-Extrakten der C:N:P-Verhältnisse von 100:12:1 durchgeführte Nachweis von kurz- und langkettigen AHL's verlief negativ, was aber auch andere Gründe als das Nicht-Vorhandensein von AHL's haben kann (s. Kap. 4.3.7).

Diese Ergebnisse können einen Hinweis auf die Nutzung von Biofilmen haben - speziell für die biologische Abwasseraufbereitung. Beim gezielten Aufbau von Biofilmen zur Abwasseraufbereitung könnte das C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 zu einer höheren Dichte im Biofilm führen, was den Vorteil einer effektiveren Reduzierung der Frachten aus den Abwässern hat.

Die höheren Dichten, die mit der KBE-Methode gemessen wurden, sind statistisch ausgewertet worden. Eine Verfälschung der Ergebnisse bei der Bestimmung durch die Fluoreszenzmethode ist annehmbarer als die Messung der Dichten mit KBE – wenn die Dichten durch die KBE-Bestimmung so deutlich höher sind.

Ein Grund für die hohen Dichten an Mikroorganismen aus der KBE-Methode könnte in dem korrelierenden Nährstoffangebot für die Mikroorganismen im synthetischen Medium der Versuchsläufe und im verwendeten Agar liegen. Im Agar (Standard I Nähragar, Merck 7881) wurde Glucose als alleinige organische C-Quelle angeboten. Im synthetischen Medium wurde Saccharose (Disaccharid aus Glucose und Fruktose) angeboten. Die Artenvielfalt der Mikroorganismen im Biofilm-FM waren an die Glucose als organische C-Quelle bereits adaptiert. Dadurch waren sie in der Lage, auf dem angebotenen Agar in ihrer Mehrzahl Kolonien auszubilden. Bei Untersuchungen zum Einfluss von Nährstoffkonzentrationen (Glucose als organische Kohlenstoffquelle) auf die Biofilmstruktur von Stoodley et al. (1999) wurden die Dichten der Mikroorganismen im Biofilm auch durch KBE bestimmt.

Eine vollständige Identifizierung des Inokula wäre in einem verfügbar zeitlichen Rahmen nicht möglich. Nach heutigem Wissen sind ca. 5.000 unterschiedliche Mikroorganismenarten bekannt und bestimmbar - nach Hochrechnungen *wurden* ca. 20.000 differenzierbare Arten als möglich erachtet. Nach neueren Schätzungen sind ca. 15-20 Millionen unterschiedliche Arten zu erwarten. Die Summe der anderen, nicht zu den Mikroorganismen gerechneten Organismen, liegt bei etwa 2 Millionen (Nielsen, 2001).

#### **Vergleichsmessung zwischen der Homogenisierung mit dem Ultra Turrax und dem Handhomogenisator (s. Kap. 4.2.2)**

Die hohen Scherkräfte des Ultra Turrax führten nicht zu einer messbaren Inaktivierung der Mikroorganismen im Biofilm-FM. Auszählungen zeigten gleiche und teilweise höhere KBE aus der Homogenisierung mit dem Ultra Turrax. Die mikroskopische Betrachtung der mit dem Ultra Turrax homogenisierten Biofilme machte deutlich, dass die Mikroorganismen im Biofilm besser vereinzelt wurden. Einer zukünftigen Anwendung des Ultra Turrax zur Probenvorbereitung für die CER-Extraktion bietet sich an. Durch die offenere Matrix des Biofilms kann die Komplexierung mit CER möglicherweise besser durchgeführt werden, so dass die Erträge in den EPS-Extrakten höher liegen könnten.

#### **Vergleichsmessungen der KBE-Dichten in eingefrorenem und aufgetauten Biofilmen (s. Kap. 4.2.2)**

Es liegen kaum Informationen über die Überlebensrate von Mikroorganismen vor, die über längere Zeit im Biofilm eingefroren waren. Im Verlaufe dieser Arbeit war es möglich, Vergleichsmessungen zwischen aufgetauten und frischem Biofilm, bzw. den Dichten an Mikroorganismen in den Biofilmen, durchzuführen. Dabei wurden die KBE-Dichten im Biofilm vor dem Einfrieren mit den KBE-Dichten im Biofilm nach dem Auftauen verglichen. Die Dichten an Mikroorganismen in den aufgetauten Biofilmen lagen alle noch im Bereich von  $10^7$  KBE/mg Biofilm-FM. Die prozentualen Überlebensraten werden in Tabelle 12 gezeigt.

**Tabelle 12:** %-Anteil der aktiven Mikroorganismen aus dem eingefrorenen Biofilm nach dem Auftauen

C:N:P	100:1:1	100:5:1	100:8:1	100:10:1	100:12:1	100:14:1	100:18:1	100:20:1
%	8,2	64	38	100	38	32	56	57

Die Ergebnisse weisen auf eine relativ hohe Überlebensrate an Mikroorganismen aus den eingefrorenen Biofilmen hin. Bei Wolfaardt et al. (1999) wird auf den Schutzeffekt der EPS auch gegen Einfrierung hingewiesen. Auf diese interessante Fragestellung könnte in weiterführenden Untersuchungen eingegangen werden.

### Protein- und Kohlenhydratgehalte im Biofilm (s. Kap. 4.2.3 und 4.2.4)

Die Gehalte an Proteinen im Biofilm-TM (s. Kap. 4.2.3, Abbildung 40) zeigen Maxima in den C:N:P-Verhältnissen von 100:8:1 bis 100:10:1. Bei höheren C:N:P-Verhältnissen sinken die Proteingehalte wieder. Die Abbildung 41 zum Proteingehalt im Biofilm-FM zeigt dagegen eine andere Entwicklung. Bei 100:10:1 und 100:12:1 werden Maxima erreicht. Das sich anschließende 100:14:1 Verhältnis zeigt dann niedrigere Proteingehalte. Die hohen Stickstoffgehalte in 100:18:1 und 100:20:1 zeigen im Biofilm-FM einen sprunghaften Anstieg der Proteingehalte.

Wird der Mittelwert der Quotienten aus dem Proteingehalt und dem Stickstoffgehalt in den verschiedenen Biofilmen berechnet (s. Abbildung 47), kommt man auf eine Beziehung von  $5,12 \pm 0,44$  zwischen Protein- und Stickstoffgehalten im Biofilm-TM. Dieser Wert kann als eine Konstante für die Verhältnisse der Protein- und Stickstoffgehalte aus diesen Biofilmen angesehen werden. Aus dieser Berechnung ist das Verhältnis von 100:1:1 ausgenommen, da es deutlich stickstofflimitiert ist. Vergleichswerte für diese Berechnungen liegen in der Literatur nicht vor.

Die Gehalte an Proteinen im Biofilm korrelieren mit den Gehalten an Kohlenhydraten. Die Summe von Proteinen und Kohlenhydraten (s. Kap. 4.2.4) liegt in den Biofilm-TM bei Gehalten von  $70,8\% \pm 3,59$  - und damit konstant. Wird bei dieser Betrachtung der Gehalt an organischen Kohlenstoff (s. Kap. 4.1.3) im Biofilm-TM hinzugenommen, der einen konstanten Gehalt von  $46,9\% \pm 0,7$  erreicht, kann abgeleitet werden, dass der in den Biofilm aufgenommene Kohlenstoff wechselseitig für die Kohlenhydratfraktion oder für die Proteinfraction genutzt wurde. Dieser Wechsel geht nicht parallel mit dem zunehmenden Stickstoffgehalt im synthetischen Ausgangsmedium einher, ist aber durch ihn bedingt, da er der einzige variierte Nährstoff war.

Abbildung 74 zeigt die Verläufe der Protein- und Kohlenhydratgehalte im Biofilm-TM.

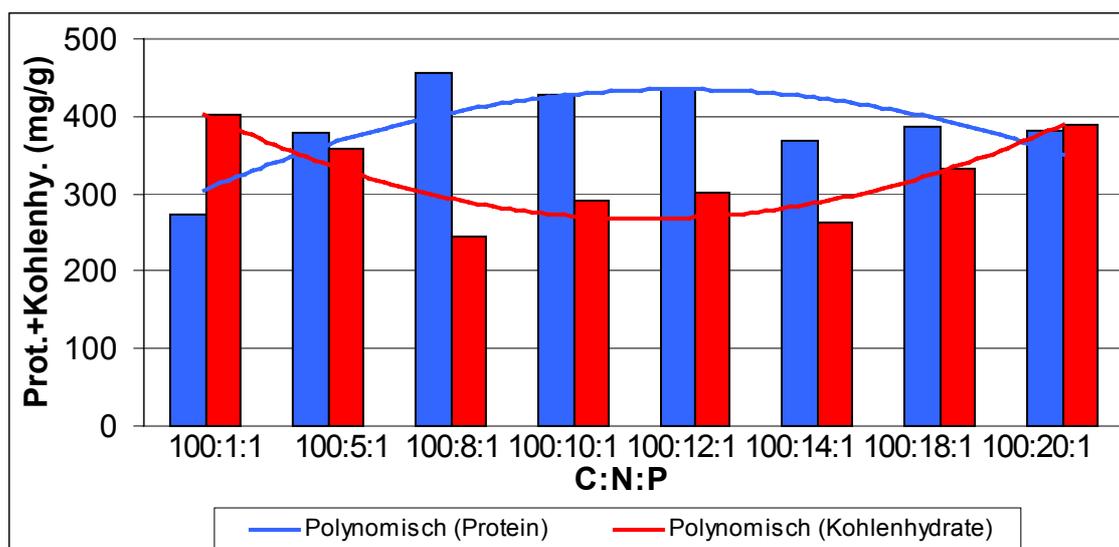


Abbildung 74: Protein- und Kohlenhydratgehalte im Biofilm-TM

Abbildung 74 zeigt den wechselseitigen Verlauf der Protein- und Kohlenhydratgehalte in Abhängigkeit von unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen im Ausgangsmedium. Wolfaardt et al. (1999) berichtet über vergleichbare Resultate. Dort wird eine Zunahme des Proteinanteils mit einer gleichzeitigen Abnahme des Kohlenhydratanteils, in Abhängigkeit vom Wassergehalt, beschrieben - der Stickstoffgehalt wurde dabei nicht berücksichtigt.

Bei Hoffman u. Decho (1999) wird auf einen zunehmenden Kohlenhydratgehalt bei Stickstofflimitierung hingewiesen. Dieses Ergebnis reflektiert der Verlauf in Abbildung 74. Aber auch bei höheren C:N:P-Verhältnissen steigt der Kohlenhydrat-Gehalt wieder an, in Korrelation mit dem Proteinanteil. Zudem erwähnen Hoffman u. Decho (1999), dass die Aktivität von Enzymen durch den Einfluss des Stickstoffgehaltes verändert wird.

Nach dem Grundsatz „Die Natur konstruiert keine komplexen Anordnungen, wenn einfache genügen“ (Stryer, 1990), muss es Gründe für diese Veränderungen geben. Wird zugrunde gelegt, dass der organische Kohlenstoffanteil im Biofilm-TM konstant bleibt und die Summe der Proteine und Kohlenhydrate ebenso, sich aber die Wassergehalte verringern und dadurch die Dichten der Biofilme erhöhen, kann rückgeschlossen werden, dass sich durch den zunehmenden Stickstoffgehalt im synthetischen Medium die Kohlenhydrate und Proteine qualitativ verändert haben. Diese Veränderung hat Einfluss auf den Wassergehalt der Biofilme. Aus der Verringerung der Calciumgehalte mit steigendem Stickstoffgehalt kann ebenfalls abgeleitet werden, dass sich die Bindungsmorphologie hin zu stabileren Bindungen im Biofilm verändert hat.

Eine Antwort auf die Frage, warum sich Veränderungen durch die höheren Stickstoffgehalte ergeben haben, könnten die Glucoproteine geben. Die Glucoproteine, speziell Lectine, haben kohlenhydratbindende Eigenschaften (Hoffman u. Decho, 1999).

Higgins u. Novak (1997) beschreiben bei Untersuchungen mit Belebtschlamm, dass für die Bindeeigenschaften von Lectinen divalente Kationen, speziell Calcium, notwendig sind. Wie aus Abbildung 33 hervorgeht, bleibt der Calciumgehalt im Biofilm-FM ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 bis 100:20:1 in einem konstanten Bereich. Möglicherweise reichen die Gehalte an Calcium in diesen C:N:P-Bereichen für die Lectinbindungen aus.

Der Calciumgehalt nimmt aber in den hier untersuchten Biofilm-TM mit zunehmendem Stickstoffgehalt ab. Dies spricht gegen die vermehrte Bildung von Lectinen durch zunehmende Stickstoffgehalte. Aber auch in diesem Vergleich offeriert sich das Problem, ob Ergebnisse aus Belebtschlammuntersuchungen auf Biofilme übertragbar sind. Auch hierzu wären weiterführende Untersuchungen angezeigt.

Eine zusätzliche Ursache für die veränderte Morphologie innerhalb des Biofilms wurde bereits erwähnt – die Scherkräfte. Um gegen die Scherkräfte innerhalb der Biofilmreaktoranlage bestehen zu können, könnte der zunehmend zur Verfügung stehende Stickstoff für andere Bindestrukturen genutzt worden sein als bei niedrigeren Stickstoffgehalten unter C:N:P-Verhältnissen von 100:10:1. Der These einer Schutzfunktion gegen die Scherkräfte spricht entgegen, dass die Mikroorganismen bei einem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 deutlich höhere Dichten an KBE/mg im Biofilm-FM erreichten, als in den niedrigeren und höheren C:N:P-Verhältnissen.

Der Stickstoff in den synthetischen Medien wurde nur bis zu einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 fast vollständig sorbiert. Die anschließende Erhöhung der Stickstoffgehalte im synthetischen Medium verblieb im Restwasser (s. Kap. Kap. 4.1.4) der Ver-

suchsläufe. Wie bereits erwähnt, folgert bei den höheren C:N:P-Verhältnissen ab 100:12:1 weitere Veränderungen in den Fraktionen des Biofilms. Der verbleibende Stickstoff im Restwasser könnte sich induktiv auf das Genom der Mikroorganismen ausgewirkt haben, wodurch die morphologischen Veränderungen hervorgerufen wurden.

### **MPN-Methode zur Untersuchung auf Nitrifikanten s. Abschnitt Stickstoff**

#### **Biochemischer Sauerstoffbedarf aus den C:N:P-Verhältnissen (s. Kap. 4.2.6)**

Untersuchungen im Sapromaten können nur bedingte Informationen über die Bildung von Biofilmen geben, da die Messungen planktonisch durchgeführt werden. Da die Bildung von Biofilmen in der Reaktoranlage in der Anfangsphase auch planktonisch ist, geben die Ergebnisse der Sauerstoffzehrung aus den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen Informationen über die physiologischen Reaktionen.

Wie die Ergebnisse in Kap. 4.2.6 zeigen, sind die Verläufe der Sauerstoffverbrauchsrate unterschiedlich. Der stickstofflimitierte Versuchslauf mit einem C:N:P-Verhältnis von 100:1:1 zeigt auch unter planktonischen Milieubedingungen den fehlenden Stickstoff an. Die Versuchsläufe mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:10:1 und 100:20:1 zeigen keine Limitierung an, dennoch sind die Verläufe der Sauerstoffverbrauchsrate unterschiedlich. Der Versuchslauf mit C:N:P von 100:20:1 verläuft schneller, als der Versuchslauf mit 100:10:1. Im C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 wird erst wieder in der Absterbephase Stickstoff frei, um den in der wässrigen Phase verbliebenen organischen Kohlenstoff zu nutzen.

Aus den BSB-Messungen wird der Einfluss des Stickstoffgehaltes auf die physiologische Leistungsfähigkeit der Mikroorganismen deutlich. Diese Ergebnisse lassen den wichtigen Rückschluss zu, dass die hohen Ammonium-Konzentrationen nicht hemmend wirken. Damit wird ein hemmender Einfluss als Erklärungsversuch zum Verbleib von Ammonium-N im Restwasser der Versuchsläufe ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 (s. Kap. 4.1.4), unwahrscheinlich.

#### **Ergebnisse zur EPS-Analytik (s. Kap. 4.3)**

Mit momentanen Untersuchungsmethoden ist es noch nicht möglich, einzelne EPS-Moleküle aus Mischpopulationen zuzuordnen (Sutherland, 2001). Bei Biofilmuntersuchungen ist der Trennungsschritt zur Separierung der Mikroorganismen aus der sie umgebenden EPS-Matrix entscheidend für die Analyse der EPS.

Die bisher bekannten Separationsmethoden sind mit Unsicherheitsfaktoren belegt. Die Probleme fangen schon dort an, weil Biofilm nicht gleich Biofilm ist. Das kann bedeuten, dass die Zusammensetzung der Matrix – vom Wassergehalt, über die Dichte der Mikroorganismen im Biofilm, Reinkultur oder Mischpopulation, der Gehalt an Proteinen, Kohlenhydraten u.a. - sehr unterschiedlich sein können. Weitere Probleme ergeben sich aus der Herkunft und dem Alter des Biofilms. Da bekannt ist, dass Biofilme einer stetigen Veränderung unterliegen, kann davon ausgegangen werden, dass sich auch die Matrix und damit die EPS in ihrer Zusammensetzung und in ihrer Anfälligkeit gegenüber der Trennmethode verändern kann. Unter diesen Voraussetzungen eine für alle Biofilme geeignete EPS-Trennmethode zu finden bleibt schwierig.

Neben der Trennmethode für die EPS aus dem Biofilm heraus, können die Auswirkungen auf die der Trennmethode ausgesetzten Mikroorganismen von

Bedeutung sein. Wenn die extrahierten EPS quantitativ auf Einzelsubstanzen untersucht werden sollen, muss gewährleistet sein, dass die Extrakte nur EPS-Bestandteile enthalten und nicht noch intrazelluläre Verbindungen, die aus einer durch die Methode bedingte Lyse oder der Autolyse von Mikroorganismen stammen könnten.

Azeredo et al. (1999) stellen in einer Untersuchung mehrere Extraktionsmethoden für EPS aus Biofilmen in Relation. Die besten Ergebnisse – im Hinblick auf die Vermeidung der Lyse - wurden durch die Extraktion mit Glutaraldehyd erzielt. Der Mechanismus der Glutaraldehyd-Extraktion ist aber noch weitgehend unbekannt.

Die in dieser Arbeit benutzte CER-Extraktionsmethode (Frølund et al., 1996; s. Kap. 3.5.1) zählt zu den von Azeredo et al. (1999) untersuchten Methoden. Die EPS-Extraktion wurde von Azeredo auch über zwei Stunden durchgeführt, jedoch nur bei 400 rpm. Aus den Ergebnissen von Azeredo et al. (1999) kann abgeleitet werden, dass die durch CER extrahierten EPS – auch aus den frischen Biofilmen heraus – intrazelluläre Bestandteile einschließen können. Die Ergebnisse sind nicht unbedingt übertragbar, da jeder Biofilm bzw. EPS eine andere Zusammensetzung und damit andere Extraktionsmethoden benötigen kann (Azeredo et al., 1999). Nach Neu u. Lawrence (1999) ist die in dieser Arbeit angewandte CER-Methode zur Zeit die Methode der Wahl. Von Nielsen et al. (1999) wird die quantitative Ausbeute dieser Methode an EPS aus dem gesamten Biofilm mit 3-68% angegeben.

Die Schritte zur Abtrennung (s. Kap. 3.2.2) des Biofilms von den Immobilisationseinheiten beinhaltet das „Waschen“ des Biofilms. In der Waschphase wird die lösliche Fraktion des Biofilms, bzw. der EPS, bereits abgetrennt. Zhang et al. (1999) weist in seiner Untersuchung zum Vergleich von Extraktionsmethoden auf diesen Umstand hin. Er postuliert, dass dieser Anteil der EPS essentiell für die Quantifizierung der EPS sei. Bei Spaeth u. Wuertz (2000) wurde diese Fraktion zu den löslichen EPS eingeordnet. Die löslichen EPS werden durch den Waschschrift, der vor der Extraktionsphase stattfindet, bereits von den Zellaggregaten getrennt. Die löslichen EPS fallen nicht unter die Definition der extrahierbaren Biopolymere und damit nicht unter die Fraktion der EPS im Belebtschlamm und in Biofilmen (Spaeth u. Wuertz, 2000). Der DOC und Proteingehalt der in der Waschphase abgetrennten löslichen EPS wurde im Rahmen dieser Arbeit bei einigen Biofilmen gemessen (Ergebnisse DOC/TOC, s. Kap. 4.1.9 und Proteine, s. Kap. 4.2.3).

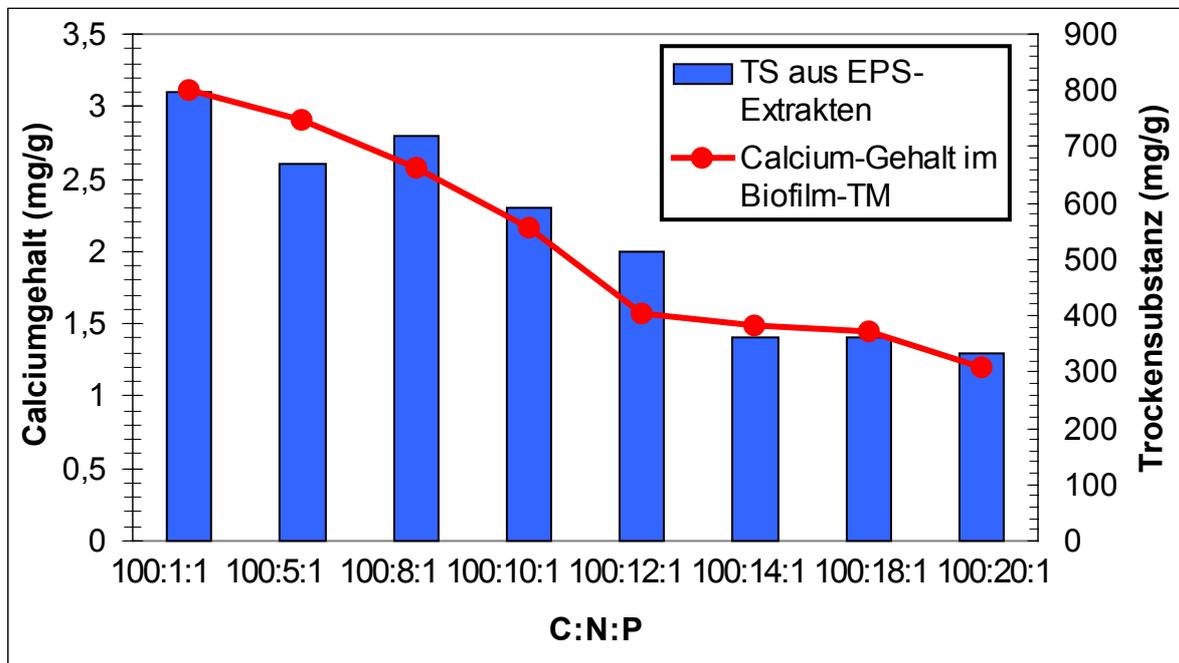
#### **Erträge aus der CER-Extraktion (s. Kap. 4.3.1)**

Die Extraktionserträge durch CER sind neben der Wirkung der Scherkräfte (Jahn u. Nielsen, 1998) von den Gehalten an zweiwertigen Ionen abhängig. Durch die CER-Extraktion werden zweiwertige Kationen aus den EPS grösstenteils (s. unten, Gehalte an Metallen in den EPS-Extrakten) umkomplexiert. Dadurch werden wasserlösliche Fraktionen der EPS frei und sind im Extrakt zu finden. Hochmolekulare, hydrophobe Moleküle liegen möglicherweise nicht in den Extrakten vor (Jahn u. Nielsen, 1998). Bei Jahn u. Nielsen (1998) lag die Ausbeute an EPS eines Abwasserbiofilms bei ca. 15%, bezogen auf den gesamten organischen Anteil im ganzen Biofilm. Die gleiche Methode, angewendet an Belebtschlamm, zeigte bei Frølund et al. (1996) eine Ausbeute von ca. 27%.

#### **Messung der Trockensubstanz aus den CER-Extrakten (s. Kap. 4.3.2)**

Aus Abbildung 51 geht deutlich hervor, dass mit zunehmendem Stickstoffanteil im synthetischen Medium die Erträge an Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten geringer werden. Das kann bedeuten, dass die Komplexierung der zweiwertigen Kationen (z. B. Calcium) durch den Ionenaustauscher (CER) mit zunehmendem Stickstoffgehalt ineffektiver wurde. Daraus kann abgeleitet werden, dass sich die Art der

Verknüpfung der EPS verändert hat, oder dass die Resultate durch die CER-Extraktion methodisch bedingt sind. Abbildung 75 zeigt die Entwicklungen der Calciumgehalte im Biofilm-TM und die Erträge an Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten durch die CER-Methode.



**Abbildung 75:** Calciumgehalte im Biofilm-TM und Erträge an Trockensubstanz (TS) aus den CER-Extraktionen in Abhängigkeit vom C:N:P-Verhältnis

Zu diesem Ergebnis zeigen die Resultate der Calciummessung aus dem Biofilm-TM eine gute Ergänzung. Der Calciumgehalt im Biofilm-TM nahm mit zunehmendem Stickstoffgehalt in den synthetischen Medien ab. Auch dies deutet darauf hin, dass sich die Komplezierungen in den EPS durch den zunehmend zur Verfügung stehenden Stickstoffgehalt im synthetischen Medium verändert haben können. Die Ergebnisse zeigen einen deutlichen Einfluss des zur Verfügung stehenden Stickstoffs auf die Ausbeuten an EPS durch die CER-Methode. Die Resultate können einen Hinweis darauf geben, warum die Ausbeuten der CER-Extraktion in einem Bereich von 32%-97% streuen (Nielsen u. Jahn, 1999).

### **Gehalte an organischen Kohlenstoff in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte (s. Kap. 4.3.3)**

Der durch die CER-Extraktion extrahierte organische Kohlenstoff aus dem Biofilm zeigt die Effektivität der Extraktion von EPS aus dem Biofilm. Auch hier sind die Schwierigkeiten mit der CER-Extraktionsmethode zu erwähnen. Durch die Veränderung und in einem weiten Bereich schwankende Extrahierbarkeit der EPS bleibt die quantitative Zuordnung der Messwerte schwierig. Von Nielsen u. Jahn (1999) wird die quantitative Ausbeute dieser Methode an EPS aus dem gesamten Biofilm mit 3-68% angegeben. Hinzu kommt der Einfluss der in dieser Arbeit gebildeten Biofilme unter sich ändernden Stickstoffgehalten im synthetischen Medium.

Der organische Anteil der EPS in der Biofilmtrockenmasse wird zwischen 75-95% (Flemming, 1995c), 60-98% (Wingender et al., 1999a) und bei Nielsen et al. (1997) zwischen 50-80% angegeben.

Folgende Tabelle 13 zeigt den prozentualen Anteil des organischen Kohlenstoffs aus den EPS-Extrakten, der aus dem gesamten organischen Kohlenstoff der „frischen“

Biofilme extrahiert wurde - der Verlauf ist in Abbildung 54 dargestellt. Der prozentuale Anteil des organischen Kohlenstoffs nimmt bis zum C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 zu, danach fällt er wieder ab.

**Tabelle 13:** % Anteile des organischen Kohlenstoffs aus den EPS-Extrakten an den Anteilen des organischen Kohlenstoffs im Biofilm-TM bei unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen

C:N:P	100:1:1	100:5:1	100:8:1	100:10:1	100:12:1	100:14:1	100:18:1	100:20:1
%	5	6,3	7,2	8,5	10,6	9,2	5,1	5,2

Die Entwicklung zeigt zwar eine Abhängigkeit vom C:N:P-Verhältnis, kann jedoch aus den oben beschriebenen Gründen quantitativ nicht eindeutig ausgewertet werden. Festzuhalten ist allerdings, dass durch die unterschiedlichen C:N:P-Zugaben für den Aufbau der Biofilme, die Extrahierbarkeit der EPS mit der CER-Methode unterschiedliche Ergebnisse in den C:N:P-Verhältnissen zeigt. Dieses Ergebnis könnte ein deutlicher Hinweis auf eine Änderung der EPS in den resultierenden Biofilmen durch die unterschiedlichen Stickstoffgehalte im synthetischen Medium sein.

Bei der Betrachtung der Abbildung 52, der prozentuale Anteil des organischen Kohlenstoffs aus der Trockensubstanz der EPS-Extrakte, ist eine vergleichbare Entwicklung bis zu einem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 zu sehen, ähnlich wie beim prozentualen Anteil des organischen Kohlenstoffs in der Trockensubstanz zum gesamten Gehalt an organischem Kohlenstoff im Biofilm-TM (s. o.). Tabelle 14 zeigt die Werte.

**Tabelle 14:** Prozentualer Gehalt an organischem Kohlenstoff in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte aus den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen

C:N:P	100:1:1	100:5:1	100:8:1	100:10:1	100:12:1	100:14:1	100:18:1	100:20:1
%	1,66	8,1	9,8	10	15,5	13,3	13,9	12,5

Nach dem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 verringert sich der prozentuale Anteil nicht so stark wie beim obigen Vergleich. In der Trockensubstanz der EPS-Extrakte ab 100:12:1 bleibt der Anteil des organischen Kohlenstoffs bei den höheren C:N:P-Verhältnissen in etwa auf gleicher Höhe, mit leicht abfallender Tendenz. Bezieht man nun das Ergebnis der mit steigendem C:N:P-Verhältnis geringer werdenden Trockensubstanz (s. Kap. 4.3.2) aus den EPS-Extrakten hinzu, wird quantitativ weniger extrahiert, aber qualitativ ist mehr organischer Kohlenstoff in der Trockensubstanz zu finden. Wird noch der Gehalt an Stickstoff in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte (s. Abbildung 55) mit in die Überlegungen einbezogen, könnte resultiert werden, dass vermehrt organische Stickstoffverbindungen in der EPS, ab einem Verhältnis von 100:12:1, vorhanden sind. Diese Herleitung kann wiederum auf Glycoproteine Hinweise geben.

#### **Stickstoff-Gehalte in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte (s. Kap. 4.3.4)**

Auch bei der Betrachtung des Stickstoffgehaltes in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte müssen die abnehmenden Trockengehalterträge (s. Kap. 4.3.2) in den Extrakten, mit zunehmendem Stickstoffgehalt in den C:N:P-Verhältnissen, berücksichtigt werden. Der Gehalt an Stickstoff in der Trockensubstanz steigt qualitativ an, wie aus der Abbildung in Kap. 4.3.4 zu erkennen ist. Die Erhöhung des Stickstoffgehaltes in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte ist ab dem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 deutlich erkennbar. Dem gegenüber wird ab einem C:N:P-Verhältnis von 100:10:1 kein zusätzlicher Stickstoff mehr sorbiert, wie aus den Messungen des Stickstoffgehaltes im Restwasser (s. Kap. 4.1.4) festgestellt wurde.

An den Ergebnissen ist zu erkennen, dass sich die erhöhten Stickstoffgehalte in den synthetischen Medien auf die extrahierbaren EPS ausgewirkt haben. Es wurde genauso viel Stickstoff im C:N:P-Verhältnis 100:10:1 wie im C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 – 100:20:1 sorbiert, aber der Stickstoffgehalt war in den Trockensubstanzen der EPS-Extrakte deutlich höher. Dies ist ein deutlicher Hinweis auf eine Änderung der Zusammensetzung der EPS, ausgelöst durch die Stickstoffgehalte in den synthetischen Medien.

Der in den Restwässern verbleibende Ammonium-N hatte einen Einfluss auf die Biofilmbildung. Nur so ist zu erklären, weshalb sich der Wassergehalt, die Konsistenz des Biofilms, die Gehalte an Kohlenhydraten und Proteinen, bei C:N:P-Verhältnissen über 100:10:1 deutlich veränderten. Stoodley (1999) resümiert durch die Ergebnisse seiner Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Nährstoffen auf die Biofilmbildung, dass sich der Biofilm den lokalen Bedingungen und Änderungen anpassen kann. Genau das ist eine Auswirkung der modifizierten Stickstoffgehalte in den synthetischen Medien auf die daraus resultierenden Biofilme.

#### **Metalle in den EPS-Extrakten (s. Kap. 4.3.5)**

Die Komplexierung des Calciums durch die CER-Extraktion, bzw. die Rückhaltung in den Pellets der Zentrifugationen, liegen zwischen 80,5% und 98,7%. Das heißt, dass zwischen 1,3% und 19,5% der ursprünglichen Gehalte an Calcium im Biofilm-FM, nicht durch CER rückgehalten wurde. Aus den Ergebnissen kann gefolgert werden, dass bei Anwendung der CER-Extraktionsmethode die Gehalte an Calcium in den EPS nicht gänzlich durch die CER-Extraktion umkomplexiert wurden. Auch hier wird wiederum das Problem deutlich, dass die Methode zur Trennung der EPS aus dem Biofilm zwar momentan die Geeigneteste ist, aber verbessert werden sollte. Eine Möglichkeit der Verbesserung könnte eine Vorabmessung des Calciumgehaltes in der zu behandelnden Matrix sein, um die zugegebene Menge an CER möglicherweise einstellen zu können.

#### **Proteinbanden aus den EPS-Extrakten mit SDS-Page (s. Kap. 4.3.6)**

Die Auftrennung von Proteinen aus den extrahierten EPS mit SDS-Page zeigen den Einfluss der unterschiedlichen Stickstoffgehalte auf extrahierbare Proteine. Aber auch hier ist der Einfluss der CER-Methode nicht zu vernachlässigen, da nicht sichergestellt ist, dass alle Proteine erfasst wurden. Eine quantitative und qualitative Auswertung ist daher nur unter Vorbehalt zu sehen. Dennoch ist aus den Auswertungen und Darstellungen (s. Kap. 4.3.7) der genotypische Einfluss der verschiedenen C:N:P-Verhältnisse auf die Proteinbildung in den EPS gut erkennbar.

Die Ergebnisse lassen ab einem Verhältnis von ca. 100:12:1, mehr und breitere Banden im Enzyimbereich zwischen 10-100 kDa erkennen, als in den unteren Bereichen (100:10:1 und 100:18:1 ausgenommen, s. Kap. 4.3.6) der C:N:P-Verhältnisse. Diese Anreicherung im kDa Bereich von 10-100, dem Enzyimbereich, könnte auf eine vermehrte Bildung von Exoenzymen hinweisen. Die Exoenzyme könnten die Biofilmstruktur beeinflusst haben, so dass weniger Wasser gebunden wurde. Über die Strukturänderung durch die Einlagerung von Exoenzymen in die Biofilmmatrix ist recht wenig bekannt (Flemming u. Wingender, 2000b).

Die Ergebnisse aus der SDS-Page sind nicht mit den Biofilm-TM Proteingehalten direkt zu vergleichen. Dies hat zum einen den Grund in der unzureichenden Matrixtrennung durch CER. Ein weiterer Grund ist das Vorkommen von intrazellulären Proteinen der Mikroorganismen, die bei der Messung aus dem Biofilm immer mitgemessen wurden.

Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der aus den EPS extrahierbaren Proteine und Enzyme sind notwendig und interessant.

#### **Nachweis von AHL's in den EPS-Extrakten (s. Kap. 4.3.7)**

Die Ergebnisse zum Nachweis von AHL waren negativ, aber das Vorhandensein von AHL's ist dennoch nicht auszuschließen. Batchelor et al., 1997 verweist auf eine notwendige Zelldichte von  $10^{10} \text{ mL}^{-1}$  (bei der Aussage, dass mg und mL als gleiche Volumina angesehen werden) um eine positive Reaktion zu erhalten. Diese Zelldichten können in Biofilmen erreicht werden. Die juvenilen Biofilme in dieser Arbeit erreichten Zelldichten von ca.  $10^7 \text{ KBE/mg Biofilm-FM}$ . Wenn für die CER-Extraktion 20 Gramm Biofilm-FM eingesetzt wurden und das Extrakt 300 mL erbringt, errechnet sich aber nur eine Zelldichte von ca.  $7 \cdot 10^8 \text{ mL}^{-1}$ . Auch kann die Freisetzung in die EPS-Extrakte durch die Matrix des Biofilms reduziert worden sein.

#### **Proteingehalte aus den EPS-Extrakten (s. Kap. 4.3.8)**

Die Gehalte an Protein aus den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-TM („frisch“) und auf die Biofilm-FM („frisch“) Einwaage zur CER-Extraktion, zeigen jeweils, ausgehend von einem C:N:P-Verhältnis von 100:1:1 einen steigenden Proteinanteil bis 100:12:1 (s. Kap. 4.3.8). Nach dem Maximum bei 100:12:1 verringern sich die Proteinanteile in den EPS-Extrakten wieder. Dieses Ergebnis zeigt Parallelen zu den Ergebnissen aus der Proteinbandenverteilung auf den SDS-Gelen, die miteinander vergleichbar sind, da sie jeweils aus den CER-Extrakten gemessen wurden. Auch dort sind bei einem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1-100:14:1 deutlich mehr Banden zu erkennen, als aus den EPS-Extrakten der anderen C:N:P-Verhältnisse. Das Verhältnis von 100:12:1 hat den höchsten Ertrag an Proteinen, die mit der CER-Methode aus den EPS zu extrahieren sind. Nach den Ergebnissen aus der CER-Extraktion kann festgehalten werden, dass bei einem C:N:P-Verhältnis von ca. 100:12:1 die höchste Ausbeute an Proteinen aus der Biofilmmatrix gemessen wurde.

Wird hingegen das Verhältnis des Proteingehaltes im gesamten Biofilm-TM und der Gehalt an Proteinen in den EPS-Extrakten in Relation gesetzt, so zeigt sich, dass nur zwischen 3,4 bis 10,6% der Proteine aus dem gesamten Proteinpool in den EPS-Extrakten wieder zu finden sind (s. Tab. 15). Jahn u. Nielsen (2000) ziehen aus ihren Untersuchungen aber die Schlussfolgerung, dass ein Großteil der Proteine aus dem gesamten Biofilm extrazellulär zu finden ist.

**Tabelle 15:** Anteil des Proteingehaltes in EPS vom Proteinanteil im Biofilm-TM

C:N:P	100:1:1	100:5:1	100:8:1	100:10:1	100:12:1	100:14:1	100:18:1	100:20:1
%	3,4	4,3	10,6	4	7,7	7,7	3,5	3,5

Der in Tabelle 15 gezogene Vergleich ist nicht genau, da die Proteinanteile der Mikroorganismen in den Gehalt an Proteinen im Biofilm-TM mit in die Kalkulation eingehen. Bei der Annahme, dass der organische Anteil der EPS am gesamten organischen Anteil im Biofilm bis zu 98% betragen kann (s. Kap. 1.1), können solche Vergleiche aber durchaus Aussagekraft haben. Wird das Verhältnis von 100:8:1 in Tabelle 15 ausgenommen, finden sich die Maxima in den C:N:P-Verhältnissen von 100:12:1 und 100:14:1. Bei höheren Verhältnissen vermindert sich die Extraktionsrate an Proteinen wieder.

Wenn die Gehalte an Stickstoff in den EPS-Extrakten mit den Gehalten an Proteinen in den EPS-Extrakten verglichen werden, wird deutlich, dass ein Großteil des Stickstoffs in den EPS-Extrakten nicht in den Proteinen gebunden ist. Für folgende Tabel-

le 16 wurde die Rechnung: Stickstoffgehalt  $\cdot$  6,25 = Proteingehalt (in Frølund et al., 1996; s. Kap. 4.2.4) zugrunde gelegt. Die Werte sind auf mg/g EPS-Trockenmasse (EPS-TM) umgerechnet.

**Tabelle 16:** Stickstoffgehalte in der EPS-Trockenmasse (EPS-TM), in Bezug zu den realen und theoretischen Proteingehalten

C:N:P	100:1:1	100:5:1	100:8:1	100:10:1	100:12:1	100:14:1	100:18:1	100:20:1
EPS-N mg/g	2,4	6,3	10	12	32	31	28,4	30
Protein theoretisch mg/g	15	39,4	62,5	75	200	198	178	188
Protein real mg/g	11,5	18,8	50,8	32,9	41,9	35,8	18,4	17,7

Die deutlichen Unterschiede zwischen den theoretischen und den realen Proteinwerten aus der EPS-TM Substanz zeigen an, dass der Stickstoff, besonders ab dem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1, nicht in den gemessenen Proteinen gebunden ist. Möglicherweise sind diese Ergebnisse auf die Bildung von stickstoffhaltigen Kohlenhydraten und/oder von Glycoproteinen zurückzuführen. Weitere Untersuchungen zur Charakterisierung der aus den EPS extrahierbaren Proteinen sind hier erforderlich.

Die Unterschiede in den Ergebnissen des Vergleiches zwischen den theoretischen und realen Proteingehalten können den gleichen Grund haben, wie er schon bei den Vergleichen aus der gesamten Biofilmfraktion angeführt wurde. Die Umrechnung von Stickstoffgehalt  $\cdot$  6,25 = Proteingehalt kann nur unter Vorbehalt als zutreffend angesehen werden. Der Umrechnungsfaktor von 6,25 wird auch bei Raunkjer et al. (1994) als nicht exakt dargestellt, da in die Messwerte der Stickstoffbestimmung – Raunkjer et al. (1994) benutzten die Kjeldahl-Methode – auch Stickstoff erfasst wird, der nicht in Proteinen gebunden ist. Bei den in der Tabelle 16 dargestellten Differenzen kann aber nicht mehr von einer Korrelation ausgegangen werden. Die realen und die theoretischen Proteinwerte liegen zu weit auseinander. Der bereits aus den Quotienten der Protein- Stickstoffgehalte ausgerechnete Faktor von  $5,12 \pm 0,44$  hilft auch nicht weiter, da dieser noch größere Differenzen aufweist.

Wenn die Schwierigkeiten mit der EPS-Extraktionen nicht mit betrachtet werden, kann das Ergebnis bedeuten, dass der Stickstoff zu einem Großteil in einer anderen Fraktionen der EPS verwendet worden ist als in den Proteinen. Auch hier könnte die Erklärung in den Glycoproteinen liegen.

### Gehalte an Kohlenhydraten in den EPS-Extrakten (s. Kap. 4.3.9)

Die Gehalte an Kohlenhydraten (aus dem Biofilm „frisch“) in den EPS-Extrakten zeigen eine vergleichbare Entwicklung wie die Gehalte an Proteinen aus den Extrakten. Die Gehalte an Kohlenhydraten, berechnet auf Biofilm-TM, steigen mit zunehmendem Stickstoffgehalt bis zum C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 an. Anschließend fallen sie bei höheren C:N:P-Verhältnissen wieder ab. Der Anteil der extrahierten Kohlenhydrate aus den Biofilmen „frisch“ am Gesamtkohlenhydratanteil der Biofilme gibt Tabelle 17 wieder.

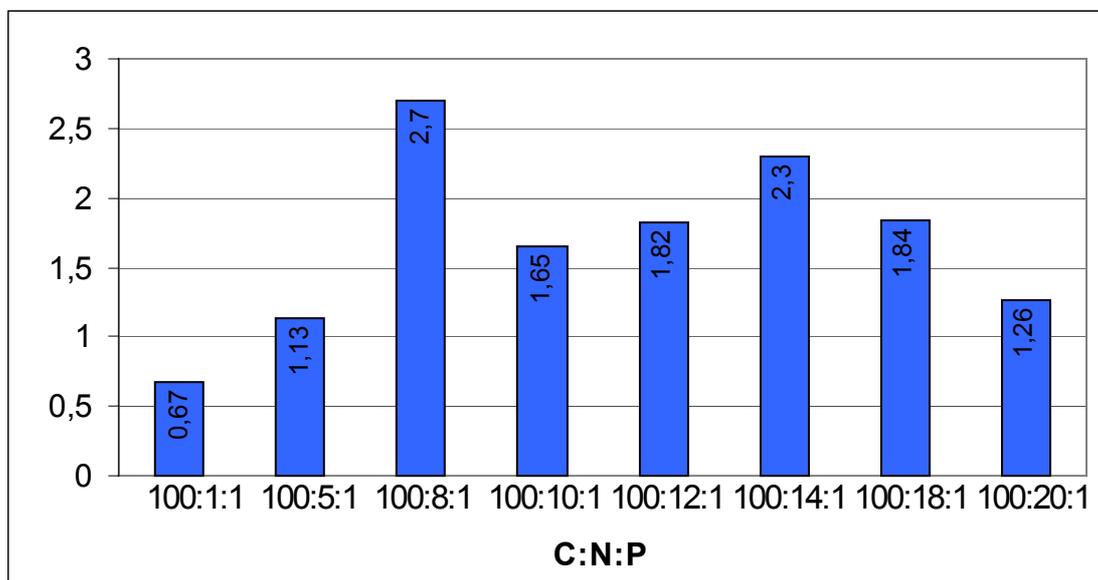
**Tabelle 17:** Anteil der Kohlenhydrate in den EPS-Extrakten am Kohlenhydratgehalt des gesamten Biofilms

C:N:P	100:1:1	100:5:1	100:8:1	100:10:1	100:12:1	100:14:1	100:18:1	100:20:1
%	4,4	5,1	8,5	10	12,6	11,1	6,8	6,5

Auch bei den Kohlenhydraten erhöht sich der Anteil der extrahierbaren Kohlenhydrate aus den Biofilmen mit zunehmendem Stickstoffgehalt bis zu einem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1. Danach fällt er wieder ab.

Der vergleichbare Verlauf der Gehalte an Protein und Kohlenhydrate in den EPS-Extrakten fällt auf. Der zunehmende Stickstoffgehalt in den C:N:P-Verhältnissen wirkt sich auf beide Fraktionen, Protein und Kohlenhydrate, auch in den extrahierbaren EPS aus. Vergleichbare Ergebnisse wurden schon aus den Protein- und Kohlenhydratgehalte des gesamten Biofilms erörtert. Auch diese Ergebnisse könnten auf Glycoproteine hinweisen. Weiterführende Untersuchungen sind hier notwendig.

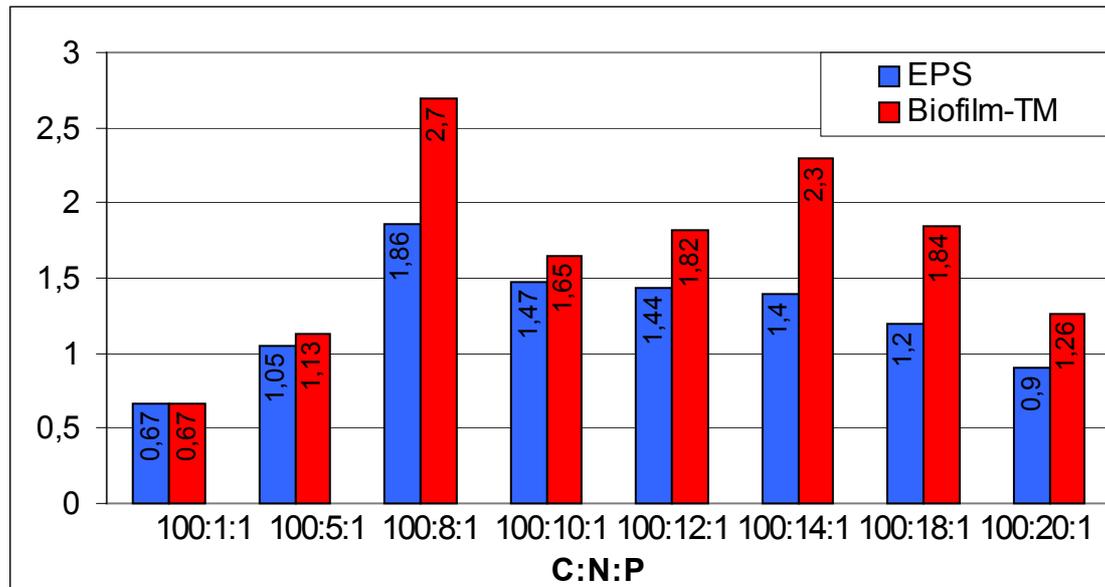
Wie vorher bereits bei den Vergleichen zwischen den Gehalten an Proteinen und Kohlenhydraten aus den gesamten Biofilmen dargelegt wurde, wird in der folgenden Abbildung 76 der Quotient der extrahierten Proteinen und Kohlenhydraten aus den EPS-Extrakten gezeigt.



**Abbildung 76:** Quotienten aus den Gehalte an Proteinen und Kohlenhydraten in den EPS-Extrakten

In den C:N:P-Verhältnissen liegt der Quotient aus Proteinen/Kohlenhydraten fast immer über eins – ausgenommen das Verhältnis 100:1:1. Die Proteingehalte sind demnach immer höher als die Kohlenhydratgehalte in den EPS. Solche Ergebnisse wurden auch von Nielsen et al. (1997) in den EPS aus verschiedenen Biofilmen mit realem Hintergrund gefunden und widersprechen der Annahme, dass die EPS hauptsächlich aus Polysacchariden bestehen. Bei Flemming u. Wingender (2000b) wird diese Annahme ebenso als falsch angesprochen – die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eine Bestätigung dieser Auffassung. Dabei muss berücksichtigt werden, dass der Gehalt an Polysacchariden im Biofilm mit fortschreitendem Alter zunehmen kann (Zhang et al, 1998). Die oben getroffene Aussage kann nur auf die hier untersuchten, juvenilen Biofilme bezogen werden.

Die folgende Abbildung 77 zeigt einen Vergleich zwischen den Quotienten aus Proteinen/Kohlenhydraten aus den Gehalten im Biofilm-TM und aus den Gehalten in den EPS-Extrakten.



**Abbildung 77:** Quotienten der Gehalte an Proteinen/Kohlenhydraten aus den EPS-Extrakten und aus Biofilm-TM

Die Quotienten zeigen einen vergleichbaren Verlauf und vergleichbare Werte in den C:N:P-Verhältnissen. Die Gehalte an Proteinen und dadurch die Quotienten aus Proteinen/Kohlenhydraten, sind im Biofilm-TM höher, da die intrazellulären Proteine mit in die Messung eingegangen sind. Des Weiteren sind die Gehalte aus dem Biofilm-TM Mittelwerte aus mehreren Versuchsläufen und die Angaben aus den EPS-Extrakten nur einmal bestimmt worden. Diese Quotienten aus Proteinen und Kohlenhydraten zwischen Biofilm-gesamt und EPS sind auffallend. Sie müssen aber kritisch betrachtet werden, da die Möglichkeit der Extraktion der Proteine durch die CER-Methode nicht quantitativ, sondern nur qualitativ ist (Jahn u. Nielsen, 2000). In der Studie von Jahn u. Nielsen (2000) wird die Extraktionsrate von EPS-Proteinen aus verschiedenen Biofilmen zwischen 44% und 84% angegeben. Weiterführende Untersuchungen könnten Relationen zwischen den Protein/Kohlenhydraten im gesamten Biofilm und in den EPS-Extrakten erkennen lassen.

#### **Gehalte an Uronsäuren aus den EPS-Extrakten (s. 4.3.10)**

Die Messung der Uronsäuren waren negativ. Es wurden keine Uronsäuren in den EPS-Extrakten nachgewiesen. Dieses Ergebnis war nicht erwartet worden, da Uronsäuren in vielen Polysacchariden zu finden sind (Johnsrud, 1997). Eine Erklärung für diese Ergebnisse kann das Gefrieren des Biofilms und der EPS-Extrakte gewesen sein. Bura et al. (1998) hat in seinen Untersuchungen mit EPS aus Belebtschlamm den Einfluss der Lagerung von EPS-Extrakten bei Temperaturen zwischen 4°C und -20°C und sich daraus ergebende Mindergehalte an Uronsäuren nachgewiesen. Die in dieser Arbeit untersuchten EPS-Extrakte aus den eingefrorenen Biofilmen unterlagen gleich zweimal tiefen Temperaturen. Einmal durch das Einfrieren des Biofilms und anschließend durch das Einfrieren der EPS-Extrakte nach der CER-Extraktion. Die EPS-Extrakte aus den frischen Biofilmen waren nur einmal eingefroren (-18°C). Möglicherweise liegen hier die Gründe für die negativen Ergebnisse aus den Uronsäuremessungen. Quantitativ fallen die Uronsäuren nach Bura et al. (1998) bei den Gehalten an Polysacchariden in den EPS nicht ins Gewicht. Bei weiterführenden Untersuchungen, speziell zu Uronsäuren, müssen diese direkt nach der CER-Extraktion bestimmt werden, damit der Schritt des Einfrierens als mögliche Fehlerquelle ausgeschlossen wird.

**Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten (s. Kap. 4.3.11)**

Die Ergebnisse aus dem G6PDH-Aktivitätstest lassen keine klare Zellyse erkennen. Lediglich bei einem C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 und 100:14:1 steigt die Absorption bei 340 nm gering an.

Auf eine Zellyse deuten aber die Ergebnisse aus den Protein- und Kohlenhydratmessungen (s. Kap. 4.3.8 und 4.3.9) aus den EPS-Extrakten hin. Ein möglicher Grund für die Inaktivierung des Enzyms kann nicht durch die Probenvorbereitung bedingt sein. Das Einfrieren kann dabei nicht ausschlaggebend gewesen sein, da auch die „frischen“ EPS keine Aktivität anzeigen. Möglicherweise wurde das Enzym durch die CER-Behandlung inaktiviert oder in der abzentrifugierten Biofilmmatrix rückgehalten. Bei Jahn u. Nielsen (2000) werden ATP (Adenosintriphosphat) und NADH als geeigneteste Moleküle zur Bestimmung der bakteriellen Biomasse angeführt, jedoch hängt die Konzentration dieser Substanzen auch vom physiologischen Status der Zellen im Biofilm ab. Möglicherweise spielen obige Zusammenhänge eine Rolle, wodurch die negativen Resultate des G6PDH-Aktivitätstest aus den EPS-Extrakten entstanden sind.

## 6 Aspekte

Durch diese Arbeit konnte ein deutlicher Einfluss des Stickstoffgehaltes auf die Bildung von Biofilmen festgestellt werden. Auf weitere Aspekte wird im folgenden eingegangen.

Die speziell für diese Arbeit entwickelte Biofilmreaktoranlage hat sich bewährt und kann für weiterführende Untersuchungen eingesetzt werden. Zu diesen Möglichkeiten zählt der Abbau von Frachten aus Abwässern, mit einem an die Abwasserinhaltsstoffe gezielt aufgebauten und adaptierten Biofilm.

Das C:N:P-Verhältnis von 100:12:1 zeigt eine deutlich höhere Dichte an Mikroorganismen im Biofilm. Der Einfluss dieses C:N:P-Verhältnisses auf die Dichte an Mikroorganismen prognostiziert bessere Abbauraten von Abwasserinhaltsstoffen mit Biofilmreaktoren. Über den Abbau oder die Metabolisierung von z. B. Xenobiotika durch Biofilme könnten neue Erkenntnisse gewonnen werden. Dabei kann das aerobe als auch anaerobe Abbaupotential der Biofilme/Mikroorganismen parallel genutzt werden. Die mit der SDS-Page gemessenen Proteine zwischen 10-100 kDa unterstützen diese Schlussfolgerungen.

Der Einfluss des Stickstoffgehaltes auf den Wassergehalt von Biofilmen oder Belebtschlammflocken sollte weiter untersucht werden - mit dem Ziel, die Entwässerung von Belebtschlamm aus Kläranlagen zu verbessern. Die Ergebnisse dieser Arbeit machen deutlich, dass zum Zwecke der Abwasserreinigung der Biofilm oder Belebtschlamm nicht mit niedrigen Stickstoffgehalten aufgebaut oder betrieben werden sollte, um optimale Abbaupotentiale zu erzielen und weniger Wasseranteile im Belebtschlamm zu erhalten.

Die in der Arbeit deutlich gemachten Einflüsse des Stickstoffgehaltes auf die Bildung von Biofilmen können mit geeigneten Untersuchungsmethoden auf molekularbiologischer und genetischer Ebene weiter vertieft werden. Es können Fragestellungen wie die verstärkte Bildung von Exoenzymen in bestimmten C:N:P-Verhältnissen, oder die genetische Steuerung des Einflusses von Stickstoffgehalten auf die Biofilme/Mikroorganismen, untersucht werden. Im Zuge dessen könnten möglicherweise neue Botenstoffe aus den Biofilmen identifiziert werden. Eine weitere interessante Fragestellung ist die, welche Kohlenhydrate/Proteine durch den Einfluss unterschiedlicher Stickstoffgehalte verändert wurden.

Die Trennmethode der EPS aus dem Biofilm sollte weiter entwickelt werden. Mit der in dieser Arbeit eingesetzten Anlagenkonfiguration ist es unterstützend möglich, die CER-Extraktionsmethode und auch andere Methoden zu optimieren.

Ein zusätzlicher praktischer Hinweis aus dieser Arbeit liegt in der deutlichen Trennung von Ergebnissen aus der Biofilm-Trockenmasse (TM) und Biofilm-Feuchtmasse (FM). Bei Untersuchungen an Biofilmen und EPS sollten die Ergebnisse immer in Feuchtmasse und Trockenmasse dargestellt werden.

Die hohe Überlebensrate an Mikroorganismen in teilweise über mehrere Jahre eingefrorenem Biofilmen zeigte hohe Überlebensraten an Mikroorganismen. Ergebnisse aus weiterführenden Untersuchungen könnten die Konservierungsmethoden für Mikroorganismen verbessern.

Standardisierungsmethoden für die Bildung von Biofilmen sollten weiter entwickelt werden. Untersuchungsreihen mit unterschiedlichen Inokula – z. B. nicht definierte Mischpopulationen – können mit dieser Anlagenkonfiguration Hinweise darauf geben, ob unterschiedliche Inokula zu vergleichbaren Ergebnissen in der Biofilmbildung etc. führen werden. Wenn dies nachgewiesen wird, ist es denkbar, dass Untersuchungsergebnisse unter gleichen Systembedingungen, aber aus verschiedenen Laboratorien, besser miteinander verglichen werden können. Der Grundgedanke hierbei ist, ähnliche Untersuchungsmethoden für Biofilme zu entwickeln, wie sie bereits für planktonisch Systeme bestehen (z. B. der „Zahn-Wellens“ Test nach den OECD-Guidelines).

Die Ergebnisse dieser Arbeit machen außerdem deutlich, dass Mikroorganismen in ihrer Anpassungsfähigkeit an Umweltbedingungen gezielte Antworten haben können. Die Gesamtheit dieser Antworten der Mikroorganismen im Biofilm spiegelt Abläufe wieder, die sich dem Charakter von vielzelligen, kommunikations- und reaktionsfähigen Systemen nähern.

## 7 Anhang

### 7.1 Geräte

Die zur Durchführung der Arbeiten benutzten Gerätschaften sind in der folgenden Liste alphabetisch aufgeführt:

Autoklav Sano clav – Wolf, Geislingen; Typ: 1389

Brutschrank Memmert; Typ: B 50

Dima TOC 100; DIMATEC, Essen

Elektromotor für CER-Rührer. IKA Labortechnik, Janke u. Kunkel, Typ: RW 18

Elementaranalysator LECO — Typ: CHNS-932

Entöler für Reaktorbegasung, Festo. Typ: LF-3/8-S-B

Flüssig-Homogenisator, IKA Labortechnik, Janke u. Kunkel. Typ: VF2

Gloove-Box, Meca-Plex, Grenchen – Suisse; Typ: 2201-C

Handhomogenisator mit Teflonkolben, Typ: 30 mL, graduiert und mit Trichteraufsatz

ICP – Spektrometer, sequentiell; Liberty 200, Fa. Varian

Kryostat Colora Messtechnik, Lorch. Typ MO5

Kühlräume von DAGARD, Temperaturen von 4°C und -30°C

Mikroskop ZEISS; Typ: IM mit Fluoreszenzaufsatz 447216

Perthometer – Oberflächenmessgerät; Perthen GmbH; Typ: S5P

Pumpe Biofilmreaktor: Ismatec - Zürich Schweiz. Typ: MVCA4

Sapromat Fa. Voith, Heidenheim. Typ: AP6

Sauerstoffmessgerät: WTW – Weilheim; Typ: Oxi 330 / Set

Spectrometer Perkin Elmer UV/VIS, Typ: Lambda 11

Spülmaschine – Miele, Compact-Desinfektor, G7783 CD MIELABOR

Trockenschrank Memmert, Schwabach; Typ: Tv50u

Ultraschall Sonifier, Branson Sonic Power Company, Connecticut; Betriebs-Nennfrequenz: 20 kHz, Hochfrequenz-Nennleistung: 150 W; Typ: B-12

Ultraschall Sonorex Super. Betriebs-Nennfrequenz: 35 kHz, Hochfrequenz-Nennleistung: 160/320 W. Typ: RK 103 H

Ultra Turrax, IKA-Labortechnik, Janke und Kunkel, Typ: T25S5

Ultrazentrifuge Heraeus Christ, Osterode. Typ: Omikron

Vacuum – Filtrationsgerät aus Glas zur Mikroorganismenanfärbung; Glasgerätebau Ochs, Bovenden. Typ: 30 mL, Ø 25 mm mit teflonisiertem Lochblech

Waage Sartorius universal. Typ: U3600

Waage Sartorius analytic. Typ: A200S

Wasserbad GFL – Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel. Typ: 1031

Zentrifuge Heraeus Christ; Osterode. Typ: UJ III E

In der experimentellen Stufe der Arbeit wurden noch laborübliche Kleingeräte eingesetzt, die hier nicht einzeln aufgeführt sind.

## 7.2 C:N:P-Verhältnisse und Spurenelementstammlösung

Die nachfolgenden Tabellen 18, 19 und 20 zeigen die Zusammensetzung der Nährmedien in den C:N:P-Versuchsläufen von 100:1:1 bis 100:20:1, bezogen auf 20 Liter Ansatzvolumen.

**Tabelle 18:** Zusammensetzung des Nährmediums in den C:N:P-Ansätzen von 100:1:1 bis 100:10:1

<b>C:N:P-Verhältnisse</b>	<b>100:1:1</b>	<b>100:5:1</b>	<b>100:8:1</b>	<b>100:10:1</b>
Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$ [342,3] Merck 1.07651.	29,9 g	29,9 g	29,9 g	29,9 g
Ethanol p.A. 99,8% $C_2H_6O$ [46,07] AppliChem A 1613	21 mL	21 mL	21 mL	21 mL
Ammoniumchlorid $NH_4Cl$ [53,49] Merck 1145	0,754 g	3,77 g	6,032 g	7,55 g
di-Kaliumhydrogenphosphat $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ [174,18] Merck 5104.1000	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
Eisen(II)-sulfat $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ [278,02] Merck 3965	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Magnesiumsulfat $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ [246,48] Merck 5886	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g
Calciumchlorid $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ [147,02] Merck 2382	0,29 g	0,29 g	0,29 g	0,29 g
Spurenelementstamm- Lösung	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL

**Tabelle 19:** Zusammensetzung des Nährmediums in den C:N:P-Ansätzen von 100:12:1 bis 100:20:1

<b>C:N:P-Verhältnis</b>	<b>100:12:1</b>	<b>100:14:1</b>	<b>100:18:1</b>	<b>100:20:1</b>
Saccharose $C_{12}H_{22}O_{11}$ [342,3] Merck 1.07651.	29,9 g	29,9 g	29,9 g	29,9 g
Ethanol p.A. 99,8% $C_2H_6O$ [46,07] AppliChem A 1613	21 mL	21 mL	21 mL	21 mL
Ammoniumchlorid $NH_4Cl$ [53,49] Merck 1145	9,048 g	10,556 g	13,572 g	15,1 g
di-Kaliumhydrogenphosphat $K_2HPO_4 \cdot 3 H_2O$ [174,18] Merck 5104.1000	1,5 g	1,5 g	1,5 g	1,5 g
Eisen(II)-sulfat $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ [278,02] Merck 3965	0,2 g	0,2 g	0,2 g	0,2 g
Magnesiumsulfat $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ [246,48] Merck 5886	0,25 g	0,25 g	0,25 g	0,25 g
Calciumchlorid $CaCl_2 \cdot 2 H_2O$ Mol.G.= 147,02 Merck 2382	0,29 g	0,29 g	0,29 g	0,29 g
Spurenelementstamm- Lösung (s. unten)	4 mL	4 mL	4 mL	4 mL

**Tabelle 20:** Zusammensetzung der Spurenelementstammlösung

$AlCl_3$	1,8	mg/L
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	1319	mg/L
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	9,1	mg/L
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,005	mg/L
KBr	2,5	mg/L
KJ	2,5	mg/L
LiCl	0,5	mg/L
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	10	mg/L
$Na_2MoO_4 \cdot 2 H_2O$	1	mg/L
$SnCl_2$	0,5	mg/L
$ZnCl_2$	5	mg/L

VE-Wasser ad 1000 mL, autoklavieren mit 121°C, 20 min – pro Liter Ansatzvolumen im synthetischen Medium werden 0,2 mL aus der Stammlösung hinzugefügt

### 7.3 Abkürzungen

Aqua dest.	destilliertes Wasser
ca.	circa
°C	Celsius
cm	Zentimeter
deion.	entionisiert
d. h.	das heißt
etc.	et cetera
Fa.	Firma
´g	Relative Zentrifugalbeschleunigung
g	Gramm
h	Stunde
Kap.	Kapitel
Kg	Kilogramm
Kohlenhy.	Kohlenhydrate
L	Liter
mg	Milligramm
min	Minuten
mL	Milliliter
mm	Millimeter
nm	Nanometer
OECD	Organisation of Economic Cooperation and Development
p.A.	pro Analysis
pH	potentia hydrogenia
Prot.	Proteine
rpm	Umdrehungen pro min
s.	siehe
u.a.	und andere
VE	voll-entsalzen
w/v	weight/volume
w/w	weight/weight
z. B.	zum Beispiel

Weitere Abkürzungen sind im Text definiert.

## 7.4 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

### Verzeichnis der Abbildungen:

- Abbildung 1:** Schematische Darstellung der Biofilmbildung (© Center for Biofilm Engineering, Montana State University-Bozeman, 1995)
- Abbildung 2:** Water channel model der Biofilmorganisation (© Center for Biofilm Engineering, Montana State University-Bozeman, 1996)
- Abbildung 3:** Schematische Darstellung der gesamten Biofilmreaktoranlage
- Abbildung 4:** Reaktor 1 der Biofilmreaktoranlage
- Abbildung 5:** Reaktor 2 der Biofilmreaktoranlage
- Abbildung 6:** Edelstahlzylinder Reaktor 2
- Abbildung 7:** Grundplatte Reaktor 2
- Abbildung 8:** Reaktor 3 der Biofilmreaktoranlage
- Abbildung 9:** Mit Biofilm bewachsene IE
- Abbildung 10:** Mit Biofilm bewachsene IE in den Glastuben des Reaktor 2
- Abbildung 11:** Ultra Turrax Behandlung der IE's vor dem Start
- Abbildung 12:** Ablösung des Biofilms mit dem Ultra Turrax von den IE's
- Abbildung 13:** Schematische Darstellung der Sapromateinheiten zur BSB-Messung
- Abbildung 14:** Erträge an Biofilm-TM aus den C:N:P-Verhältnissen auf 0,8 m<sup>2</sup>
- Abbildung 15:** Erträge an Biofilm-FM aus den C:N:P-Verhältnisse auf 0,8 m<sup>2</sup>
- Abbildung 16:** Biofilmbildung mit aeroben und anaeroben Zonen in den Glasröhren von Reaktor 2
- Abbildung 17:** Wassergehalte der Biofilme aus den C:N:P-Verhältnissen (w/w)
- Abbildung 18:** Gehalte an C<sub>org.</sub> in Biofilm-TM (w/w)
- Abbildung 19:** Gehalte an C<sub>org.</sub> im Biofilm-FM (w/w)
- Abbildung 20:** Gehalte an Stickstoff im Biofilm-TM (w/w)
- Abbildung 21:** Gehalte an Stickstoff im Biofilm-FM (w/w)

**Abbildung 22:** Stickstoff/Kohlenstoff-Verhältnisse im synthetischen Medium und im Biofilm-TM

**Abbildung 23:** Quotient aus N im synthetischen Medium und N im Biofilm-TM

**Abbildung 24:** Ammonium-N Konzentrationen in den C:N:P-Läufen

**Abbildung 25:** Gehalte an Wasserstoff im Biofilm-TM (w/w)

**Abbildung 26:** Gehalte an Wasserstoff im Biofilm-FM (w/w)

**Abbildung 27:** Gehalte an Sauerstoff im Biofilm-TM (w/w)

**Abbildung 28:** Gehalte an Sauerstoff im Biofilm-FM (w/w)

**Abbildung 29:** Gehalte an Phosphor im Biofilm-TM

**Abbildung 30:** Gehalte an Phosphor im Biofilm FM

**Abbildung 31:** Verhältnis von  $C_{org.}$  und Phosphor im Biofilm-TM

**Abbildung 32:** Gehalte an Calcium im Biofilm-TM

**Abbildung 33:** Gehalte an Calcium im Biofilm-FM

**Abbildung 34:** Gehalte an Calcium und Magnesium im Biofilm-TM

**Abbildung 35:** Gesamtzellzahl der Mikroorganismen im Biofilm-FM – Auszählung mit dem Fluoreszenzmikroskop

**Abbildung 36:** Lebendzellzahl im Biofilm-FM als KBE

**Abbildung 37:** Lebendzellzahl der Mikroorganismen im „aufgetauten“ und „frischen“ Biofilm-FM als KBE

**Abbildung 38:** Prozentuale Überlebensrate von Mikroorganismen aus eingefrorenem Biofilm als KBE

**Abbildung 39:** Darstellung der Artenvielfalt aus dem aufgetauten Inokulum auf Standard I Nähragar

**Abbildung 40:** Gehalte an Proteinen im Biofilm-TM

**Abbildung 41:** Gehalte an Proteinen im Biofilm-FM

**Abbildung 42:** Gehalte an Kohlenhydraten im Biofilm-TM

**Abbildung 43:** Gehalte an Kohlenhydraten im Biofilm-FM

- Abbildung 44:** Summe der Proteine und Kohlenhydrate im Biofilm-TM (w/w)
- Abbildung 45:** Summe der Proteine und Kohlenhydrate im Biofilm-FM (w/w)
- Abbildung 46:** Quotienten aus Proteine/Kohlenhydratgehalte im Biofilm-TM
- Abbildung 47:** Quotient aus Protein-Gehalt und N-Gehalt im Biofilm-TM
- Abbildung 48:** Protein-real und Protein-theoretisch aus Biofilm-TM
- Abbildung 49:** Quotienten aus dem Kohlenhydratgehalt und dem Stickstoffgehalt im Biofilm-TM
- Abbildung 50:** BSB-Verlaufskurven unterschiedlicher C:N:P-Verhältnisse im Sapromaten
- Abbildung 51:** Gehalte an Trockensubstanz aus den EPS-Extrakten
- Abbildung 52:** Gehalte an  $C_{org.}$  in den EPS-Extrakten (w/w)
- Abbildung 53:**  $C_{org.}$  in den EPS-Extrakten, bezogen auf ein Gramm Biofilm-TM für die CER-Extraktion (w/w)
- Abbildung 54:** Anteil von  $C_{org.}$  in den EPS-Extrakten an  $C_{org.}$  des Biofilm-TM (w/w)
- Abbildung 55:** Stickstoffgehalte in der TS aus den EPS-Extrakten
- Abbildung 56:** N Gehalt in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte je Biofilm-TM Einwaage für die CER-Extraktion (w/w)
- Abbildung 57:** Anteil N aus EPS an  $N_{gesamt}$  im Biofilm-TM
- Abbildung 58:** Effektivität der Calciumrückhaltung durch CER (w/w)
- Abbildung 59:** Proteinbanden auf den Gelen aus EPS-Extrakten unterschiedlicher C:N:P-Verhältnisse
- Abbildung 60:** Bandenmuster der Proteine mit SDS-Page aus den EPS-Extrakten von 100:1:1 bis 100:10:1
- Abbildung 61:** Bandenmuster der Proteine mit SDS-Page aus den EPS-Extrakten von 100:12:1 bis 100:20:1
- Abbildung 62:** Proteingehalte in den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-FM Einwaage (w/w)
- Abbildung 63:** Proteingehalte in den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-TM Einwaage (w/w)

- Abbildung 64:** Prozentualer Anteil des Protein-Gehaltes in den EPS-Extrakten zum gesamten Proteingehalt im Biofilm-TM (w/w)
- Abbildung 65:** Kohlenhydratgehalt in den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-TM Einwaage (w/w)
- Abbildung 66:** Kohlenhydrate in den EPS-Extrakten, bezogen auf die Biofilm-FM Einwaage (w/w)
- Abbildung 67:** Prozentualer Anteil an Kohlenhydraten in den EPS-Extrakten an den Gehalten der Kohlenhydrate im Biofilm-TM (w/w)
- Abbildung 68:** G6PDH-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten aus den „frischen“ Biofilmen mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 bis 100:10:1
- Abbildung 69:** G6PDH-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten aus den „frischen“ Biofilmen mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:12:1 bis 100:20:1
- Abbildung 70:** G6PDH-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten aus den „aufgetauten“ Biofilmen mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 bis 100:10:1
- Abbildung 71:** G6PDH-Aktivitätstest mit den EPS-Extrakten aus den „aufgetauten“ Biofilmen mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:12:1 bis 100:20:1
- Abbildung 72:** Summe der analytisch erfassten Biofilm-TM Zusammensetzung (w/w)
- Abbildung 73:** Quotienten aus den Stickstoff/Calcium-Gehalten im Biofilm-TM
- Abbildung 74:** Protein- und Kohlenhydratgehalte im Biofilm-TM
- Abbildung 75:** Calciumgehalte im Biofilm-TM und Erträge an Trockensubstanz aus der CER-Extraktion in Abhängigkeit vom C:N:P-Verhältnis
- Abbildung 76:** Quotient der Gehalte an Proteinen und Kohlenhydraten in den EPS-Extrakten
- Abbildung 77:** Quotienten der Gehalte an Proteinen/Kohlenhydraten aus den EPS-Extrakten und aus Biofilm-TM

**Verzeichnis der Tabellen:**

- Tabelle 1:** Zusammensetzung von Biofilmen nach Sutherland, 2001
- Tabelle 2:** Zusammensetzung bakterieller EPS (Wingender et al., 1999)
- Tabelle 3:** Zusammensetzung des Nährmediums in den C:N:P-Versuchsläufen
- Tabelle 4:** Konzentrationen an  $\text{NH}_4\text{Cl}$  [53,49] in den unterschiedlichen C:N:P-Versuchsläufen
- Tabelle 5:** Anzahl der Versuchsläufe mit den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 bis 100:20:1
- Tabelle 6:** Ammonium-N Gehalte in den C:N:P-Verhältnissen von 100:1:1 bis 100:10:1 am Start, Ende und die Differenz
- Tabelle 7:** Ammonium-N Gehalte in den C:N:P-Verhältnissen von 100:12:1 bis 100:20:1, am Start, Ende und die Differenz
- Tabelle 8:** Konzentrationen an C, H, O, N, P, Ca im Biofilm-TM
- Tabelle 9:** C, H, O, N, P, Ca in mol im Biofilm-TM
- Tabelle 10:** Angleich von mol C, H, O, N, P, Ca auf 1 mol Calcium
- Tabelle 11:** Summenformeln aus den Analyseergebnissen von Biofilmen aus unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen
- Tabelle 12:** %-Anteile der aktiven Mikroorganismen aus dem eingefrorenen Biofilm nach dem Auftauen
- Tabelle 13:** %-Anteile des organischen Kohlenstoffs aus den EPS-Extrakten an den Anteilen des organischen Kohlenstoffs im Biofilm-TM bei unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen
- Tabelle 14:** Prozentualer Gehalt an organischem Kohlenstoff in der Trockensubstanz der EPS-Extrakte aus den unterschiedlichen C:N:P-Verhältnissen
- Tabelle 15:** Anteil des Proteingehaltes in EPS vom Proteinanteil im Biofilm-TM
- Tabelle 16:** Stickstoffgehalte in der EPS-Trockenmasse (EPS-TM), in Bezug zu den realen und theoretischen Proteingehalten
- Tabelle 17:** Anteil der Kohlenhydrate in den EPS-Extrakten am Kohlenhydratgehalt des gesamten Biofilms
- Tabelle 18:** Zusammensetzung des Nährmediums in den C:N:P-Ansätzen von 100:1:1 bis 100:10:1

**Tabelle 19:** Zusammensetzung des Nährmediums in den C:N:P-Ansätzen von 100:12:1 bis 100:20:1

**Tabelle 20:** Zusammensetzung der Spurenelementstammlösung

### Tabellen mit den Messdaten zu den Abbildungen

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 14 und 15**

Erträge an Biofilm-TM und Biofilm-FM aus den C:N:P-Verhältnissen

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	Mittelwerte g		Mittelwerte g
100:1:1	0,9±0,24	5	18,3±3,3
100:5:1	1,3±0,21	5	44,6±5,2
100:8:1	1,3±0,23	6	22,3±2,0
100:10:1	2,6±0,52	6	28,2±9,9
100:12:1	3,3±0,54	8	37,4±5,7
100:14:1	3,5±0,49	8	33,7±4,8
100:18:1	3,7±0,50	5	30,0±14,2
100:20:1	3,6±0,05	5	18,7±0,2

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 17**

Wassergehalte in den Biofilmen

C:N:P	Wassergehalt	n
	Mittelwerte %	
100:1:1	97,6±0,45	5
100:5:1	96,4±0,23	5
100:8:1	94,4±0,71	6
100:10:1	90,8±1,35	6
100:12:1	91,2±1,20	8
100:14:1	89,8±0,28	8
100:18:1	86,0±3,00	5
100:20:1	81,0± -	5

Aus den Werten der Tabelle zeigt sich eine Gradengleichung nach  $y = ax + b$  ( $x =$  Stickstoffgehalt;  $y =$  Wassergehalt)  $\Rightarrow y = -0,828x + 100,01$ ;  $R^2 = 0,9304$ .

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 18 und 19**

Biofilm-TM und Biofilm-FM,  
C<sub>org.</sub>-Gehalte

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	Mittelwerte %		Mittelwerte %
100:1:1	46,9±1,05	5	1,2±0,10
100:5:1	47,4±0,71	5	1,7±0,18
100:8:1	45,8±1,60	6	2,6±0,36
100:10:1	47,1±0,20	6	4,3±0,55
100:12:1	46,8±0,70	8	4,4±0,55
100:14:1	48,2±0,80	8	4,9±0,20
100:18:1	47,1±0,37	5	6,5±0,30
100:20:1	45,9±0,15	5	8,7±0,02

Aus den Werten der Tabelle kann eine Gradengleichung mit  $y = ax + b$  ( $x = \text{Stickstoffgehalt}$ ;  $y = \text{C}_{\text{org.}}$ -Gehalt)  $\Rightarrow y = 0,994x - 0,1857$ ;  $R^2 = 0,9469$ , erstellt werden.

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 20 und 21**

Messdaten Biofilm-TM und Biofilm-FM,  
Stickstoff-Gehalte

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	Mittelwerte %		Mittelwerte %
100:1:1	3,8±0,70	5	0,10±0,01
100:5:1	6,6±0,87	5	0,23±0,06
100:8:1	7,9±0,38	6	0,45±0,05
100:10:1	9,1±1,29	6	0,80±0,04
100:12:1	8,6±0,68	8	0,80±0,04
100:14:1	7,5±0,36	8	0,80±0,05
100:18:1	8,5±0,51	5	1,10±0,07
100:20:1	6,8±0,33	5	1,30±0,06

Aus den Biofilm-FM Werten der obigen Tabelle kann folgende Gradengleichung mit  $y = ax + b$  ( $x = \text{Stickstoffgehalt im synthetischen Medium}$ ;  $y = \text{Stickstoffgehalt im Biofilm}$ )  $\Rightarrow y = 0,1643x - (0,0418)$ ;  $R^2 = 0,9499$ , erstellt werden.

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 22**

Die Stickstoff/Kohlenstoff<sub>org.</sub>-Verhältnisse im synthetischen Medium und Biofilm-TM

Synth.-Medium mg/N je 100 mg/C <sub>org.</sub>	Biofilm-TM mg/N je 100 mg/C <sub>org.</sub>
1	8,1
5	13,9
8	17,2
10	19,3
12	18,4
14	16,4
18	18,1
20	14,6

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 23**

Quotient aus N im synth.-Medium und N im Biofilm-trocken

C:N synth.- Medium	N <sub>synth.-Medium</sub> /N <sub>Bio- film-TM</sub>
100:1	0,12
100:5	0,36
100:8	0,47
100:10	0,52
100:12	0,65
100:14	0,85
100:18	0,99
100:20	1,37

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 25 und 26**

Messdaten Biofilm-TM und Biofilm-FM,  
Wasserstoffgehalte

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	Mittelwerte %		Mittelwerte %
100:1:1	7,02±0,19	5	0,21±0,04
100:5:1	7,00±0,16	5	0,28±0,04
100:8:1	6,80±0,40	6	0,41±0,01
100:10:1	7,00±0,23	6	0,62±0,09
100:12:1	6,90±0,15	8	0,70±0,04
100:14:1	7,30±0,24	8	0,73±0,04
100:18:1	7,00±0,07	5	1,20±0,09
100:20:1	7,00±0,09	5	1,30±0,06

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 27 und 28**

Messdaten aus Biofilm-TM und  
Biofilm-FM, Sauerstoff-Gehalte

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	Mittelwerte %		Mittelwerte %
100:1:1	38,2±1,60	5	1,0±0,15
100:5:1	34,2±1,00	5	1,3±0,14
100:8:1	33,5±1,00	6	1,9±0,16
100:10:1	33,1±1,90	6	3,0±0,70
100:12:1	35,1±1,62	8	3,2±0,40
100:14:1	34,3±0,85	8	3,5±0,10
100:18:1	35,2±0,85	5	4,0±0,05
100:20:1	37,0±0,10	5	7,0± -

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 29 und 30**

Messdaten Biofilm-TM und -FM,  
Phosphor-Gehalte

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	Mittelwerte mg/g		Mittelwerte mg/g
100:1:1	9,3±0,32	5	0,56±0,03
100:5:1	11,9±1,94	5	0,56±0,04
100:8:1	11,3±1,77	6	1,04±0,06
100:10:1	12,1±1,90	6	0,91±0,10
100:12:1	11,0±1,50	8	0,80±0,15
100:14:1	9,3±0,80	8	1,00±0,10
100:18:1	9,9±1,20	5	1,70±0,15
100:20:1	8,9±1,60	5	1,60±0,13

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 31**

Verhältnis von C<sub>org.</sub> und P im  
synthetischen Medium und im Biofilm-TM

C:P im syntheti- schen Medium	C:P im Biofilm-TM
100:1:1	100:2,0
100:5:1	100:2,5
100:8:1	100:2,5
100:10:1	100:2,6
100:12:1	100:2,4
100:14:1	100:2,0
100:18:1	100:2,1
100:20:1	100:1,9

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 32 und 33**

Messdaten Biofilm-TM und Biofilm-FM,  
Calcium-Gehalte

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	Mittelwerte mg/g		Mittelwerte mg/g
100:1:1	3,1±0,05	5	0,09±0,001
100:5:1	2,6±0,16	5	0,10±0,001
100:8:1	2,8±0,21	6	0,16±0,050
100:10:1	2,3±0,30	6	0,19±0,024
100:12:1	2,0±0,11	8	0,18±0,010
100:14:1	1,4±0,18	8	0,16±0,021
100:18:1	1,4±0,13	5	0,17±0,015
100:20:1	1,3±0,18	5	0,19±0,026

Aus den Werten der Tabelle ergibt sich eine Gradengleichung mit  $y = ax + b$  ( $x =$  Stickstoffgehalt;  $y =$  Calciumgehalt)  $\Rightarrow y = (-0,275) x + 3,35$ ;  $R^2 = 0,9318$ .

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 35**

Gesamtzellzahl im  
„aufgetauten“ und „frischen“ Biofilm-FM;  
Fluoreszenzmikroskopische Auszählung

C:N:P	Biofilm-FM, „frisch“	Biofilm-FM, „aufgetaut“
	Zellzahl / mg · 10 <sup>6</sup>	Zellzahl / mg · 10 <sup>6</sup>
100:1:1	0,90	0,47
100:5:1	1,66	2,10
100:8:1	13,80	2,00
100:10:1	2,72	3,00
100:12:1	4,30	4,70
100:14:1	7,10	5,10
100:18:1	13,00	5,40
100:20:1	5,20	3,70

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 36**

Lebendzellzahl im Biofilm-nass als KBE

C:N:P	Biofilm-FM	n
	Mittelwerte KBE/mg · 10 <sup>7</sup>	
100:1:1	0,70±0,15	3
100:5:1	1,20±0,24	3
100:8:1	2,20±0,20	4
100:10:1	2,90±0,04	4
100:12:1	18,4±1,70	6
100:14:1	3,60±0,79	5
100:18:1	2,30±0,25	3
100:20:1	2,10±0,40	3

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 37**Lebendzellzahl im „aufgetauten“  
und „frischen“ Biofilm-FM als KBE

C:N:P	Biofilm-FM, „frisch“	Biofilm-FM, „aufgetaut“
	Mittelwerte KBE/mg · 10 <sup>7</sup>	Mittelwerte KBE/mg · 10 <sup>7</sup>
100:1:1	1,0	0,1
100:5:1	1,2	0,8
100:8:1	3,7	1,4
100:10:1	3,0	3,0
100:12:1	12,4	4,7
100:14:1	3,7	1,2
100:18:1	3,2	1,8
100:20:1	3,5	2,0

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 40 und 41**Messdaten Biofilm-TM und  
Biofilm-FM, Proteingehalte

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	Mittelwerte mg/g		Mittelwerte mg/g
100:1:1	272±20,5	5	7,1±0,2
100:5:1	379±46,2	5	14,9±3,5
100:8:1	455±33,9	6	27,8±1,8
100:10:1	429±5,0	6	45,1±2,4
100:12:1	435±46,0	8	42,6±7,6
100:14:1	368±24,1	8	38,3±3,2
100:18:1	387±31,5	5	73,3±10,2
100:20:1	349±5,0	5	65,3±6,6

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 42 und 43**Messdaten Biofilm-TM und Biofilm-FM,  
Kohlenhydratgehalte

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	Mittelwerte mg/g		Mittelwerte mg/g
100:01:01	403±10,5	5	10,3±1,2
100:05:01	358±21,0	5	13,1±2,3
100:08:01	244±26,2	6	13,5±1,9
100:10:01	290±21,5	6	15,6±4,1
100:12:01	302±36,7	8	25,3±4,5
100:14:01	263± 8,2	8	27,0±1,0
100:18:01	332±32,0	5	53,3±6,9
100:20:01	389±21,0	5	63,1±14,5

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 44 und 45**Summe der Gehalte an Kohlenhydraten  
und Proteinen im Biofilm-TM und im  
Biofilm-FM

C:N:P	Biofilm-TM	n	Biofilm-FM
	%		%
100:01:01	67,5	5	1,74
100:05:01	73,7	5	2,80
100:08:01	69,8	6	4,13
100:10:01	71,9	6	6,07
100:12:01	73,7	8	6,79
100:14:01	63,1	8	6,53
100:18:01	73,0	5	12,66
100:20:01	73,8	5	12,84

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 51**Gehalte an Trockensubstanz  
aus den EPS-Extrakten

C:N:P	EPS-Extrakte
	Mittelwerte mg/g
100:1:1	802±11
100:5:1	749± 32
100:8:1	664±45
100:10:1	557±46
100:12:1	405±35
100:14:1	382±160
100:18:1	371±95
100:20:1	310±77

Aus den Werten der Tabelle wird eine Gradengleichung mit  $y = ax + b$  ( $x = \text{Stickstoffgehalt}$ ;  $y = \text{Trockensubstanz in den EPS-Extrakten}$ )  $\Rightarrow y = (-75,381)x + 869,21$ ;  $R^2 = 0,9476$ , erstellt.

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 55**

Gehalte an Stickstoff in der  
Trockensubstanz der EPS-Extrakte

C:N:P	EPS-Extrakte
	Stickstoff mg/g
100:1:1	2,4±0,3
100:5:1	6,3±3,3
100:8:1	10,0±3,3
100:10:1	12,0±4,2
100:12:1	32,0±5,2
100:14:1	31,0±3,8
100:18:1	28,4±4,2
100:20:1	30,0±6,0

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 62 und 63**

Messdaten aus den EPS-Extrakten, Proteingehalte

C:N:P	Biofilm-TM		Biofilm-FM	
	frisch %	aufgetaut %	frisch %	aufgetaut %
100:1:1	1,15	1,80	0,05	0,05
100:5:1	1,88	1,39	0,10	0,05
100:8:1	5,08	4,10	0,28	0,21
100:10:1	3,29	2,66	0,33	0,24
100:12:1	4,19	4,62	0,42	0,40
100:14:1	3,58	5,20	0,32	0,52
100:18:1	1,84	2,65	0,29	0,30
100:20:1	1,77	2,55	0,17	0,26

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 64**

Prozentualer Anteil des Proteingehaltes  
in den EPS-Extrakten zum gesamten  
Proteingehalt im Biofilm-TM

	Biofilm- TM	
C:N:P	frisch %	aufgetaut %
100:1:1	3,4	7,2
100:5:1	4,3	4,4
100:8:1	10,6	9,2
100:10:1	4,0	4,6
100:12:1	7,7	9,6
100:14:1	7,7	14,4
100:18:1	3,5	5,9
100:20:1	3,7	6,0

Tabelle mit den Messdaten zu den **Abbildungen 65 und 66**

Messdaten aus den EPS-Extrakten, Kohlenhydratgehalte

	Biofilm- TM		Biofilm- FM	
C:N:P	frisch %	aufgetaut %	frisch %	aufgetaut %
100:1:1	1,72	4,40	0,069	0,243
100:5:1	1,67	1,63	0,084	0,052
100:8:1	1,86	2,75	0,102	0,143
100:10:1	2,00	2,20	0,160	0,170
100:12:1	2,30	2,30	0,230	0,197
100:14:1	1,56	3,90	0,140	0,195
100:18:1	1,00	1,75	0,154	0,192
100:20:1	1,40	2,54	0,121	0,151

Tabelle mit den Messdaten zur **Abbildung 67**

Prozentualer Anteil der Kohlenhydrate in  
den EPS-Extrakten am Kohlenhydratgehalt  
im Biofilm-trocken

	Biofilm- TM	
C:N:P	frisch %	aufgetaut %
100:1:1	4,4	20,3
100:5:1	5,1	3,7
100:8:1	8,5	12,0
100:10:1	10,0	7,0
100:12:1	12,6	6,1
100:14:1	11,1	15,1
100:18:1	6,8	6,4
100:20:1	6,6	6,5

## 8 Literatur

Applegate DH (1991): Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotech Bioeng* 37, 17-25

Azeredo J, Lazarova V, Oliveira R (1999): Methods to extract the exopolymeric matrix from biofilms: a comparative study. *Wat Sci Tech* 39, 7, 342-250

Batchelor SE, Cooper M, Chhabra SR, Glover LA, Stewart GSAB, Williams P, Prosser JI (1997): Cell density-regulated recovery of starved biofilm population of ammonia-oxidizing bacteria. *Appl Environ Microbiol*, 2281-2286

Bitton, G (1994) : Wastewater microbiology. Wiley-Liss, Inc., New York. In: Biofilms in wastewater treatment: an interdisciplinary approach. Wuertz, S; Bishop, PL; Wilderer, eds, PA; IWA Publishing, UK, chapter 8, 2003

Bradford M (1976): A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254

Brennstuhl AM, Doherty PE, King PJ, Dunstall TG (1991): The effects of biofouling on the corrosion of nickel heat exchanger alloys at Ontario Hydro. In: Flemming HC (1995): Biofilme als mikrobielle Lebensform. In: Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz – Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen. Hrsg Brill H; Gustav Fischer Verlag, 25-27

Bresle A (1981): Bakterielle Korrosion: lebensdauerbestimmender Faktor in Wasserwärmesystemen. *Maschinenmarkt* 87, 1679-1681. In: Flemming HC (1995): Biofilme als mikrobielle Lebensform. In: Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz – Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen. Hrsg Brill H; Gustav Fischer Verlag, 25-27

Bryers J, Characklis W (1981): Early fouling biofilm formation in a turbulent flow system: overall kinetics. *Wat Res* 15, 483-491. In: Lazarova V, Manem J (1995): Review paper: Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Wat Res* 29, 10, 2227-2245

Bryers JD, Characklis WG (1990): Biofilms in water and wastewater treatment. In: Biofilms (eds Characklis WG, Marshall KC), John Wiley and Sons, Inc., New York

Bura R, Cheung M, Liao B, Finlayson J, Lee BC, Droppo IG, Leppard GG, Liss SN (1998): Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Wat Sci Tech* 37, 4-5, 325-333

Chandy JP, Angles ML (2001): Determination of nutrients limiting biofilm formation and the subsequent impact of disinfectant decay. *Wat Res* 35, 11, 2677-2682

Choi E, Yun Z, Park Y, Lee H, Jeong H, Kim K, Lee H, Rho K, Gil K (2001): Extracellular polymeric substances in relation to nutrient removal from a sequencing batch biofilm reactor. *Wat Sci Tech* 43, 6, 185-192

Costerton JW, Cheng KJ, Geesey GG, Ladd TI, Nickel JC, Dasgupta M, Marrie TJ (1987): Bacterial biofilms in nature and disease. *Annu Rev Microbiol* 41, 435-464

Costerton JW, Boivin J (1991): Biofilms and Corrosion. In: HC Flemming and GG Geesey, eds; *Biofouling and biocorrosion in industrial water systems*. Springer, Berlin, Heidelberg, 195-204; In: Flemming HC (1995): Biofilme als mikrobielle Lebensform. In: *Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz – Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen*. Hrsg Brill H; Gustav Fischer Verlag, 25-27

Costerton JW, Lewandowski Z, Caldwell DE, Korber DR, Lappin-Scott HM (1995): Microbial biofilms. *Annu Rev Microbiol* 49, 711-745

Costerton JW, Stewart PS, Philip SS, Greenberg EP (1999): Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322

Costerton JW (2000): Biofilms in the new millennium: musings from a peak in Xanadu. In: *Community structure and co-operation in biofilms*; *Soci gen Microbiol*, University Press, Cambridge, 329-344

Dalientoft E, Thulin P (1997): The use of the Kaldness suspended carrier process in treatment of wastewater from the forest industry. *Wat Sci Tech* 35, 2-3, 123-130

Decho AW (1999): Chemical communication within microbial biofilms: chemotaxis and quorum sensing in bacterial cells. In: *Microbial extracellular polymeric substances; Characterization, structure and function*; Wingender J, Neu T, Flemming HC eds; Springer-Verlag, 1999, 155-169

DIN 58970 - 1 Laborzentrifugen, Teil 1: Begriffe, Prüfung, Kennzeichnung; Verlag: Beuth, Köln/Berlin, März 1996

DIN 38406-E5; Bestimmung von Ammonium-N, Verlag: Beuth, Köln/Berlin, Oktober 1983

DIN EN ISO 11885 - Bestimmung von 33 Elementen durch induktiv gekoppelte Plasma - Atom-Emissionsspektrometrie, Verlag: Beuth, Köln/Berlin, April 1998

DIN EN ISO 13346 (vorher 11466) - Bestimmung von Spurenelementen und Phosphor, Verlag: Beuth, Köln/Berlin, August 2000

DIN EN 1189 D11: Bestimmung von Phosphor, Verlag: Beuth, Köln/Berlin, Februar 1994

Drenkard E, Ausubel FM (2002): *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740-743

Dubois, M, Gilles, K A, Hamilton, J K, Rebers, P A. Smith, F, (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28, 350-356

Ehrlich, HL (1990): Geomicrobiology. Marcel Dekker, New York, Basel; 557-602; In: Flemming HC (1995): Auswirkungen mikrobieller Materialzerstörung. In: *Mikrobielle*

Materialzerstörung und Materialschutz – Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen. Hrsg Brill H; Gustav Fischer Verlag, 15-23

Filisetti-Cozzi TM, Carpita NC (1991): Measurement of uronic acids without interference of neutral sugars. *Anal Biochem* 197, 157-162

Flemming HC (1992): Biofilme und Wassertechnologie, Teil 2: Unerwünschte Biofilme – Phänomene und Mechanismen. *gwf* 133, 3, 119-130

Flemming HC (1995); Auswirkungen mikrobieller Materialzerstörung. In: *Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz – Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen*, Hrsg Brill H; Gustav Fischer Verlag, 15-77

Flemming HC (1995a): Biofilme als mikrobielle Lebensform. In: *Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz – Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen*. Hrsg Brill H; Gustav Fischer Verlag, 25-27

Flemming HC (1995b): Biofilme und mikrobielle Materialzerstörung. In: *Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz*. Hrsg Brill H, Gustav Fischer Verlag, 24-47

Flemming HC (1995c): Analyse von Biofilmen. In: *Biofouling bei Membranprozessen*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 109-114

Flemming HC, Schaule G (1996a): Measures against biofilms. In: *Microbially influenced corrosion of materials*. Springer Verlag Berlin Heidelberg, 121-139

Flemming HC (1996b): The forces that keeps biofilms together. *DECHEMA Monographs* 133, 311-316

Flemming HC (2000a): Biofilme – das Leben am Rande der Wasserphase. *Nachr Chemie Tech Lab* 48, 442-447

Flemming HC, Wingender J (2000b): Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) – der Baustoff für Biofilme. *Vom Wasser* 94, 245-266

Flemming HC, Wingender J, Mayer C, Körstgens V, Borchard W (2000c): Cohesiveness in biofilm polymers. In: *Community structure and co-operation in biofilms*; *Sociogen Microbiol*, University Press, Cambridge, 87-106

Flemming HC, Wingender J (2002): Was Biofilme zusammenhält. *Chemie in unserer Zeit* 36, 1, 30-42

Flemming HC, Wingender J (2003): The crucial role of extracellular polymeric substances in biofilms. In: *Biofilms in wastewater treatment: an interdisciplinary approach*. Wuertz S, Bishop PL, Wilderer PA, eds; IWA Publishing, UK; Chapter 8

Fletcher M, Flodgat GD (1973): An electronmicroscopie demonstration of an acidic polysaccharide involved in the adhesion of a marine bacterium to solid surface. *J. gen Microbiol* 74, 325-334. In: Lazarova V, Manem J (1995): Review paper: Biofilm

characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Wat Res* 29, 10, 2227-2245

Frølund B, Griebe T, Nielsen PH (1995): Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl Microbiol Biotechnol* 43, 755-761

Frølund B, Palmgren R, Keiding K, Nielsen PH (1996): Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat Res* 30, 8, 1749-1758

Hartmann L (1967): Influence of turbulence on the activity of bacterial slimes. *J Wat Pollut control Fed* 39, 958-964. In: Lazarova V, Manem J (1995): Review paper: Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Wat Res* 29, 10, 2227-2245

Heal RD, Parsons AT (2002): Novel intercellular communication system in *Escherichia coli* that confers antibiotic resistance between physically separated populations. *J Appl Microbiol* 92 (6), 1116-1122

Helmer C, Tromm C, Hippen A, Rosenwinkel KH, Seyfried CF, Kunst S (1999): Einstufige biologische Stickstoffelimination durch Nitritation und anaerobe Ammonium-Oxidation im Biofilm. *gwf Wasser Abwasser*, 140, 9, 622-632

Higgins MJ, Novak JT (1997): Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J Environ Engine*, May, 479-485

Hoffman M, Decho AW (1999): Extracellular enzymes within microbial biofilms and the role of the extracellular polymer matrix. In: *Microbial extracellular polymeric substances. Characterization, structure and function*; Wingender J, Neu T, Flemming HC eds; Springer-Verlag, 217-230

Horn H (2000): Microelectrodes and tube reactors in biofilm research. In: *Biofilms – Investigative Methods & Applications*, Technomic Publishing, Lancaster Basel, 225-241

Jahn A, Nielsen, PH (1998): Cell biomass and exopolymer composition in sewer biofilms. *Wat Sci Tech* 37, 1, 17-24

Jahn A, Nielsen PH (2000): Cell biomass determination in sewer biofilms and a monospecies *Pseudomonas putida* biofilm. In: *Biofilms – Investigative Methods & Applications*, Technomic Publishing, Lancaster Basel, 69-82

Johnsrud, SC (1997): Biotechnology for solving slime problems in the pulp and paper industry. In: *Advances in Biochemical Engineering/Bitotechnology*, Vol. 57, Managing Editor: Scheper T; Springer Verlag, Berlin Heidelberg, 311-328

Kalmbach S, Manz W, Szewzyk U (2000): Development of a new method to termine the metabolic potential of bacteria in drinking water biofilms: probe active counts (PAC). In: *Biofilms – Investigative Methods & Applications*, Technomic Publishing, Lancaster Basel, 107-121

- Keiding K, Nielsen PH (1997): Desorption of organic macromolecules from activated sludge: Effect of ionic composition. *Wat Res* 31, 7, 1665-1672
- Lazarova V, Manem J (1995): Review paper: Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Wat Res* 29, 10, 2227-2245
- Levy SB (1998): Antibiotikaresistenz – eine globale Herausforderung. *Spektrum der Wissenschaft* 5, 34-42
- Lorenz MG, Wackernagel W (1994): Bacterial gene transfer by natural genetic transformation in the environment. *Microbiol Rev* 58, 563-602
- Lowry, O H, Rosenbrough, N J, Farr, A L, Randall, R J (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265-275
- Martienssen M, Simon J (1997): Reinigung von Abwasser aus Emulsionsspaltanlagen durch kombinierten Einsatz von biologischer Behandlung und chemischer Naßoxidation. *Korrespondenz Abwasser*, 44, 1, 110-114
- Martienssen M (2000): Simultaneous catalytic detoxification and biodegradation of organic peroxides during biofilm process. *Wat Res* 34, 16, 3917-3926
- Miserez K, Philips S, Verstraete W (1999): New biology for advanced wastewater treatment. *Wat Sci Tech* 40, 4-5, 137-144
- Martin-Cereceda M, Jorand F, Guinea F, Block JC (2001): Characterization of extracellular polymeric substances in rotating biological contactors and activated sludge flocs. *Environ Technol* 22, 951-959
- Møller S, Korber DR, Wolfaardt GM, Molin S, Caldwell DE (1997): Impact of nutrient composition on a degradative biofilm community. *Appl Environ Microbiol*, 63, 6, 2432-2438
- Neu TR, Lawrence JR (1999): In situ characterisation of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm systems. In: *Microbial extracellular polymeric substances; Characterization, structure and function*; Wingender J, Neu TR, Flemming HC eds, Springer-Verlag, 21-48
- Ng FM, Dawes EA (1973): Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *Biochem J* 132, 129-140
- Nielsen PH, Jahn A, Palmgren R (1997): Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Wat Sci Tech*, 36, 1, 11-19
- Nielsen PH, Jahn A (1999): Extraction of EPS. In: *Microbial extracellular polymeric substances; Characterization, structure and function*; Wingender J, Neu TR, Flemming HC eds, Springer-Verlag, 49-72

- Nielsen P (2001): Bacterial aggregates – analysis and composition. Lecture in: 1<sup>st</sup> late summer workshop, “Interfaces in aquatic systems – colloids, biofilms, sediment/water/air”, Castle Maurach, Lake Constance
- Nolte O (1995): Tuberkulose – eine neue alte Infektionskrankheit. BIOforum, 6, 212-217
- OECD – Guideline 302 B for testing of Chemicals – Modified Zahn-Wellens-Test (1981)
- Ohashi A, Viraj de Silva DG, Mobarry B, Menem JA, Stahl DA, Rittmann BE (1995): Influence of substrate C/N ratio on the structure of multi-species biofilms consisting of nitrifiers and heterotrophs. Wat Sci Tech 32, 8, 75-84
- Örmeci B, Vesilind PA (2000): Development of an improved synthetic sludge: A possible surrogate for studying activated sludge dewatering characteristics. Wat Res 34, 4, 1069-1078
- Perlin AS, Casu B (1982): Spectroscopic methods. In: Aspinall GO (ed) The polysaccharides, Vol I. Academic Press, New York, 133-196. In: Neu TR, Lawrence JR (1999): In situ characterisation of extracellular polymeric substances (EPS) in biofilm systems. In: Microbial extracellular polymeric substances; Characterization, structure and function; Wingender J, Neu TR, Flemming HC eds, Springer-Verlag, 21-48
- Picioreanu C, van Loosdrecht MCM, Heijnen JJ (2000): Modelling and predicting biofilm structure. In: Community structure and co-operation in biofilms; Soci gen Microbiol, University Press, Cambridge, 129-166
- Pommer EH (1995): Synthetische organische Materialien. In: Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz – Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen, Hrsg Brill H; Gustav Fischer Verlag Jena Stuttgart, 111-150
- Raunkjær K, Hvitved-Jacobsen T, Nielsen PH (1994): Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. Wat Res 28, 2, 251-262
- Read RR, Costerton JW (1987): Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. Can J Microbiol 33, 1080-1090
- Rodney MD (2000): Role of biofilms in antimicrobial resistance. ASAIJ 46 (6), S47-S52
- Rusten B, Kolkinn O, Ødegaard H (1997): Moving bed biofilm reactors and chemical precipitation for high efficiency treatment of wastewater from small communities. Wat Sci Tech 35, 6, 71-79
- Rusten B, Johnson CH, Deval S, Davoren D, Cashion BS (1999): Biological pre-treatment of a chemical plant wastewater in high-rate moving bed biofilm reactors. Wat Sci Tech 39, 10, 257-264

Saborio G P, Permanne B, Soto C (2001): Sensitive detection of pathological prion protein by cyclic amplification of protein misfolding. *Nature* 411, 810 - 813

Samuelsson MO, Kirchmann DL (1990): Degradation of adsorbed protein by attached bacteria in relationship to surface hydrophobicity. *Appl Envir Microbiol* 56, 3643-3648. In : Lazarova V, Manem J (1995): Review paper: Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Wat Res* 29, 10, 2227-2245

Sand W, Bock E (1991): Biodeterioration of ceramic materials by biogenic acid. *Int Biodet* 27, 175-183. In: Flemming HC (1995): Biofilme als mikrobielle Lebensform. In: *Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz – Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen*. Hrsg Brill H; Gustav Fischer Verlag, 25-27

Schaule G, Griebe T, Flemming HC (2000): Steps in biofilm sampling and characterisation in biofouling cases. In: *Biofilms – Investigative Methods & Applications*, Technomic Publishing, Lancaster Basel, 1-11

Scheen J (1998): Bioreaktoranlage zur reproduzierbaren Bildung von Biofilmen. *UWSF – Z Umweltchem Ökotox* 10, 5, 285-288

Schneider J, Rheinheimer G (1988): Isolation methods. In: *Methods in aquatic bacteriology*. Austin B (ed.), John Wiley and sons Ltd., Chichester, 73-94

Schmitt J, Flemming HC (1999): Water binding in biofilms. *Wat Sci Tech*, 39, 7, 77-82

Schwartz T, Schmitt J, Flemming HC, Obst U (1999): Die Untersuchung von Biofilmen in Trinkwassersystemen. *gwf* 140, 3, 182-190

Severyn G (1991): Concrete protection systems for repair of deteriorated infrastructures from MIC. In: Flemming HC (1995a): Biofilme als mikrobielle Lebensform. In: *Mikrobielle Materialzerstörung und Materialschutz – Schädigungsmechanismen und Schutzmaßnahmen*. Hrsg Brill H; Gustav Fischer Verlag, 25-27

Spaeth R, Wuertz S (2000): Extraction and quantification of extracellular polymeric substances from wastewater. In: *Biofilms – Investigative Methods & Applications*. Flemming HC, Szewzyk U, Griebe T; Technomic-Publication, Lancaster Pennsylvania, 51-68

Sprenger B (1996): *Umweltmikroskopische Praxis – Mikrobiologische und biotechnologische Methoden und Versuche*. Springer-Verlag

Stark RM, Gerwig GJ, Pitman RS, Potts LF, Williams NA, Greenman J, Weinzwieg IP, Hirst TR, Millar MR (1999): Biofilm formation by *Helicobacter pylori*. *Soci Appl Bacteriol, Let Appl Microbiol* 28, 121-126

Stewart PS (2001): Multicellular resistance: biofilm. *Trends Microbio* 9, 5, 204

Stoodley P, Dodds I, Boyle JD, Lappin-Scott HM (1999): Influence of hydrodynamics and nutrients of biofilm structure. *J Appl Microbiol* 85, S19-S28

Stryer L (1990): Biochemie, Kap. Erzeugung und Speicherung von Stoffwechselenergie. Spektrum der Wissenschaft – Verlagsgesellschaft mbH, Heidelberg, 325-541

Sutherland IW (2001): The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends Microbiol* 9, 5, 222-227

Sutherland IW (2001a): Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol*, 147, 3-9

Swift S, Throup JP, Williams P, Salmond GPC, Stewart GSAB (1996): Quorum sensing: a population-density component in the determination of bacterial phenotype. *Trends Biochem Sci* 21, 214-219 In: *Biofilms in wastewater treatment: an interdisciplinary approach* (2003). Hrsg Wuertz, S; Bishop, PL; Wilderer, PA; eds; IWA Publishing, UK, chapter 8,

Thüer M, Coers K (1992): Biologische Behandlung kombiniert mit Aktivkohle-Adsorption für schwierige Abwässer aus der Formulierung von Pflanzenschutzmitteln. *gwf Wasser Abwasser* 133, Nr. 3, 113-118

Thüer M (2001): persönliche Mitteilung in Schweizerhalle/Schweiz – anlässlich eines Vortrages von J. Scheen mit dem Thema „Biofilme – Theorie und Praxis in der Umwelttechnik“ Vortrag im Juli 2001 bei der CIBA Umwelttechnik, Dr. M. Thüer in Schweizerhalle/Schweiz

van Loosdrecht MCM, Eikelboom D, Gjaltema A, Mulder A, Tjihuis L, Heijnen JJ (1995): Biofilm structures. *Wat Sci Tech* 32, 8, 35-43

Wilderer PA (1995): Technology of membrane biofilm reactors operated under periodically changing process conditions. *Wat Sci Tech* 31, 1, 173-183

Wimpenny JWT, Colasanti R (1997): A unifying hypothesis for the structure of microbial biofilms based on cellular automation models. *FEMS Microbiol Ecol* 22, 1-16

Wimpenny J (2000): An overview of biofilms as functional communities. In: *Community structure and co-operation in biofilms*. *Soci gen Microbiol*, 1-24

Wingender J, Neu TR, Flemming HC (1999): What are bacterial extracellular polymeric substances? In: *Microbial extracellular polymeric substances; Characterization, structure and function*; Wingender J, Neu T, Flemming HC eds; Springer-Verlag, 1-20

Wingender J, Jaeger KE, Flemming HC (1999a): Interaction between extracellular polysaccharides and enzymes. In: *Microbial extracellular polymeric substances; Characterization, structure and function*; Wingender J, Neu T, Flemming HC eds; Springer-Verlag, 231-251

Wolfaardt GM, Lawrence JR, Robarts RD, Caldwell SJ (1994): Multicellular organisation in a degradative biofilm community. *Appl Environ Microbiol* 60, 434-446

Wolfaardt GM, Lawrence JR, Korber DR (1999): Function of EPS. In: Microbial extracellular polymeric substances; Characterization, structure and function; Wingender J, Neu T, Flemming HC eds; Springer-Verlag, 171-200

Yu HQ, Tay JH, Fang HHP (2001): The role of calcium in sludge granulation during UASB reactor start-up. *Wat Res* 35, 4, 1052-1060

Zhang X, Bishop PL, Kupferle MJ (1998): Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Sci Tech* 37, 4-5, 345-348

Zhang X, Bishop PL, Kinkle BK (1999): Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Wat Sci Tech* 39, 7, 211-218