

Institut für Wasser und Gewässerentwicklung (IWG)
Bereich Siedlungswasserwirtschaft und Wassergütewirtschaft
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Justyna Homa

**Biofilmaktivität in Scheibentauchkörpern -
Grundlagen, Anpassung und Anwendung
des Dehydrogenasentests**

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe
Schriftenreihe SWW – Band 138 – Karlsruhe 2010

Dissertation genehmigt von der Fakultät für
Bauingenieur-, Geo- und Umweltwissenschaften
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT) 2010

Hauptreferent: em. Prof. Dr.-Ing. E.h. Hermann H. Hahn, Ph.D., Karlsruhe

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. habil. Josef Winter, Karlsruhe

Justyna Homa

Biofilmaktivität in Scheibentauchkörpern - Grundlagen, Anpassung und Anwendung
des Dehydrogenasentests

Karlsruhe: Karlsruher Institut für Technologie (KIT)
Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft, 2010
Schriftenreihe SWW Karlsruhe – Band 138
Zugl.: Karlsruhe, KIT, Diss., 2010
ISBN 978-3-9813069-1-0

ISBN 978-3-9813069-1-0

Alle Rechte vorbehalten

Satz: Institut für Wasser und Gewässerentwicklung
Bereich Siedlungswasserwirtschaft und Wassergütewirtschaft
Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Druck: E&B printware, Digital- und Schnelldruck GmbH, 76131 Karlsruhe
Printed in Germany

Vorwort des Herausgebers

Scheibentauchkörper können gewissermaßen als die robustesten biochemischen Werkzeuge der (Ab)Wassertechnologie bezeichnet werden. Sie bieten sich demzufolge auch dort an, wo entweder nur wartungsärmere Verfahren eingesetzt werden können, oder wo systematische und weitergehende urbane Wasserwirtschaft erst beginnt, also z. B. in den sich entwickelnden Ländern. Damit erklärt sich die zunehmende Befassung mit dieser Technologie.

Trotz der verständlichen Forderung nach Robustheit in Bemessung und Betrieb von Scheibentauchkörperanlagen ist es aus vielerlei Gründen angezeigt, die Leistungsfähigkeit dieser Verfahren genauestens zu erfassen und gegebenenfalls bei störenden Einflüssen kompensierende Steuerungsmaßnahmen zu ergreifen. Die quantitative Erfassung der Leistungsfähigkeit solcher Anlagen verlangt die Messung der Aktivität des Biofilms von Scheibentauchkörpern. Ist dies möglich, dann wird einerseits Entwurf und Betrieb auf eine bessere Basis gestellt und andererseits auch die Übertragbarkeit von Erfahrungen aus einem Anwendungsbereich in einen anderen (etwa mit unterschiedlichen Substraten oder bei veränderten Betriebstemperaturen) möglich.

Dies ist der Hintergrund dieser Arbeit. Es geht im Wesentlichen um „*die Entwicklung einer analytischen Prozedur zur Bestimmung der Aktivität des Biofilms in Scheibentauchkörpern*“. Das von der Autorin ausgewählte Verfahren existiert seit geraumer Zeit, ist allerdings im Hinblick auf seine Brauchbarkeit für Biofilmsysteme von Scheibentauchkörpern noch nicht systematisch geprüft worden. Es werden die „*Einflüsse verschiedener Parameter auf die Formazanproduktion bzw. Aktivität untersucht und daraus abgeleitete optimale experimentelle Bedingungen vorgestellt. Die analysierten Einflussgrößen umfassten u.a. die Probenlagerung, die Sauerstoffkonzentration, Inkubationszeit und -temperatur, den pH-Wert, das eingesetzte organische Substrat sowie die TTC-Konzentration, Extraktionslösung, Wellenlänge der Absorptionsmessung und Vorbereitung der Kontrollproben.*“ (zitiert aus der Arbeit Homa S. 92).

Aus dem oben Gesagten wird deutlich, dass es sich um eine Entwicklung resp. Adaptation eines analytischen Verfahrens handelt und dass die genaue Demonstration der Brauchbarkeit einer Analyseverfahren für die Biofilmmessung zum Einsatz in Scheibentauchkörpern also das Hauptinteresse dieser Schrift ist. Dies so, dass die Methode so einfach wie möglich bleibt, so kostengünstig wie wünschenswert und vor allem so reproduzierbar und eindeutig wie erforderlich.

Für den an der Verfahrenstechnik der Scheibentauchkörper Interessierten sind insbesondere folgende Beobachtungen und Feststellungen der Autorin von größerer Bedeutung. Es ist eine Verfahrensweise für die Biofilmentnahme mittels eingesetzter Probe(nahme)plättchen entwickelt worden, die den Biofilm in seiner Struktur weder verändert oder schädigt. Ein Vergleich von gemessener Atmungsaktivität (klassische Methode zur Beschreibung von Biofilmmessungen, die aber experimentell schwierig sein kann) mit der an gleichen Proben gemessenen Dehydrogenasenaktivität für verschiedene Biofilmmessungen (auf den von der Autorin konzipierten Probenahmeplättchen) zeigt eine sehr hohe Korrelation und belegt, dass das Verfahren der Dehydrogenasenaktivitätsmessung die Biofilmmessung sehr gut wiedergibt. Noch wichtiger für den am Transfer dieser Verfahrenstechnologie in andere Anwendungsbereiche Interessierten ist die Demonstration der eindeutigen Wiedergabe des Einflusses von Substratkonzentration und Reaktionstemperatur auf die Biofilmmessung durch die gemessenen/beobachteten Dehydrogenasenaktivitäten. Schließlich wird mit den vorgestellten Messungen auch noch einmal bestätigt, was immer wieder argumentiert oder zumindest vermutet wurde, was aber in der quantitativen Eindeutigkeit noch nicht gezeigt wurde, dass nämlich die Biofilmmessung von der Biofilmdicke in großem Maße beeinflusst wird (zunächst zunehmende Aktivität mit wachsender Dicke, bis dann eine Aktivitätsverringering wieder einsetzt, wohl aufgrund von Transportlimitierungen) und dass die sequentiellen Scheiben des Tauchkörpersystems von den ersten bis zu den abschließenden nicht nur verschieden dicke Biofilme aufweisen, sondern auch sehr unterschiedliche Aktivitäten haben (müssen). Letztere analysiert die Autorin auch mit der von Schwarz et al. vorgeschlagenen „RNA/DNA Quotientenmethode“ zur Messung biochemischer Aktivitäten. Der Bericht wird mit der für die praktische Anwendung sehr wichtigen Bemerkung beschlossen, dass *„der Dehydrogenasentest ein geeignetes Werkzeug für die Überwachung von ...Scheibentauchkörperanlagen (ist), mit dem innerhalb kurzer Zeit eine Aussage über den momentanen Zustand des Biofilms ge-*

macht... werden kann. (Dies) ...verlangt jedoch ein langfristig angelegtes Untersuchungsprogramm... Untersuchungen an definierten Segmenten auf den Scheiben, in Form von demontierbaren Trägern, sind anzuraten.“ (Zitat aus der Arbeit Homa, S. 127).

Karlsruhe, im März 2010

H. H. Hahn

Kurzfassung

Die Reinigungsleistung eines Scheibentauchkörpers hängt direkt von der Aktivität des Scheibenbewuchses ab. Daher sollten Parameter, welche den physiologischen Zustand der Biomasse beschreiben, in die Überwachung von Anlagen einbezogen werden. Dies erfordert jedoch die Entwicklung einer zuverlässigen und präzisen Methode zur Quantifizierung der Biofilmmaktivität.

Ein Biofilm ist eine Gemeinschaft unterschiedlicher Mikroorganismenarten. Da die Dehydrogenasen im Stoffwechsel der aeroben, fakultativ aeroben und anaeroben Bakterien vorkommen, ist die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität für die Analyse des Biofilms besonders geeignet.

Die Dehydrogenasenaktivität wird durch den Einsatz von Tetrazoliumsalzen ermittelt, welche als artifizielle Elektronenendakzeptoren dienen und die von den Dehydrogenasen abgetrennten Wasserstoffatome übernehmen. Gleichzeitig erfolgt die Reduktion des fast farblosen Tetrazoliumsalzes zum rötlichen, unlöslichen Formazan, dessen Menge proportional zu der Intensität mikrobieller Stoffumsetzungen ist.

Die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität findet breite Anwendung in unterschiedlichen Forschungsbereichen. Auf dem Gebiet der Abwasserreinigung wird der Dehydrogenasentest vor allem für Fadenbakterien und Belebtschlämme angewendet. Im Hinblick auf die Schwierigkeiten mit der Probenentnahme wird er jedoch seltener für Biofilme eingesetzt. Wird er dennoch verwendet, so wird die fixierte Biomasse in aller Regel von der Aufwuchsfläche abgelöst, suspendiert und weiter wie ein Belebtschlamm betrachtet. Die so bestimmte Aktivität spiegelt jedoch nicht die *in situ* Aktivität des Biofilms wider. Die Aktivitätsbestimmung ohne vorhergehende Abtrennung der Biomasse ist bislang nur für Biofilme auf Aktivkohlegranulat, Glasperlen und Sand eingesetzt worden, in welchen die Biomassenmenge viel geringer ist als in einem Scheibentauchkörper.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden die Einflüsse verschiedener Reaktionsparameter auf die Dehydrogenasenaktivität des Biofilms aus Scheibentauchkörpern analysiert (siehe Kap. 6.2) und die an dieses System angepasste Methode zur Be-

stimmung der Dehydrogenasenaktivität dargestellt und diskutiert. Die Biofilmproben stammten aus einer eigens konzipierten, konstruierten und betriebenen Scheibentauchkörperanlage im Labormaßstab mit entfernbaren Aufwuchsplättchen, die einen reproduzierbaren Aufwuchs des Biofilms auf definierten Oberflächen gewährleisteten. Die Bestimmung der Aktivität erfolgte ohne vorhergehende Abtrennung der Biomasse von dem Trägermaterial.

Die Ergebnisse zeigten, dass die modifizierte Methode zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität mit der Aktivitätsbestimmung nach Sauerstoffverbrauch korrelierte, was ein grundlegendes Kriterium für die Validierung solcher Methoden ist. Somit konnte der Dehydrogenasentest erfolgreich eingesetzt werden.

Die Untersuchungen zur Aktivitätsänderung mit zunehmender Biofilmmenge (siehe Kap. 6.5.1) zeigten, dass die Gesamtaktivität des Biofilms mit der Zunahme der Biofilmdicke bzw. des Bewuchses bis zum Erreichen eines maximalen Aktivitätswertes zunahm und nicht weiter gesteigert werden konnte.

Zudem wurde gezeigt, dass die Veränderungen der Temperatur und Substratkonzentration als Schwankungen der Dehydrogenasenaktivität erkannt werden können (siehe Kap. 6.5.2).

Darüber hinaus, basierend auf den Dehydrogenasenaktivitätswerten, wurde die Verteilung der Aktivität in der Längsachse des Scheibentauchkörpers dargestellt (siehe Kap. 6.5.3).

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit zeigen, dass die modifizierte Methode zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität für präzise, schnelle, kostengünstige und wenig arbeitsaufwändige Abschätzungen der mikrobiellen Aktivität in Scheibentauchkörpern sehr gut geeignet ist. Der Dehydrogenasentest ist als Indikator von Aktivitätseinbußen der Biomasse zu empfehlen (siehe Kap. 9), da über diese Aktivitätsmessung die störenden Einflüsse in der biologischen Stufe rechtzeitig erkannt werden können.

Abstract

The performance of rotating biological contactor systems (RBCs) is based on the metabolic activities of the microorganisms attached to the disc surface. Therefore, parameters describing their physiological status should be involved into the plant monitoring. Consequently, there is a need for the development of an accurate and reliable method for measuring biofilm activity.

Biofilm is a complex microbial community. Since the dehydrogenases are key enzymes of the aerobic, facultative aerobic and anaerobic bacterial metabolism, the determination of the dehydrogenase activity is particularly suitable for the analysis of biofilm.

The determination of the dehydrogenase activity is based on the application of tetrazolium salts, which replace the natural terminal electron acceptors. It is a water-soluble and almost colourless chemical. After reduction it converts into a water insoluble, intensely colored formazan. The amount of formazan is proportional to the dehydrogenase activity of the microorganisms.

The dehydrogenase activity method has been applied in various research areas. Within the field of wastewater treatment, it was mainly used for filamentous bacteria and activated sludge. Sampling was one of the limiting steps in the biofilm analysis. Fixed biomass was mostly removed from the support media, suspended and analysed like activated sludge. Thus the measured activity did not represent the *in situ* value. Determinations with undetached biofilm have been carried out on activated carbon granules, glass beads and sand, where the biomass amount is not comparable with the one in RBCs.

In this study, the procedure for the dehydrogenase activity determination of biofilm has been critically examined, the effect of affecting factors has been analysed and the method got adapted to biofilms in RBCs (see Chapter 6.2). The experimental investigations were performed using a laboratory-scale RBC with removable coupons as reproducible surfaces for biofilm growth, which could be collected without any interfer-

ence to the structure of the biofilm. Biomass samples were investigated without pre-separating the attached biofilm from the coupons.

The results showed that the dehydrogenase activity, measured by the modified method, correlates well with oxygen uptake rate measurement, what is the essential criterion for the validity of such assays. Therefore, the dehydrogenase activity determination could be applied successfully.

The studies of the activity variation with increasing biofilm quantity (see Chapter 6.5.1) indicated an increase of the total activity of the biofilm with increasing thickness and areal density of the biofilm until a certain value is reached and cannot be improved any further.

It was also shown that changes in the temperature or substrate concentration can be recognised as the corresponding variations of the dehydrogenase activity (see Chapter 6.5.2).

Moreover, based on the determined values of the dehydrogenase activity the distribution of the microbial activity along the axis of the rotating biological contactor was shown (see Chapter 6.5.3).

The results of this study show, that the modified method for dehydrogenase activity determination is well suited for convenient, accurate, rapid and inexpensive measurements of microbial activity in rotating biological contactors. The dehydrogenase activity is recommended as an indicator of biomass activity losses and should be used for routine measurements in biological treatment processes (see Chapter 9).

Danksagung

Ich danke Herrn em. Prof. Dr.-Ing. E.h. Hermann H. Hahn, PhD für die Möglichkeit meine Promotion am Institut für Wasser und Gewässerentwicklung im Bereich Siedlungswasserwirtschaft und Wassergütewirtschaft anfertigen zu dürfen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. habil. Josef Winter danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Ein herzlicher Dank gilt auch Herrn Prof. h.c. Dipl.-Ing. Erhard Hoffmann für die kritisch geführten Diskussionen und viele Anregungen fachlicher und praktischer Art.

Ganz besonders danke ich dem Katholischen Akademischen Ausländer-Dienst (KAAD) für die finanzielle Unterstützung durch ein Promotionsstipendium sowie alles andere was ich dank Ihnen erleben durfte.

Ebenso danke ich allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Instituts für die gute Zusammenarbeit und freundliche Atmosphäre. Ein großer Dank für das Korrekturlesen dieser Arbeit sowie zahlreiche fachliche Diskussionen. Brigitte Pfeifer, Miriam Leicht, Sageetha Balachandran, Dorothea Weingärtner, Yvonne Walter, Ramona Wander, Andreas Blank, Robertino Turković und Martin Schwarz seien stellvertretend für alle genannt.

Weiterhin gilt mein Dank dem Werkstatt- und Laborpersonal des Instituts für das fachliche Wissen und Können, auf das ich immer wieder zurückgreifen durfte.

Nicht zuletzt danke ich meinen Eltern Ilona und Jan Homa sowie meiner ganzen Familie und Freunden für die unendliche Geduld, Aufmunterung und Unterstützung in jeder Hinsicht.

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	xiii
Tabellenverzeichnis	xvi
Abkürzungsverzeichnis	xviii
1. Einleitung	1
2. Struktur der Arbeit	3
3. Grundlagen	4
3.1. Grundlagen der Biofilmverfahren.....	4
3.1.1. Biofilmverfahren in der Abwassertechnik.....	4
3.1.2. Definition und Funktionsweise eines Scheibentauchkörpers.....	6
3.1.3. Bemessung und Leistungsfähigkeit von Scheibentauchkörpern	7
3.1.4. Untersuchte Aspekte der Scheibentauchkörpertechnologie	10
3.2. Mikrobiologische Grundlagen.....	11
3.2.1. Biofilme.....	11
3.2.2. Methoden zur Biofilmanalyse	18
3.2.3. Methoden zur Quantifizierung von Biofilmen	20
3.2.4. Methoden zur Aktivitätsbestimmung.....	21
3.2.4.1. Enzymaktivität.....	24
3.2.4.2. Dehydrogenasenaktivität	27
3.2.4.3. Nukleinsäurekonzentration	32
3.2.4.4. Atmungsaktivität	35
4. Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit	37
5. Material und Methoden	40
5.1. Aufbau und Betrieb der Versuchsanlage.....	40
5.1.1. Aufbau der Versuchsanlage	40
5.1.2. Verwendetes Abwasser.....	42
5.1.3. Betrieb der Versuchsanlage	42
5.2. Analytische Methoden zur Charakterisierung des Abwassers.....	44
5.3. Analytische Methoden zur Charakterisierung des Biofilms.....	45
5.3.1. Bestimmung des Trockengewichts.....	45

5.3.2. Bestimmung von Glührückstand und Glühverlust.....	45
5.4. Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität.....	46
5.4.1. Konventionelle Methode.....	46
5.4.2. Modifizierte Methode.....	48
5.4.2.1. Herstellung der Lösungen.....	48
5.4.2.2. Wellenlänge der Absorptionsmessung.....	49
5.4.2.3. Ausführung.....	49
5.4.2.4. Aufbereitung der Kontrollproben.....	51
5.4.2.5. Erstellung der Kalibriergeraden.....	51
5.4.2.6. Berechnung der Ergebnisse.....	52
5.5. Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration.....	53
5.5.1. RNase-freies Arbeiten.....	54
5.5.2. Herstellung der Puffer und Lösungen.....	54
5.5.3. Probenahme und Probenaufbereitung.....	55
5.5.4. HPLC-Messung.....	57
5.5.5. Kalibration.....	59
5.5.6. Berechnung der Ergebnisse.....	61
5.6. Bestimmung der Atmungsaktivität.....	61
6. Ergebnisse.....	64
6.1. Reinigungsleistung der Anlage.....	64
6.1.1. BSB ₅ -Elimination.....	65
6.1.2. Stickstoffelimination.....	65
6.2. Methodenentwicklung zur Bestimmung der Biofilmaktivität.....	67
6.2.1. Probenlagerung.....	67
6.2.2. Sauerstoffanwesenheit.....	68
6.2.3. Inkubationstemperatur.....	70
6.2.4. pH-Wert.....	71
6.2.5. Organisches Substrat.....	72
6.2.6. Konzentration des Tetrazoliumsalzes.....	73
6.2.7. Inkubationszeit.....	75
6.2.8. Stabilität des Formazans.....	76
6.2.9. Extinktionskoeffizient.....	76

6.2.10. Vorbereitung der Kontrollproben.....	77
6.3. Vergleich der konventionellen und der modifizierten Methode.....	78
6.4. Überprüfung der modifizierten Methode.....	79
6.5. Anwendung der modifizierten Methode.....	81
6.5.1. Bestimmung der Aktivitätsänderung mit zunehmender Biofilmmenge.....	81
6.5.2. Bestimmung der Aktivität bei wechselnder Temperatur und Substratkonzentration.....	82
6.5.3. Verteilung der Dehydrogenasenaktivität.....	85
6.6. Verteilung der Nukleinsäuren.....	86
6.6.1. Profil der DNA-Konzentration.....	86
6.6.2. Profil der RNA-Konzentration.....	87
6.6.3. Profil des RNA/DNA-Verhältnisses.....	88
7. Diskussion.....	90
7.1. Reinigungsleistung der Anlage.....	90
7.1.1. BSB ₅ -Elimination.....	90
7.1.2. Stickstoffbilanz.....	90
7.2. Methodenentwicklung zur Bestimmung der Biofilmaktivität.....	91
7.2.1. Probenlagerung.....	93
7.2.2. Sauerstoffanwesenheit.....	94
7.2.3. Inkubationstemperatur.....	95
7.2.4. pH-Wert.....	96
7.2.5. Organisches Substrat.....	98
7.2.6. Konzentration des Tetrazoliums Salzes.....	99
7.2.7. Inkubationszeit.....	100
7.2.8. Extraktion.....	104
7.2.9. Extinktionskoeffizient.....	105
7.2.10. Vorbereitung der Kontrollproben.....	106
7.2.11. Berechnung der Dehydrogenasenaktivität.....	107
7.3. Vergleich der konventionellen und der modifizierten Methode.....	107
7.4. Überprüfung der modifizierten Methode.....	109
7.5. Anwendung der modifizierten Methode.....	111
7.5.1. Aktivitätsänderung mit zunehmender Biofilmmenge.....	111

7.5.2. Einfluss der Substratkonzentration und Temperatur	116
7.6. Axiale Verteilung der Biomasse und Aktivität des Biofilms	119
7.6.1. Biomasseverteilung	119
7.6.2. Verteilung der Aktivität.....	121
8. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen	124
9. Empfehlungen für die Anwendung der Methode	127
Literaturverzeichnis	129
Schriftenreihe SWW - Karlsruhe	140

Abbildungsverzeichnis

Abb. 3.1: Systematische Einteilung von Biofilmverfahren (ATV-DVWK IG-5.6, 2004) ..	5
Abb. 3.2: Schematische Darstellung eines Abwasserbiofilms (MARTÍN-CERECEDA et al., 2002a)	11
Abb. 3.3: Schema des Bakterienmetabolismus (verändert nach MUDRACK & KUNST, 1994)	12
Abb. 3.4: Mikrobielle Ökologie in einem ausgewachsenen Biofilm (nach FLEMMING, 2007)	14
Abb. 3.5: Zeitlicher Verlauf des Biofilmwachstums (nach FLEMMING, 1991)	15
Abb. 3.6: Entwicklungsstadien eines Biofilms (nach FLEMMING & WINGENDER, 2001).	16
Abb. 3.7: Einige Methoden zur Diagnose, Analyse und Untersuchung von Biofilmen (verändert nach LAZAROVA & MANEM, 1995; PAUL & CLARK, 1996; AMANN et al., 1998 und FLEMMING et al., 2000)	19
Abb. 3.8: Grafische Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung: (a) Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion von der Substratkonzentration, (b) Linearisierung nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung der Konstanten K_m und V_{max}	26
Abb. 3.9: Reduktion des Tetrazoliumsalzes anhand des Beispiels von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)	28
Abb. 5.1: Schema der Versuchsanlage	40
Abb. 5.2: Versuchsanlage mit entfernbaren Plättchen für die Biofilmprobenentnahme	41
Abb. 5.3: Flussdiagramm für die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität mit der konventionellen Methode	47
Abb. 5.4: Absorbanzspektrum von 1,3,5-Triphenylformazan	49
Abb. 5.5: Flussdiagramm für die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität mit der modifizierten Methode	50
Abb. 5.6: Extinktion der Triphenylformazanlösung als Funktion der Konzentration	51
Abb. 5.7: Ablaufschema für die Probenaufbereitung zur Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration	56
Abb. 5.8: Aufbau des HPLC-Systems	57
Abb. 5.9: HPLC-Chromatogramm mit einem tRNA-, rRNA- und einem DNA-Peak	58
Abb. 5.10: Peakfläche als Funktion der DNA-Menge	60
Abb. 5.11: Peakfläche als Funktion der tRNA- und rRNA-Menge	60
Abb. 5.12: Batchversuchsanordnung für die Sauerstoffverbrauchsmessungen	62
Abb. 6.1: BSB ₅ -Elimination im Gleichgewichtszustand: (a) Phase 1, (b) Phase 2	65

Abb. 6.2: Konzentration von Ammonium- und Nitrat-Stickstoff entlang der Scheibentauchkörperanlage (Phase 2).....	66
Abb. 6.3: Einfluss der Probenlagerung auf die Dehydrogenasenaktivität (Phase 1) ..	67
Abb. 6.4: Formazanbildung in einem aeroben Medium (Phase 2).....	68
Abb. 6.5: Sauerstoffeinfluss auf die Dehydrogenasenaktivität (Phase 2).....	69
Abb. 6.6: Die Dehydrogenasenaktivität in Abhängigkeit von der Inkubations-temperatur.....	70
Abb. 6.7: Dehydrogenasenaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert (Phase 2).....	71
Abb. 6.8: Dehydrogenasenaktivität der Biofilmproben in Abhängigkeit von eingesetztem Substrat (Phase 2).....	72
Abb. 6.9: Abhängigkeit der Aktivität von der TTC-Konzentration, bestimmt in Phase 2 bei 32,6 °C (a) grafische Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung (Mittelwerte aus drei Messungen), (b) Linearisierung nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung der Konstante K_m	73
Abb. 6.10: Abhängigkeit der Aktivität von der TTC-Konzentration, bestimmt in Phase 1 bei 24,7 °C (a) grafische Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung (Mittelwerte aus drei Messungen), (b) Linearisierung nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung der Konstante K_m	74
Abb. 6.11: Einfluss der Inkubationszeit auf die Formazanproduktion (Phase 1).....	75
Abb. 6.12: Vergleich der Wirksamkeit von Formalin und Formaldehyd bei der Inaktivierung des Biofilms (Phase 2).....	77
Abb. 6.13: Abhängigkeit der Extinktion der Kontrollprobe vom Gewicht des untersuchten Biofilms.....	78
Abb. 6.14: Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität mittels der konventionellen und der modifizierten Methode (Phase 2).....	79
Abb. 6.15: Auswertungsbeispiel einer repräsentativen Messkurve	80
Abb. 6.16: Dehydrogenasenaktivität und Atmungsaktivität gemessen für Biofilmproben mit verschiedenem Bewuchs ($g\ TS/m^2$)	81
Abb. 6.17: Flächenbezogene Dehydrogenasenaktivität ($\mu g\ TF/cm^2_{2h}$) bei unterschiedlichem Biofilmbewuchs (Phase 1).....	82
Abb. 6.18: Linearisierung nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung der Konstanten K_m und $TTC-DHA_{max}$ (Phase 1 und Phase 2).....	83
Abb. 6.19: Darstellung der Dehydrogenasenaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration (Phase 1 und Phase 2).....	84
Abb. 6.20: Verteilung der flächenbezogenen Dehydrogenasenaktivität in der Scheibentauchkörperanlage (Phase 2).....	85
Abb. 6.21: Verteilung der DNA-Konzentrationen in der Scheibentauchkörperanlage bezogen auf die Scheibenfläche (Phase 2).....	87

Abb. 6.22: Verteilung der RNA-Konzentrationen in der Scheibentauchkörperanlage: (Phase 2)	88
Abb. 6.23: Verteilung der DNA-, RNA-Konzentrationen und des RNA/DNA- Verhältnisses in der Scheibentauchkörperanlage (Phase 2).....	89
Abb. 7.1: Stickstoffbilanz: Zulauf- und Abauffracht sowie Assimilation in die Biomasse (Phase 2)	91
Abb. 7.2: Dehydrogenasenaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert (a) nach GAJDŮŠEK et al. (1974), (b) nach LOPEZ et al. (1986).....	97
Abb. 7.3: Einfluss der Inkubationszeit auf die Dehydrogenasenaktivität (a) eines Flussbiofilms (BLENKINSOPP & LOCK, 1990) und (b) eines Belebtschlamm (GRIEBE et al., 1997).....	101
Abb. 7.4: Verhältnis der Formazanproduktion zur Inkubationszeit in Sedimenten aus dem Lavon See (BURTON & LANZA, 1986)	102
Abb. 7.5: Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität mit verschiedenen Untersuchungsmethoden: (a) der konventionellen und (b) der modifizierten Methode (QING et al., 2006)	108
Abb. 7.6: Dehydrogenasenaktivität ($\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$) als Funktion der Atmungsaktivität ($\text{mg O}_2/\text{g TS h}$).....	109
Abb. 7.7: Dehydrogenasenaktivität ($\mu\text{g TF/cm}^2_{2\text{h}}$) bei unterschiedlichem Biofilm- bewuchs bzw. Biofilmdicken (Phase 1).....	111
Abb. 7.8: Abhängigkeit der ATP-Konzentration von der Biofilmdicke (LA MOTTA, 1976)	113
Abb. 7.9: Sauerstoffprofil im Biofilm (nach LASPIDOU & RITTMANN, 2004).....	114
Abb. 7.10: Verteilung der INT Aktivität (ZHANG et al., 1994).....	115

Tabellenverzeichnis

Tab. 3.1: Klassifikation der Bakterien in biologischen Abwasserreinigungssystemen nach RHEINHEIMER et al. (1988).....	12
Tab. 3.2: Ausgewählte Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Enzymaktivitäten (ATLAS & BARTHA, 1981; OBST & SCHMITZ, 1983 und MAIER et al., 2000).....	27
Tab. 3.3: Anwendung der verschiedenen Tetrazoliumsalze zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität des Biofilms	31
Tab. 3.4: Wellenlängen der Absorptionsmessung von 1,3,5-Triphenylformazan	32
Tab. 5.1: Ausstattung der Versuchsanlage	41
Tab. 5.2: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers.....	42
Tab. 5.3: Betriebsbedingungen des Scheibentauchkörpers	43
Tab. 5.4: Eingesetzte Küvettentests zur chemischen Analyse des Anlagenzulaufes und -ablaufes	44
Tab. 5.5: Gradienten zur HPLC-Analyse.....	57
Tab. 6.1: Merkmale des verwendeten Abwassers.....	64
Tab. 6.2: Gemessene Konzentrationen von Ammonium- und Nitrat-Stickstoff	66
Tab. 6.3: Dehydrogenasenaktivitäten unterschiedlich lang gelagerter Biofilmproben	67
Tab. 6.4: Merkmale des verwendeten Abwassers.....	70
Tab. 6.5: Dehydrogenasenaktivitäten in Abhängigkeit vom pH-Wert des Substrats ..	72
Tab. 6.6: Untersuchung der Stabilität des Formazans im Ethanol	76
Tab. 6.7: Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Konzentration des Triphenylformazans	76
Tab. 6.8: Die mittels konventionellen und modifizierten Methode bestimmten Dehydrogenasenaktivitäten.....	79
Tab. 6.9: Hergestellte Verdünnungen des synthetischen Abwassers	82
Tab. 6.10: Merkmale der verwendeten Abwasserverdünnungen	83
Tab. 6.11: TTC-DHA _{max} - und K _m -Werte in Abhängigkeit von der Abwassertemperatur	84
Tab. 6.12: Dehydrogenasenaktivität im Scheibentauchkörper	85
Tab. 6.13: DNA-Konzentrationen im Scheibentauchkörper.....	86
Tab. 6.14: RNA-Konzentrationen im Scheibentauchkörper.....	87
Tab. 6.15: Das RNA/DNA-Verhältnis in der Scheibentauchkörperanlage	88
Tab. 7.1: Betriebsbedingungen und -ergebnisse der Versuchsanlagen.....	90
Tab. 7.2: Beispiele zu pH-Werten bei der Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität.....	97

Tab. 7.3: Unterschiedliche Extinktionskoeffizienten des 1,3,5-Triphenylformazans.	105
Tab. 7.4: θ -Werte für BSB ₅ -Abbau in Scheibentauchkörpern.....	118
Tab. 7.5: DNA-Konzentration und Zellzahl auf der Scheiben des Scheibentauchkörper.....	121

Abkürzungsverzeichnis

AA	Atmungsaktivität [$\text{mg O}_2/\text{g TS}\cdot\text{d}$]
Abs	Absorption
ADP	Adenosindiphosphat
AEC	zelluläre Energieladung (eng. Adenylate Energy Charge)
AFM	Rasterkraftmikroskopie RKM (eng. Atomic Force Microscopy)
A_{ges}	Gesamtscheibenfläche [m^2]
AMP	Adenosinmonophosphat
ATP	Adenosintriphosphat
ATV	Abwassertechnische Vereinigung, jetzt Deutsche Vereinigung für Wasserwirtschaft, Abwasser und Abfall (ATV-DVWK)
A_{RT}	theoretische Oberfläche des Rotationstauchkörpers [m^2]
$A_{\text{RT,C}}$	theoretische Oberfläche des Rotationstauchkörpers zur Kohlenstoff- elimination [m^2]
$A_{\text{RT,N}}$	theoretische Oberfläche des Rotationstauchkörpers zur Nitrifikation [m^2]
$B_{\text{A,BSB}}$	BSB ₅ -Flächenbelastung des Rotationstauchkörpers [$\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{d}$]
$B_{\text{A,TKN}}$	TKN-Flächenbelastung des Rotationstauchkörpers [$\text{g}/\text{m}^2\cdot\text{d}$]
$B_{\text{d,BSB,ZB}}$	tägliche BSB ₅ -Fracht im Zulauf zum biologischen Teil [kg/d]
$B_{\text{d,TKN,ZB}}$	tägliche TKN-Fracht im Zulauf zum biologischen Teil [kg/d]
B_{TS}	Schlammbelastung [$\text{kg}/(\text{kg TS}\cdot\text{d})$]
BSB,BSB ₅	biochemischer (auch biologischer) Sauerstoffbedarf [$\text{mg O}_2/\text{L}$]
BZ	Bakterienzellen
CLSM	Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskopie (eng. Confocal Scanning Laser Microscopy)
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf [$\text{mg O}_2/\text{L}$]
CTC	5-Cyano-2,3-di-4-tolyltetrazoliumchlorid
CTC-F	3-Cyan-1,5-di-tolylformazan
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DGGE	denaturierende Gradientengelelektrophorese (eng. Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)
DIN	Deutsche Industrie-Norm
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EN	Europäische Norm

EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
ETS	Elektronen-Transport-System
EW	Einwohner
fH	freigesetzter Wasserstoff
FISH	Fluoreszenz-In-Situ-Hybridisierung
GA	Grundatmung [mg O ₂ /min]
GKZ	Gesamtkeimzahl
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. High Performance Liquid Chromatography)
HRT	hydraulische Aufenthaltszeit
INT	2-(<i>p</i> -Iodophenyl)-3-(<i>p</i> -nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (Iodonitrotetrazoliumchlorid)
INT-F	Iodonitroformazan
LF	Leitfähigkeit [μS/cm]
LPS	Lipopolysaccharide
MPN	Wahrscheinlichste Anzahl (eng. Most Probable Number)
mRNA	messenger-RNA
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2 <i>H</i> -Tetrazolium
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
NADH	Nicotinamidadenindinukleotid, reduzierte Form
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat, reduzierte Form
n. b.	nicht bekannt
O ₂ *	äquivalenter Sauerstoff
oTS	organische Trockenmasse [mg]
OUR	Sauerstoffverbrauch (eng. Oxygen Uptake Rate)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (eng. Polymerase Chain Reaction)
PE	Polyethylen
PE-HD	Polyethylen hoher Dichte
PGN	Peptidoglykane
PP	Polypropylen
PPi	Diphosphate
PTFE	Polytetrafluorethylen

PVC	Polyvinylchlorid
RGT	Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel (Van't Hoffsche Regel)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
SD	Standardabweichung (eng. standard deviation)
SA	Substratatmung [mg O ₂ /min]
SDS	Natriumlaurylsulfat
SEM	Rasterelektronenmikroskopie REM (eng. Scanning Electron Microscopy)
TDS	gelöste Feststoffe (eng. Total Dissolved Solids)
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie (eng. Transmission Electron Microscopy)
TF	1,3,5-Triphenylformazan
TKN	Gesamter Kjeldahl Stickstoff [mg/L] (eng. Total Kjeldahl Nitrogen)
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoff [mg/L] (eng. Total Organic Carbon)
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
tRNA	transfer-RNA
TS	Trockenmasse [mg]
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
TTC-DHA	Dehydrogenasenaktivität [μg TF/mg TS _{2h}]
TTC-DHA _{max}	maximale Dehydrogenasenaktivität [μg TF/mg TS _{2h}]
V _{ges}	Arbeitsvolumen [L]
WST-1	4-(3-4-Iodophenyl)-2-(4-Nitrophenyl)-2H-5-Tetrazolio)-1,3-Benzendi- sulfonat
XTT	3'-[1-Phenylaminocarbonyl-3,4-Tetrazolium]bis(4-Methoxy-6-Nitro)- Benzen-Sulfonsäurehydrat

Weitere Abkürzungen sind im Text definiert.

*„Wir erben die Erde nicht von unseren Vorfahren,
wir leihen sie von unseren Kindern.“*

Antoine de Saint-Exupéry

1. Einleitung

Die Industrieentwicklung und der zunehmende Bevölkerungswachstum sowie daraus resultierende Verschmutzungsprobleme verstärken die Notwendigkeit des Umweltschutzes. Die natürlichen Ressourcen sind begrenzt und sollten daher so behandelt werden, dass sie noch den nächsten Generationen dienen können. In dieser Hinsicht ist die Abwasserreinigung einer der Grundprozesse, welche die Umweltverschmutzung kontrollieren. Da teilweise Flüsse und Seen für die Trinkwasserversorgung herangezogen werden müssen, steigen die Anforderungen des Gewässer- und Gesundheitsschutzes an Kläranlagenabläufe (KUBIN, 2004).

Im Gegensatz zu konventionellen Abwasserreinigungsanlagen zeichnen sich die Reaktoren mit immobilisierter Biomasse bzw. Biofilmreaktoren durch eine Vielzahl von Vorzügen aus. Die Schlammproduktion ist beträchtlich reduziert und der Schlamm weist sehr gute Absetzeigenschaften auf (D'ANTONIO et al., 1997). Unter ihnen ist besonders der Scheibentauchkörper hervorzuheben, da bei sehr geringen Betriebs- und Wartungskosten eine beachtliche Reinigungsleistung erzielt werden kann (ATV-DVWK-A 281, 2001). Besonders erwähnenswert ist auch der niedrige Energiebedarf, der für eine Scheibentauchkörperanlage lediglich bei 20 bis 30 % des Gesamtenergiebedarfs der herkömmlichen Belebungsverfahren beträgt (ATV, 1997).

Die kommerzielle Anwendung der Scheibentauchkörper fand erst in den sechziger Jahren des letzten Jahrhunderts statt, jedoch hat sich aufgrund der fehlenden Grundlagen und Bemessungsmethoden die Akzeptanz für dieses Verfahren stark verzögert (SEKOULOV et al., 1997). Im Laufe der Jahre wurden die Scheibentauchkörper hinsichtlich verschiedener spezifischer Aspekte untersucht und die Optimierung dieses Systems ist ein wichtiger Forschungsbereich geworden (CORTEZ et al., 2008).

Die Konstruktion der Anlagen, der Abbau organischer Abwasserinhaltsstoffe oder die Zusammensetzung und Struktur des auf den Scheiben wachsenden Biofilms wurden in der Fachliteratur (ZAHID & GANCZARCZYK, 1994a; VENKATARAMAN et al., 1997; ISRANI et al., 2002; MARTÍN-CERECEDA et al., 2002b und TAWFIK et al., 2006) bereits beschrieben. Die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen, die eigentlich ein Maß für das mikrobielle Reinigungspotential ist und direkt die Eliminationsleistung des Systems beeinflusst, wurde wiederum bisher noch nicht näher untersucht. Nach wie vor ist eine „black box“-Betrachtungsweise in der Abwassertechnologie vorherrschend. Jedoch kann ohne einen tieferen Einblick in die biologischen Vorgänge eine weitere Optimierung der Abwasseranlagen nicht erreicht werden (KAPPLER, 2002). Es sollte daher neben der üblicherweise gemessenen Zulauf- und Ablaufqualität und den physikalischen Parametern (pH-Wert, Sauerstoffgehalt, elektrische Leitfähigkeit, gelöste und abfiltrierbare Stoffe etc.), die Aktivität des Biofilms bestimmt werden (ZAHID & GANCZARCZYK, 1994a und ANDREOTTOLA et al., 2002).

Durch die inhibierenden und toxischen Stoffe im Zulauf der Abwasserreinigungsanlage sowie verschiedene verfahrenstechnische Eingriffe wird die Aktivität des Biofilms gestört. Die störenden Einflüsse in der biologischen Stufe können demzufolge über die Aktivitätsmessung rechtzeitig erkannt und Aussagen über das Ausmaß des Einflusses durch Änderungen der Aktivität getroffen werden.

Aufbauend auf der Aktivität lassen sich außerdem wichtige Hinweise für den Betrieb der Anlagen ableiten, damit eine höhere Leistungsfähigkeit des Prozesses und Einsparungen der Betriebskosten erzielt werden können (ANDREOTTOLA et al., 2002).

Derzeit fehlen geeignete praxistaugliche Kriterien, die eine Bewertung der Aktivität des im Scheibentauchkörper vorhandenen Biofilms erlauben. Das Verständnis des physiologischen Verhaltens verlangt eine präzise und zuverlässige Methode, welche die Bestimmung der Aktivität ermöglicht. Diese musste eigens dafür ausgewählt und angepasst werden, was in den folgenden Kapiteln beschrieben wird.

2. Struktur der Arbeit

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Aktivität des Biofilms in Scheibentauchkörpern. Die Scheibentauchkörper gehören zu Biofilmreaktoren, bei denen die Organismen als biologischer Film auf festen Unterlagen sitzen, daher sollen im Weiteren (Kap. 3) die Grundprinzipien und die Einteilung der Biofilmverfahren dargestellt werden. Daneben wird das Scheibentauchkörperverfahren eingehend beschrieben und die bisherigen an Scheibentauchkörpern durchgeführten Untersuchungen erläutert. Zum Verständnis der generellen biologischen Vorgänge und deren Bedeutung werden Definition, Aufbau sowie Funktion des Biofilms erklärt. Weiterhin werden die verschiedenen Methoden zur Biofilmanalyse erwähnt und die Verfahren zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität mit Betonung der in dieser Arbeit angewendeten Methoden dargestellt. Die Zielsetzung der Arbeit wird in Kapitel 4 formuliert. Anschließend werden in Kapitel 5 der Aufbau und Betrieb der Versuchsanlage dargestellt und die angewendeten Methoden näher beschrieben. Nachdem die Ergebnisse in Kapitel 6 abgebildet und in Kapitel 7 diskutiert werden, wird in Kapitel 8 die Zusammenfassung dargestellt und die Schlussfolgerungen gezogen. In Kapitel 9 werden Empfehlungen für die Anwendung der Methode sowie ein Ausblick auf den weiteren Forschungsbedarf für zukünftige Planungen gegeben.

3. Grundlagen

3.1. Grundlagen der Biofilmverfahren

3.1.1. Biofilmverfahren in der Abwassertechnik

Die Biofilmverfahren sind unter Heranziehung der DIN 4045 (2003), DIN EN 1085 (2000) und DIN EN 12255-TEIL 7 (2002) als Verfahren definiert, in denen sich die Mikroorganismen in der Form von Biofilm (siehe Kap. 3.2.1) am Trägermaterial ansiedeln (ATV-DVWK IG-5.6, 2004).

Seine Ursprünge hat die Anwendung der immobilisierten Mikroorganismen zur Abwasserreinigung im 19. Jahrhundert, jedoch fand nach der Entwicklung des Belebtschlammverfahrens 1914 aufgrund geringerer Eliminationsleistung der Biofilmverfahren eine Abkehr von diesen statt (BÖHM & WILDERER, 1997; D'ANTONIO et al., 1997 und LAZAROVA & MANEM, 2000). Die steigenden Anforderungen an die Abwasserreinigung und die spätere Einführung der innovativen Anlagenkonfiguration und neuer Trägermaterialien mit hoher Bewuchsoberfläche machten die fixierenden Biofilmprozesse zu einer verheißungsvollen Technologie der Abwasserreinigung, was einer Vielzahl von Vorzügen während des Betriebs gegenüber herkömmlichen Belebtschlammverfahren zugeschrieben wurde (MUDRACK & KUNST, 2003). Wegen ihrer kompakten Konstruktionsweise und einer hohen Biomassekonzentration beanspruchen die Reaktoren mit immobilisierter Biomasse bzw. Biofilmreaktoren weniger Raum bei gleichzeitiger Mobilität (MUDRACK & KUNST, 2003). Zudem haben sie lediglich geringe Auswirkungen auf das Landschaftsbild und verursachen keine zusätzlichen Lärm- oder Geruchsbelästigungen. Hinzu kommt, dass die Produktion von Schlamm in den oben genannten Reaktoren erheblich reduziert wird, wobei der entstehende Schlamm außerdem sehr gute Absetzeigenschaften aufweist (D'ANTONIO et al., 1997). Es entfällt auch die Belebtschlammrückführung, welche beim Belebungsverfahren erforderlich ist (ATV, 1997). Schließlich zeigen die Biofilmreaktoren keine bemerkenswerten Schwankungen der Reinigungsleistung bei Veränderung der hydraulischen und organischen Belastung, sind leicht bedienbar und sehr wirtschaftlich im Betrieb (BITTON, 1994).

Die im Laufe der Jahre zusehends erkannten Vorzüge der Biofilmverfahren und das

sich immer weiter ausbreitende Anwendungsspektrum von aerobem Abbau der organischen Stoffe durch Nitrifikation, Denitrifikation bis zur biologischen Phosphatelimination trugen dazu bei, dass die Biofilme häufiger in der Abwasserreinigung eingesetzt wurden und schon Anfang des 21. Jahrhunderts ein Viertel der weltweit vorkommenden Abwasserbehandlungsanlagen mit unterschiedlichen Variationen von Biofilmtechniken arbeiteten (CHOI et al., 2001).

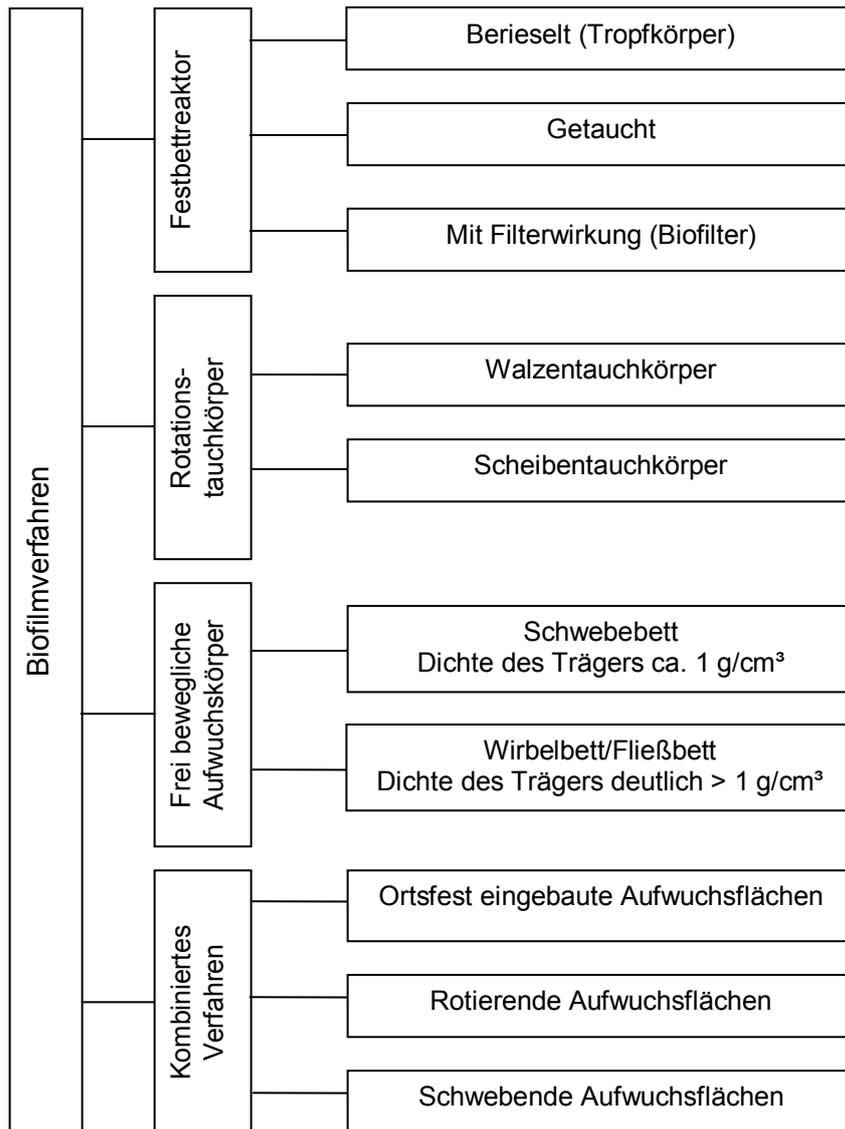


Abb. 3.1: Systematische Einteilung von Biofilmverfahren (ATV-DVWK IG-5.6, 2004)

Mittlerweile lassen sich die Biofilmverfahren grundsätzlich in Festbettreaktoren, Rotations-tauchkörper, frei bewegliche Aufwuchskörper und kombinierte Verfahren (sessile und suspendierte Biomasse) einteilen (Abb. 3.1), die unter aeroben, anoxischen oder anaeroben Bedingungen betrieben werden können (DIN EN 12255, 2002).

3.1.2. Definition und Funktionsweise eines Scheibentauchkörpers

Der bekannteste Vertreter der Rotationstauchkörper ist der Scheibentauchkörper. Er besteht aus einer Serie von rotierenden Kunststoffscheiben, die in geringen Abständen auf einer horizontalen Welle befestigt und maximal bis zur knappen Hälfte in einer vom Abwasser durchflossenen Wanne eingetaucht sind. Da sich die Wanne in der Regel aus hintereinander angeordneten Walzen (Kaskadenordnung) zusammensetzt, herrschen in den einzelnen Kaskaden unterschiedliche physisch-chemische und biologische Bedingungen. Die abgestuften Raumbelastungen ergeben sich dementsprechend aus einem unterschiedlichen Bewuchs der Scheiben (MARTÍN-CERECEDA et al., 2002a und RÖSKE & UHLMANN, 2005).

Die Funktionsweise des Scheibentauchkörpers basiert auf der Stoffwechselaktivität der komplexen mikrobiellen Gemeinschaft, die sich auf den Scheibenflächen bildet. Bei jeder Umdrehung folgt auf die Substrataufnahme während des Eintauchens des Biofilms in das Abwasser die Sauerstoffaufnahme oberhalb des Abwasserspiegels. Dabei muss die eingestellte Rotationsgeschwindigkeit so bemessen sein, dass sich der Bewuchs wegen zu großer Zentrifugalkräfte nicht ablöst und der Kontakt des Biofilms mit der gasförmigen Phase optimal für die Sauerstoffanreicherung ist, zugleich aber eine ausreichende Turbulenz in der Wanne gewährleistet ist, um Schlammablagerungen zu verhindern (HARTMANN, 1992 und ATV, 1997). Der Sauerstoff wird anschließend beim Kontakt mit organischen Stoffen während der Eintauchphase umgesetzt. Dadurch kann bis zu 97 % des im Zulauf enthaltenen BSB₅ abgebaut werden (KINNER et al., 1983).

Die ersten die Rotationstauchkörper betreffenden Erwähnungen stammen aus der Zeit um 1900. Sie betrafen den Betrieb der Tauchwalzen, die aus bis zur Hälfte im Abwasser eingetauchten, rotierenden Holzlatten erstellt und mit Reisig gefüllt wurden¹. Die nächsten Untersuchungen, bezogen auf den Einsatz von rotierenden halbeingetauchten Scheiben zur Behandlung des aus Faulgruben ablaufenden Abwassers, wurden

¹ Die Entwicklungsgeschichte der Scheibentauchkörper nach BREITHAUPT (1997)

von DOMAN (1929) durchgeführt und beschrieben. Auf Grund der niedrigen erzielten Leistungsfähigkeit des damals so genannten Tauchtropfkörpers geriet das Interesse für diesen Prozess in Vergessenheit und trat erst in den späten 50er Jahren des vergangenen Jahrhunderts wieder auf. HARTMANN (1960) konstruierte eine Scheibentauchkörperanlage mit Eternitscheiben (Durchmesser 1 m, Eintauchtiefe 0,3 m), die sehr gute Abbaufähigkeiten aufwies. Dies führte zur Weiterentwicklung und anschließender kommerzieller Anwendung des Verfahrens. Die anfänglich sehr schweren Scheiben, die den Einsatz von längeren freitragenden Wellen erschwerten und sehr hohe Biegebelastungen an der Welle erzeugten, wurden im Laufe der Jahre durch geschäumte Polystyrol- und anschließend durch leichte Kunststoffscheiben (PVC, PE, PP, PE-HD) ersetzt (KEMPA, 2001). Heutzutage werden die Scheibentauchkörper neben den Eigenschaften, die allen Biofilmverfahren zugeschrieben werden können (siehe Kap. 3.1.1), hauptsächlich im Hinblick auf sehr geringe Betriebskosten bei einer beachtlich hohen Reinigungsleistung angewendet (ATV-DVWK-A 281, 2001 und CORTEZ et al., 2008). Der Wartungsaufwand, der sich auf Ölwechsel, Abschmieren der Antriebselemente und Sauberhalten der Anlage beschränkt, ist gering (ATV, 1997).

3.1.3. Bemessung und Leistungsfähigkeit von Scheibentauchkörpern

Für die Bemessung der biologischen Stufe ist die Menge der vorhandenen Biomasse, welche die organischen Stoffe des Abwassers abbaut und die anorganischen Stoffe teilweise oxidieren kann, maßgebend (ATV, 1997).

Während die Schlammmenge im Belebungsbecken leicht bestimmbar ist und die Belebtschlammverfahren aufgrund der Schlammbelastung B_{TS} (kg BSB₅/kg TS·d) bemessen werden können, ist die im Scheibentauchkörper vorhandene Biomasse ohne Störung der normalen Funktion der Anlage nicht fassbar (NOWAK et al., 1998). Der Bewuchs der Scheiben unterscheidet sich von Kaskade zu Kaskade, weshalb der maßgebliche Bemessungsparameter² die auf die Bewuchsfläche bezogene Kohlen-

² Die Bemessung der Scheibentauchkörper erfolgt nach dem ATV-DVWK-A 281 (2001) „Bemessung von Tropfkörpern und Rotationstauchkörpern“.

stoff- oder Stickstoffbelastung bzw. BSB₅- ($B_{A,BSB}$, g BSB₅/m²·d) und TKN-Flächenbelastung ($B_{A,TKN}$, g TKN/m²·d) ist. Im Hinblick auf seinen geringen Anteil an der Reinigungsleistung bleibt der in der Wanne in Suspension gehaltene belebte Schlamm unberücksichtigt.

Die erforderliche theoretische Oberfläche der Scheiben wird in Abhängigkeit vom angestrebten Reinigungsziel ermittelt, wobei sie nicht den Wert von 150 m²/m³ in der ersten hochbelasteten Kaskade überschreiten sollte.

Zur Berechnung der notwendigen theoretischen Oberfläche werden folgende Formeln verwendet (Gl. 3.1 und Gl. 3.2):

$$A_{RT,C} = \frac{B_{d,BSB,ZB} \cdot 1000}{B_{A,BSB}} \quad [\text{m}^2] \quad (3.1)$$

zuzüglich bei Nitrifikation:

$$A_{RT,N} = \frac{B_{d,TKN,ZB} \cdot 1000}{B_{A,TKN}} \quad [\text{m}^2] \quad (3.2)$$

Hierbei stehen die einzelnen Formelzeichen für folgende Größen:

$A_{RT,C}$	theoretische Oberfläche zur Kohlenstoffelimination [m ²];
$A_{RT,N}$	theoretische Oberfläche zur Nitrifikation [m ²];
$B_{A,BSB}$	BSB ₅ -Flächenbelastung [g/m ² ·d];
$B_{A,TKN}$	TKN-Flächenbelastung [g/m ² ·d];
$B_{d,BSB,ZB}$	tägliche BSB ₅ -Fracht im Zulauf zum biologischen Teil [kg/d];
$B_{d,TKN,ZB}$	tägliche TKN-Fracht im Zulauf zum biologischen Teil [kg/d].

Die gesamte erforderliche theoretische Oberfläche wird also aus der zum Reaktor zufließenden täglichen BSB₅- und TKN-Fracht sowie aus den zulässigen Flächenbelas-

tungen $B_{A,BSB}$ und $B_{A,TKN}$ errechnet (Gl. 3.3):

$$A_{RT} = A_{RT,C} + A_{RT,N} \quad [\text{m}^2] \quad (3.3)$$

Für die Bemessung der Bewuchsfläche ist in Abhängigkeit von den zu erwartenden Prozessen von 2 bis 4 Kaskaden auszugehen. Die zulässige Belastung wird im Folgenden aufgezeigt:

Abwasserreinigung ohne Nitrifikation:

- 2-stufige Kaskaden: $B_{A,BSB} \leq 8 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$
- 3- und 4-stufige Kaskaden: $B_{A,BSB} \leq 10 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$

Abwasserreinigung mit Nitrifikation:

- 3-stufige Kaskaden: $B_{A,BSB} \leq 8 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$ und $B_{A,TKN} \leq 1,6 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$
- 4-stufige Kaskaden: $B_{A,BSB} \leq 10 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$ und $B_{A,TKN} \leq 2 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$

Bei den Kläranlagen mit Anschlussgrößen von 50 bis 1000 EW wird wegen den auftretenden Zufluss- bzw. Belastungsspitzen die zulässige BSB_5 -Flächenbelastung auf $4 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$ und die TKN-Flächenbelastung auf $1,2 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$ linear abgemindert.

Der ausreichende Abstand zwischen den Scheiben sorgt für die ungehinderte Strömung von Abwasser und Luft (DIN EN 12255, 2002) und hängt von der Flächenbelastung der jeweiligen Kaskade ab. Bei den BSB_5 -Flächenbelastungen $\geq 20 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$ in einer Stufe wird ein Abstand der Scheiben von $\geq 18 \text{ mm}$ empfohlen, bei Belastungen von $< 20 \text{ g/m}^2 \cdot \text{d}$ hingegen 15 mm . Üblicherweise haben die einzelnen Scheiben des Scheibentauchkörpers einen Durchmesser zwischen 1 und 5 m und die Wellen eine Länge bis zu 10 m. Ein Wannenvolumen von etwa 4 L/m^2 der theoretischen Scheibenoberfläche sollte aufgrund möglicher Belastungsschläge nicht unterschritten werden.

Als konventionelle Technik zur Ermittlung der Effizienz des Scheibentauchkörpers gilt die Bestimmung des Substratumsatzes. Der Substratumsatz, bestehend aus den analytischen Messungen des biochemischen Sauerstoffbedarfs (BSB_5), des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB) oder des Umsatzes eines spezifischen Substrats wie u.a.

Phosphor oder Stickstoff in verschiedenen Formen, wird auf die Fläche und die Zeit bezogen und als Flächenumsatzleistung³ in kg Differenz X/m²·d ausgedrückt. Zu Vergleichszwecken und Dimensionierungszwecken werden öfter einfach die Erfahrungswerte der Umsatzleistungen angegeben (SCHMID-SCHMIEDER, 2001). Diese beschreiben die makroskopische Prozessleistungsfähigkeit, erbringen aber keine detaillierten Informationen über die *in situ* Physiologie der Mikroorganismen (BOLTON et al., 2006).

3.1.4. Untersuchte Aspekte der Scheibentauchkörpertechnologie

In der Forschung wurden im Laufe der Jahre bereits mehrere Untersuchungen zu verschiedenen Aspekten von Scheibentauchkörpern durchgeführt und beschrieben. Sie umfassen hauptsächlich Kinetik und Konstruktion des Scheibentauchkörpers (PANO et al., 1980; NISHIDOME et al., 1994, D'ANTONIO et al., 1997; MBA et al., 1999 und GRIFFIN & FINDLAY, 2000), Nitrifikation und Abbau der organischen Abwasserinhaltsstoffe (GÖNEC & HARREMOES, 1985, RADWAN & RAMANUJAM, 1997, KINLI, 1999, KUBSAD et al., 2005 und BLANK et al., 2008) sowie den Einfluss der Biozide (LAOPAIBOON et al., 2002) und Prozessvariablen (BANERJEE, 1997; LU et al., 1997, NAJAFPOUR et al., 2006; TAWFIK et al., 2006 und CORTEZ et al., 2008) auf die Leistungsfähigkeit des Systems. Der auf den Scheiben haftende Biofilm wurde ebenfalls bereits beschrieben, allerdings lediglich bezogen auf seine Struktur (ZAHID & GANCZARCZYK, 1994a, EGLI et al., 2003, MENG & GANCZARCZYK, 2004 und HANWOONG et al., 2008) und Zusammensetzung (VENKATARAMAN et al., 1997; MARTÍN-CERECEDA et al., 2002b und PYNAERT et al., 2003). Das physiologische Verhalten bzw. die Aktivität der Mikroorganismen in Scheibentauchkörpern wurde bisher noch nicht untersucht.

³ Unter „X“ ist BSB₅, CSB, NH₄-N, NO₃-N, etc. zu verstehen.

3.2. Mikrobiologische Grundlagen

3.2.1. Biofilme

Abwasserbiofilm besteht aus biologisch vielfältiger Mikroflora, hauptsächlich Bakterien sowie einzelligen eukaryotischen Lebewesen wie Mikroalgen, Mikropilzen und Protozoen wie Flagellaten, Ciliaten und Amöben. In einer nährstoffreichen und aeroben Umgebung können sowohl Vielzeller (Metazoen) wie Rotatorien, Anneliden, Nematoden als auch Insektenlarven oder Schnecken, die sich von den Biofilmorganismen ernähren, im Biofilm vorhanden sein (Abb. 3.2).

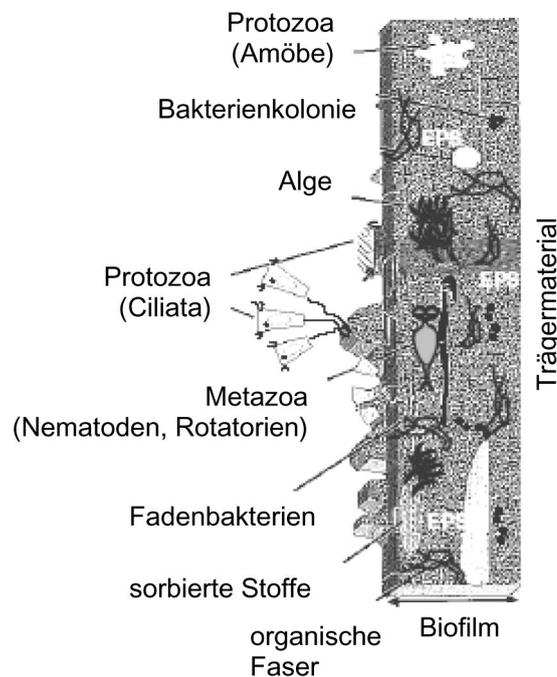


Abb. 3.2: Schematische Darstellung eines Abwasserbiofilms (MARTÍN-CERECEDA et al., 2002a)

Eine entscheidende Rolle in der Abwasserreinigung spielen jedoch die Bakterienpopulationen, welche die hochmolekularen, energiereichen Abwasserinhaltsstoffe, die Nährstoff- oder Zehrstoffcharakter haben, aufnehmen oder umsetzen und sowohl zum Aufbau der körpereigenen Substanz als auch zur Energiegewinnung verwenden (Abb. 3.3).

Die Bakterien charakterisieren sich durch unterschiedliche Arten der Energie- und Kohlenstoffquellen und die ungleiche Empfindlichkeit gegenüber Sauerstoff.

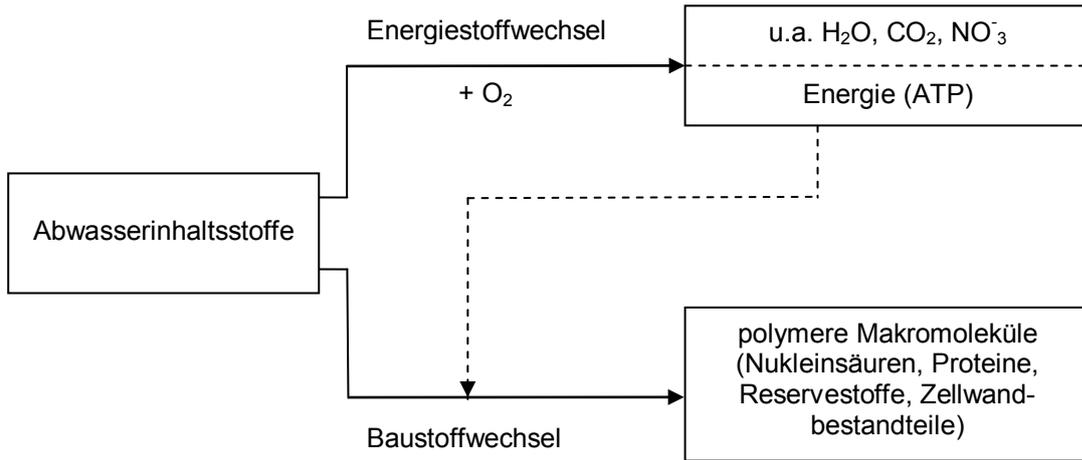


Abb. 3.3: Schema des Bakterienmetabolismus (verändert nach MUDRACK & KUNST, 1994)

Die phototrophen Bakterien, die als Energiequelle Strahlungsenergie nutzen, sind von geringerer Bedeutung in der biologischen Abwasserreinigung (BITTON, 1994). Wichtiger sind die chemotrophen Bakterien, zu denen die meisten Bakterien, die sich im Biofilm befinden, gehören (Tab. 3.1).

Tab. 3.1: Klassifikation der Bakterien in biologischen Abwasserreinigungssystemen nach RHEINHEIMER et al. (1988)

Organismengruppe	C- quelle	Elektronen-		Produkte des Abbau- stoffwechsels	Tätigkeitsmerkmale	
		-donator	-akzeptor			
Primärabbauer	Org. C (gelöst)	Org. C	O ₂	CO ₂ , NH ₄ ⁺	Aerobe Bakterien	Chemoorgano- heterotrophe Bakterien
			NO ₃ ⁻	NO ₂ ⁻	Nitratreduzierer	
			NO ₃ ⁻ NO ₂ ⁻	N ₂	Denitrifikanten	
			org. C	org. C	Anaerobe Bakterien	
Nitrifikanten	CO ₂	NH ₄ ⁺	O ₂	NO ₂ ⁻	Ammoniakoxidierer	Chemolitho- autotrophe Bakterien
	CO ₂	NO ₂ ⁻	O ₂	NO ₃ ⁻	Nitritoxidierer	

Zahlenmäßig überwiegen häufig die heterotrophen polymerabbauenden Bakterien (Chemoorganoheterotrophen⁴), wobei die anderen Bakterien, wie die autotrophen Nit-

⁴ Verwenden organische Verbindungen als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle.

rifikanten (Chemolithoautotrophen⁵), auch in bedeutenden Mengen besiedelt sein können (RODE, 2004).

Die energieliefernden Reaktionen bei Chemotrophen sind die Redoxreaktionen, die ausgehend vom Schema (Gl. 3.4):



auf der Übertragung der Elektronen von einem Wasserstoff- oder Elektronendonator (D) auf einen Wasserstoff- oder Elektronenakzeptor (A) basieren. Im aeroben Milieu dient der Sauerstoff als Elektronenendakzeptor. In anaeroben Bedingungen werden die Elektronen entweder an oxidierte anorganische Verbindungen wie u. a. NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Mn(IV) , Fe(III) (anaerobe Atmung) oder an organische Verbindungen (Gärung) übertragen.

Die einzelnen Biofilmmikroorganismen befinden sich in einer organischen Matrix, die bis zu 95 % des organischen Anteils des Biofilms ausmacht (FLEMMING, 1994). Sie besteht aus selbstproduzierten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) bzw. hauptsächlich aus Polysacchariden, Proteinen, aber auch aus Nukleinsäuren, Lipiden, Phospholipiden, Glycolipiden, Huminstoffen und Glycoproteinen. In Abhängigkeit von Mikroorganismenarten, Nährstoffverfügbarkeit oder hydrodynamischen Bedingungen können die Bestandteile der EPS stark variieren, jedoch bleibt trotz ihrer Heterogenität die Rolle der EPS im Biofilm ebenso wichtig wie die Rolle der Mikroorganismen selbst (MACIEL, 2004).

Die EPS-Matrix steht für die Rückhaltung vom Wasser ein, was unter wasserarmen Bedingungen die Austrocknung des Biofilms verhindert. Außerdem ermöglicht sie das Auffangen der Nährstoffe aus der wässrigen Phase. Herrscht Nährstoffmangel, können die dann gespeicherten Nährstoffe verwendet werden und dadurch das Überleben der Mikroorganismen sichern. Die EPS bieten den mikrobiellen Gemeinschaften die

⁵ Verwenden anorganische Verbindungen als Elektronendonator und Kohlenstoffquelle.

mechanische Stabilität. Außerdem sind die Mikroorganismen hier besser als in der Suspension gegenüber z. B. pH-Extremen, Salzbelastungen oder toxischen Substanzen geschützt. Darüber hinaus sorgt deren unmittelbare Nähe zueinander für die Entwicklung von synergistischen Gemeinschaften in Form von Mikrokonsortien. Die Populationen der verschiedenen Spezies (Abb. 3.4) können miteinander in Wechselwirkung treten und sind zu sequenziellen Abbauprozessen fähig, was im frei suspendierten Zustand nicht oder nur beträchtlich langsamer stattfindet.

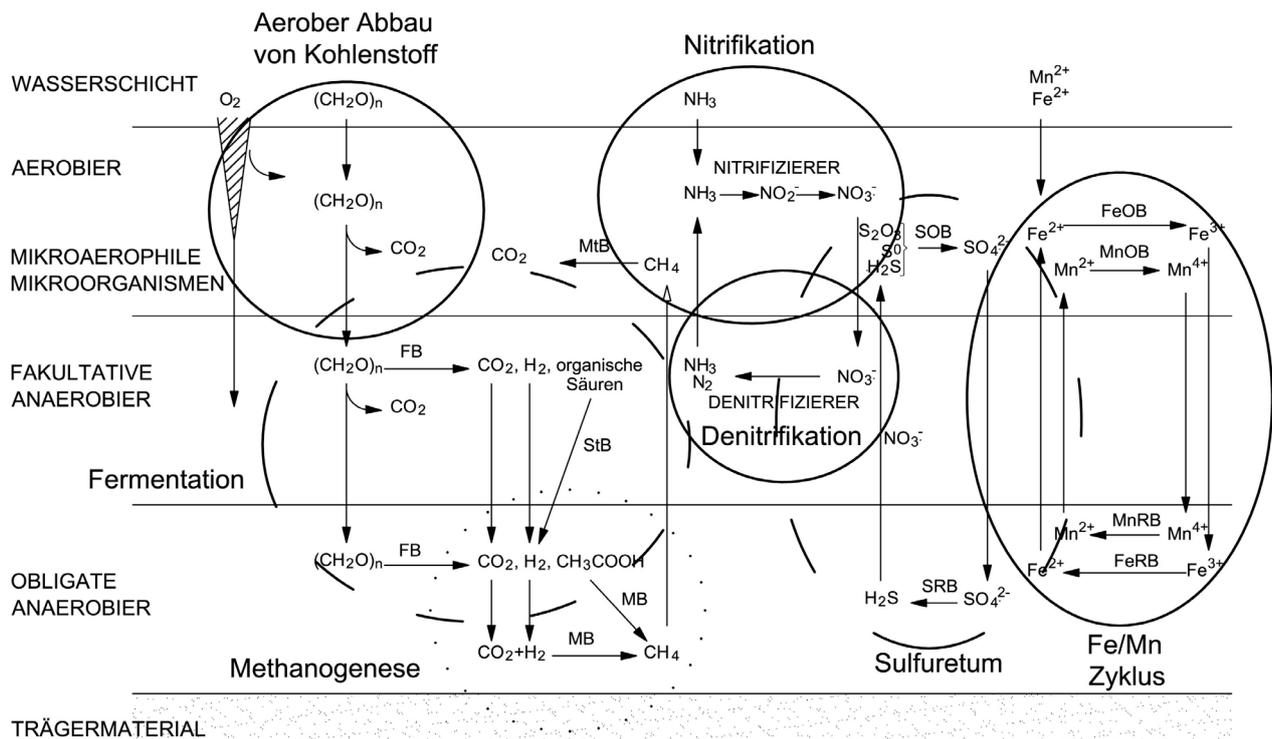


Abb. 3.4: Mikrobielle Ökologie in einem ausgewachsenen Biofilm (nach FLEMMING, 2007): FB = fermentierende Bakterien, FeOB = Eisenoxidierende Bakterien, MB = Methanbildner, FeRB = Eisenreduzierende Bakterien, SOB = Sulfuroxidierende Bakterien, SRB = Sulfur-reduzierende Bakterien, MtB = methanotrophe Bakterien, StB = syntrophe Bakterien, MnRB = Manganreduzierende Bakterien, MnOB = Manganoxidierende Bakterien.

Außer Mikroorganismen zählen zu den Bestandteilen des Biofilms auch die eingelagerten biogenen und abiotischen Partikel, die sorbierten kolloidalen und gelösten organischen Verbindungen wie z. B. Aminosäuren und Zucker sowie die anorganischen Ionen wie u.a. Ca^{2+} , Mg^{2+} und Fe^{3+} . Mit 70 bis 90 % des Feuchtgewichts gehört das freie und gebundene Wasser ebenfalls zu den Komponenten des Biofilms.

Die zeitliche Entstehung eines heterogenen Biofilms lässt sich generell in drei Prozessstadien unterteilen: (i) Induktionsphase, (ii) Wachstumsphase und (iii) Plateauphase (Abb. 3.5 und Abb. 3.6).

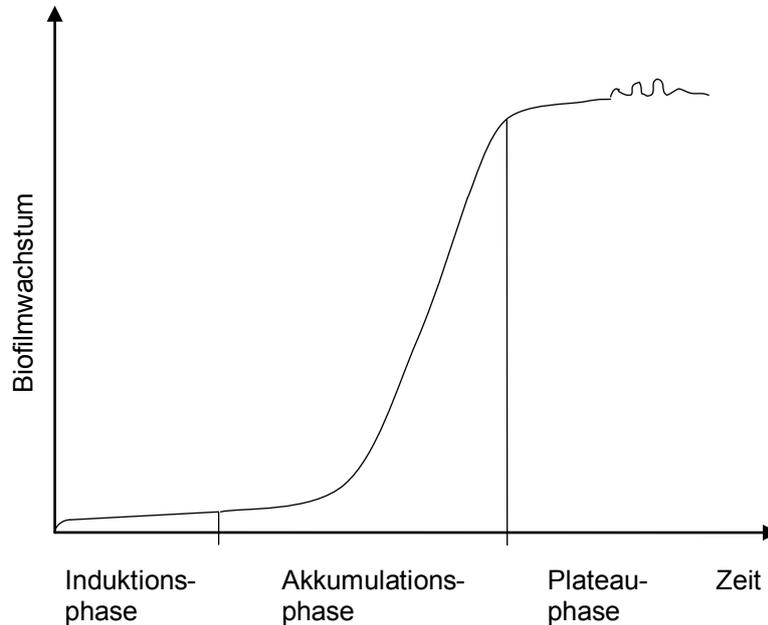


Abb. 3.5: Zeitlicher Verlauf des Biofilmwachstums (nach FLEMMING, 1991)

In der Induktionsphase adsorbieren die Ionen und organischen Makromoleküle (Proteine, Polysaccharide, Huminstoffe usw.) aus der wässrigen Phase an die Grenzfläche bzw. Aufwuchsoberfläche. Innerhalb von Sekunden bildet sich eine dünne schleimige Bewuchsschicht - „conditioning film“ (Abb. 3.6a), die eine erhebliche Änderung der chemischen und physischen Oberflächeneigenschaften bewirkt und die Anheftung von einzelnen Bakterienzellen ermöglicht.

Anfänglich ist die Adhäsion noch reversibel, aber nach einem längeren Kontakt zwischen Zelle und Oberfläche findet die irreversible Adhäsion statt (Abb. 3.6b). Für die Anheftung der Zelle an die Oberfläche sind verschiedene Mechanismen verantwortlich, u.a. Van-der-Waals-Kräfte sowie elektrostatische Anziehung und Wasserstoffbrücken.

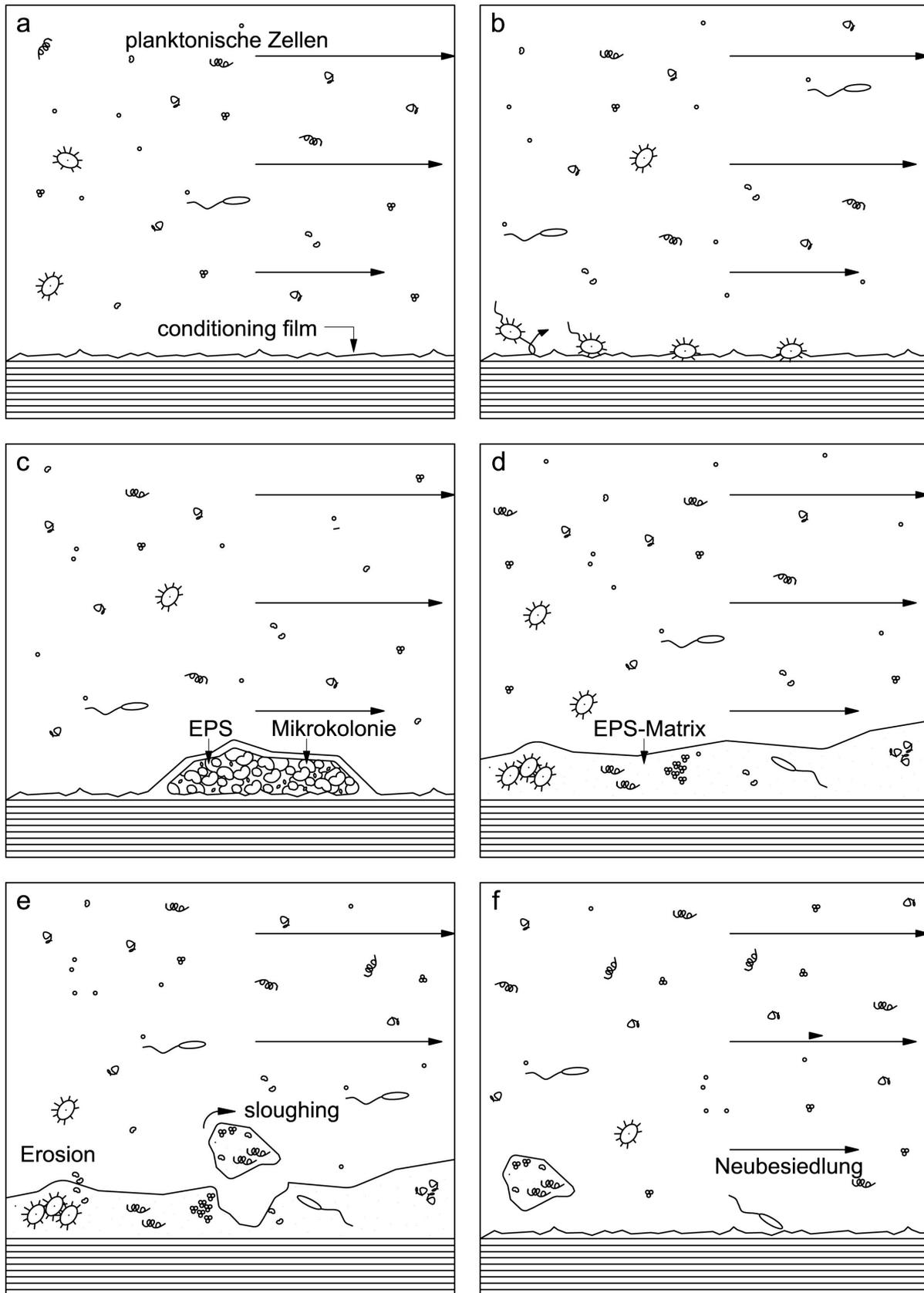


Abb. 3.6: Entwicklungsstadien eines Biofilms: (a) conditioning film, (b) reversible und irreversible Adhäsion, (c) Mikrokolonien, (d) reifer Biofilm, (e) Ablösung der Biomasse, (f) weitere Ausbreitung (nach FLEMMING & WINGENDER, 2001)

Die Dauer und der Verlauf der Induktionsphase sind von umweltbedingten Faktoren abhängig. Zu den Faktoren gehören die primären Oberflächeneigenschaften wie u.a. die chemische Zusammensetzung, Hydrophobizität, Rauigkeit, Benetzbarkeit, biologische Affinität (Besiedelbarkeit), Oberflächenladung und -spannung, sowie die Eigenschaften der Mikroorganismenzellen. Das umgebende Medium (Abwasser) mit den Einflussfaktoren wie z. B. Temperatur, pH-Wert, Viskosität und Zusammensetzung sowie die hydrodynamischen Parameter wie Druck und Scherkraft beeinflussen ebenso die Entwicklung des Biofilms.

An die irreversible Adhäsion der Induktionsphase schließt sich die logarithmische Wachstumsphase an, während der die ersten Bakterien beginnen sich zu vermehren, sekundäre Mikroorganismen sich an die Primärbesiedler (Coadhäsion) anheften und sich die abiotischen Komponenten einlagern (Abb. 3.6c). Die Biofilme wachsen mehrschichtig auf und bilden dreidimensionale Strukturen mit mikrobiellen Konsortien (Abb. 3.6d), wobei das Wachstum der Mikroorganismen in erster Linie durch Nährstoffversorgung und Temperatur beeinflusst wird.

Auf die Wachstumsphase folgt die Plateauphase, eine Phase, in der Biofilme einen dynamischen Gleichgewichtszustand zwischen Biofilmwachstum und Abtrennung von Biofilmbestandteilen erreichen.

Laut FLEMMING (1994) lässt sich dies durch eine einfache Bilanzierung darstellen (Gl. 3.5):

$$\Delta M_{\text{Wachstum}} + \Delta M_{\text{Adhäsion}} = \Delta M_{\text{Ablösung}} \quad (3.5)$$

Der Prozess des Biofilmwachstums ($\Delta M_{\text{Wachstum}}$) erfolgt aufgrund von Nährstoffzufuhr und spielt eine beherrschende Rolle in den Zuwachsprozessen, während die Adhäsion der neuen Mikroorganismen ($\Delta M_{\text{Adhäsion}}$) eher von untergeordneter Bedeutung ist.

Vier Prozesse können die Ablösung der Biomasse vom Biofilm ($\Delta M_{\text{Ablösung}}$) hervorrufen: (i) Abrasion, (ii) Erosion, (iii) Häutung, engl. „sloughing“, sowie (iv) Abgrasen durch höhere Organismen, engl. „grazing“, wobei deren Definition auf der Größe der abge-

lösten Biofilmpartikel basiert. Abrasion und Erosion beziehen sich auf die Ablösung einzelner Zellen oder kleiner Zellgruppen von der Biofilmoberfläche. Infolge eines Zusammenstoßes von Biofilmträgern z. B. während der Rückspülung von Festbettreaktoren erfolgt die Abrasion. Die Erosion wird von durch Strömung oder Turbulenzen des Mediums erzeugten Scherkräften verursacht. Im Gegensatz dazu bezieht sich „sloughing“ auf die Abschälung der ganzen Biofilmbereiche, die gleiche oder größere Dimensionen als die Biofilmdicke haben (Abb 3.6e). „Sloughing“ wird durch zunehmende Dicke des Biofilms, Gasblasenbildung und lang anhaltende Substrat- oder Sauerstoffmangelsituationen in den tieferen Schichten, die den Zusammenhalt vom Biofilm abschwächen, hervorgerufen. Dadurch wird die Heterogenität der Biofilmmorphologie erhöht. Außerdem können in manchen Systemen die Protozoen und andere höhere Organismen den Biofilm abweiden und damit seine Dicke kontrollieren.

In Biofilmreaktoren ist die Ablösung der Biomasse eine Kombination von oben erwähnten Prozessen. In Scheibentauchkörperanlagen finden z. B. „sloughing“ und Erosion statt, wobei in Abhängigkeit von den eingestellten Betriebsbedingungen eines der Prozesse vorherrscht (MORGENROTH & WILDERER, 2000).

Die jeweiligen Bedingungen sowie die Zusammensetzung und Konzentration des zufließenden Abwassers beeinflussen ebenfalls die Eigenschaften des Biofilms (GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, 2000). Verschiedene mikrobiologische Untersuchungen können ein annäherndes Bild über den vorhandenen Biofilm ergeben.

3.2.2. Methoden zur Biofilmanalyse

Es stehen heute eine Reihe von Methoden zur Verfügung, welche die Analyse und Untersuchung von Biofilmen ermöglichen (Abb. 3.7).

Nur 20 % der im Biofilm vorhandenen Bakterien können aus ihrem Habitat isoliert und unter Laborbedingungen kultiviert werden, was zur unvollständigen Charakterisierung des Biofilms führt (SCHAULE & FLEMMING, 1994; MAIER et al., 2000 und ANDREOTTOLA et al., 2002). Deshalb wurden die früher oft verwendeten Verfahren, die auf der Zählung kultivierbarer Kolonien auf Festmedien basierten, mittlerweile durch neue molekulare Techniken zur Analyse bakterieller Populationen ersetzt, die sowohl für die Langzeit-

beobachtung des Biofilms in Abwasserreinigungsanlagen als auch für das Studium von Biofilmen im Labor geeignet sind (ANDREOTTOLA et al., 2002).

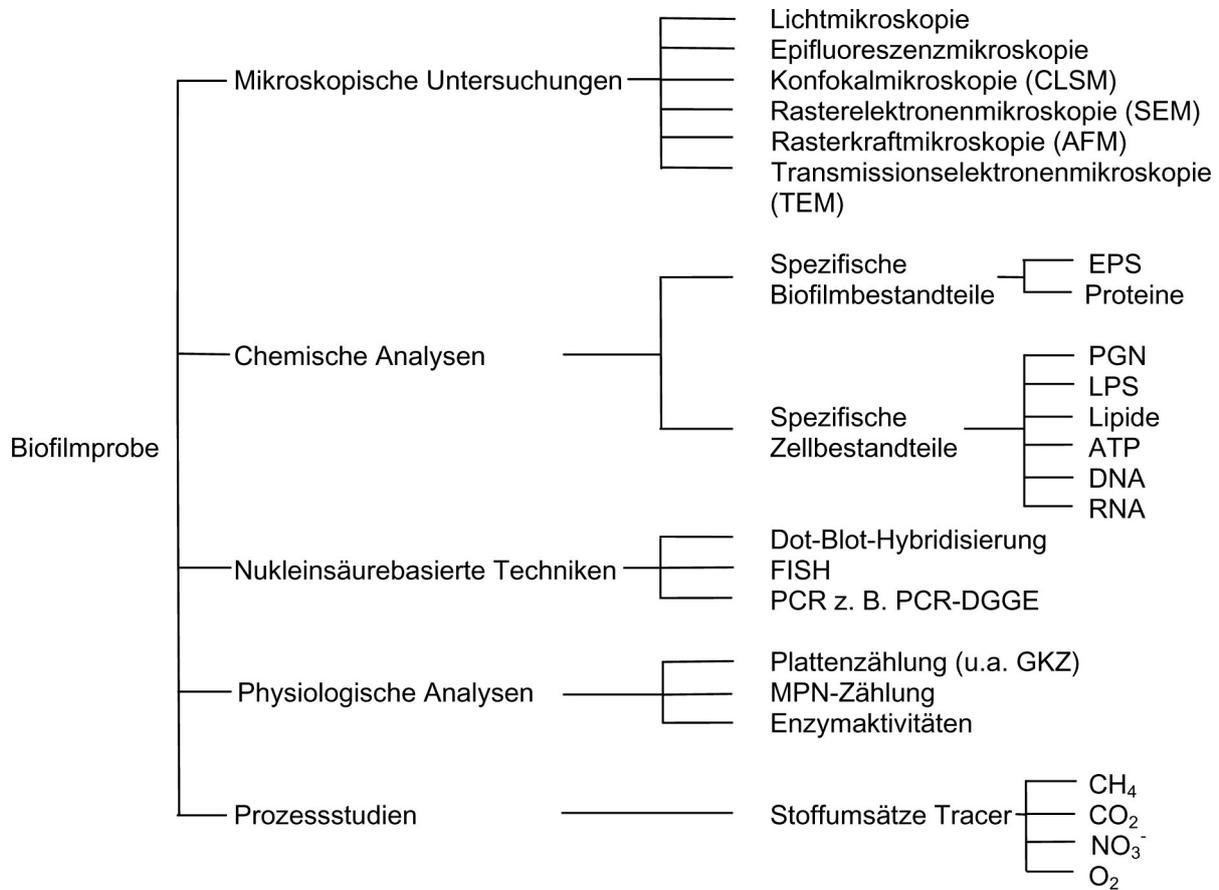


Abb. 3.7: Einige Methoden zur Diagnose, Analyse und Untersuchung von Biofilmen (verändert nach LAZAROVA & MANEM, 1995; PAUL & CLARK, 1996; AMANN et al., 1998 und FLEMMING et al., 2000)

Die Methoden zur Analyse des Biofilms lassen sich grundsätzlich in drei Kategorien unterteilen, welche: (i) die Formation und Struktur des Biofilms; (ii) die Biofilmmensatzung bezogen auf die Gesamtmenge des Biofilms, spezifische Biofilmbestandteile oder zelluläre Komponenten und (iii) die mikrobielle Aktivität beschreiben (LAZAROVA & MANEM, 1995).

3.2.3. Methoden zur Quantifizierung von Biofilmen

Die Quantifizierung der Biofilmbildung kann durch die Bestimmung seiner Dicke oder der flächenbezogenen Biofilmmenge erfolgen (PEYTON, 1996 und STAUDT et al., 2004).

Die Biofilmdicke wird als vertikale Distanz zwischen der Aufwuchsfläche und der Grenzfläche „Biofilm-Wasser“ bezeichnet (PEYTON, 1996). Aus der Literatur sind verschiedene Methoden zur Bestimmung der Biofilmdicke bekannt. Die älteren Methoden bestehen in der Messung der elektrischen Leitfähigkeit, der volumetrischen Verdrängung sowie in der gravimetrischen Messung (PEYTON, 1996).

Die Messung der Biofilmdicke über die elektrische Leitfähigkeit benötigt ein Mikrometer und eine Stahlnadel-Elektrode um festzustellen, wann ein elektrischer Stromkreis geschlossen ist. Ein zusätzliches Erfordernis ist ein mit Biofilm bewachsener Metallbiofilmträger, der getrocknet an einen elektrischen Kreis angeschlossen wird. Solch eine Messung der Biofilmdicke ist jedoch mehrmals in einer Biofilmprobe zu wiederholen, um die Dicke statistisch zu erfassen.

Eine mittlere Dicke des Biofilms wird über die Messung der volumetrischen Verdrängung des eingetauchten Trägermaterials mit Biofilm und des unbewachsenen Trägermaterials selbst ermittelt. Das Volumen vom Biofilm dividiert durch die Fläche des Biofilmsträgers ergibt die angenäherte Biofilmdicke (OGA et al., 1991 und PEYTON, 1996).

Die gravimetrische Messung ergibt ebenso einen angenäherten Wert für die Biofilmdicke. Anhand der gemessenen feuchten Masse des Biofilms m_{WF} und der Fläche des untersuchten Trägermaterials A_F , kann, unter der Annahme der feuchten Dichte des Biofilms von $\rho_{WF} = 1 \text{ g/cm}^3$, die Dicke des Biofilms berechnet werden (Gl. 3.6) (STAUDT et al., 2004):

$$L_F = \frac{m_{WF}}{\rho_{WF} \cdot A_F} \cdot 10 \quad [\text{mm}] \quad (3.6)$$

Mittlerweile stehen eine Reihe neuer sowohl zerstörungsfreier als auch destruktiver Techniken zur Analyse der Biofilmdicke zur Verfügung. Destruktive Methoden, wie die

Raster- bzw. Transmissionselektronenmikroskopie oder Cryo-Einbettung, benötigen eine zusätzliche Probenaufbereitung (weitgehende Dehydratation oder Gefrieren), die oft zu Unterbewertung der Dicke führt. Die zerstörungsfreien Methoden, wie u.a. die Lichtmikroskopie, Infrarotspektroskopie oder Konfokalmikroskopie, verwenden sichtbares Laser- oder Infrarotlicht, um eine dreidimensionale Rekonstruktion des Biofilms zu ermöglichen (PARAMANOVA et al., 2007).

Die Lichtmikroskopie erfordert außer einem Lichtmikroskop mit einer mikrometrischen Fokussiereinheit, ein durchsichtiges Biofilmträgermaterial (PEYTON, 1996). Die Genauigkeit der Methode sinkt mit zunehmender Biofilmdicke und -dichte (PARAMONOVA et al., 2007). Infrarotspektroskopie wird wiederum oft auf die Visualisierung des Biofilms ohne Quantifizierung seiner Dicke eingeschränkt. Diese Technik ist zudem nur für die wenigen Zellen dicker Biofilme einsetzbar und wird als kompliziert und teuer bezeichnet (FREITAS DOS SANTOS & LIVINGSTON, 1995).

Bei der Konfokalmikroskopie werden optische Schnitte mit definiertem Abstand durch die Probe gelegt, so dass die Dicke des ganzen Biofilms ermittelt werden kann (SILYNS-ROBERTS & LEWIS, 1997). Eine gute Messqualität wird dabei nur für Biofilme bis zu ca. 70 µm erreicht (PARAMONOVA et al., 2007).

Die Biofilmdicke gehört zu den Parametern, deren Bestimmung sehr aufwendig ist (PEYTON, 1996). Die Biofilmbildung kann deswegen alternativ über die Messung des Biomassegehalts pro Aufwuchsfläche (g TS/m²) beobachtet werden, da diese eine Funktion der Biofilmdicke ist (OGA et al., 1991 und PEYTON, 1996).

3.2.4. Methoden zur Aktivitätsbestimmung

Allen biologischen Abwasserreinigungsverfahren ist gemeinsam, dass die Umsetzung von organischer Materie bzw. Abwasserinhaltsstoffen ausschließlich von metabolisch aktiven Mikroorganismen durchgeführt wird.

Die Aktivität der Mikroorganismen ist ein wesentlicher Parameter in Abwasserreinigungstechnologien (LAZAROVA & MANEM, 1995), der ein Maß für das mikrobielle Reinigungspotential darstellt. Das eingeleitete Abwasser und die herrschenden Prozess-

bedingungen beeinflussen die Stoffwechselfähigkeit der Mikroorganismen bzw. die Eliminationsleistung des Systems, daher ist ein Überblick über den physiologischen Zustand der komplexen mikrobiellen Gemeinschaft für die Kontrolle, Optimierung und den richtigen und effizienten Betrieb der Abwasserreinigungsanlagen erforderlich (LAZAROVA et al., 1994; ZILOUEI et al., 2006 und CORTEZ et al., 2008).

Trotz ihrer offensichtlichen Bedeutung bleiben die Definition und Messtechniken der mikrobiellen Aktivität kontrovers (BENSAID et al., 2000). Unter dem hier erwähnten Begriff kann man sowohl die Aktivität bezogen auf das Zellteilungsvermögen, also Zellwachstum, als auch die metabolische Aktivität der Zelle, die eine Voraussetzung für das Zellwachstum ist, verstehen (BENSAID et al., 2000 und MAIER et al., 2000). Erstere ist nicht völlig für die Umweltproben anwendbar, beispielsweise auch im Hinblick darauf, dass sowohl die Gesamtzellzahl- als auch die Lebendzellzahlbestimmung nicht dazu geeignet sind, die Zellen, die fest auf den Flächen anhaften, in ihrer Anzahl zu bestimmen (MAIER et al., 2000). Demzufolge haben sich die Messungen der mikrobiellen Aktivität in Umweltproben eher auf die Quantifizierung der metabolischen Aktivität wie z. B. Respiration der bakteriellen Gemeinschaften, konzentriert (ISRANI et al., 2002).

Da die im Biofilm vorhandenen Bakterien Energie aus verschiedenen Stoffumsetzungen gewinnen (siehe Tab. 3.1 oder Abb. 3.4), gibt es auch mehrere Methoden, welche die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität ermöglichen⁶. Eine direkte Anwendung der für freie Bakterien entwickelten Methoden für die Biofilmanalyse ist jedoch nicht immer möglich oder wurde bisher noch nicht eingehend untersucht (LAZAROVA et al., 1994).

Die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismengemeinschaften lässt sich durch verschiedene Methoden bestimmen. Diese umfassen die Messung des Sauerstoffverbrauches (aerobe Bedingungen), des Verbrauches eines anderen Elektronenendakzeptors (anoxische oder anaerobe Bedingungen), der Freisetzung des Kohlenstoffdi-

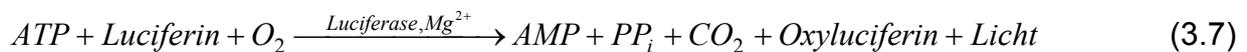
⁶ Einen Überblick über die gängigen Methoden zur Ermittlung der Aktivität hinsichtlich des Prinzips, der Komplexität, der Sensitivität und Reproduzierbarkeit geben LAZAROVA & MANEM (1995).

oxides oder eines anderen Produktes des Energiestoffwechsels (GELLER et al., 1991 und LAZAROVA et al., 1994). Jedoch spiegelt die so nachgewiesene Aktivität nicht die Gesamtaktivität der mikrobiellen Gemeinschaft, sondern die Stoffwechselaktivität der einzelnen vorhandenen Gruppen der Bakterien wider.

Ein Parameter zur Bestimmung der gesamtbiologischen Aktivität im Biofilm stellt die Wärmefreisetzung (Heat Output) dar, die aus den metabolischen Vorgängen resultiert und nicht das Ergebnis einer einzelnen Reaktion ist (ALEF, 1991 und ANDREOTTOLA et al., 2002). Jedoch ist die kalorimetrische Messung mit einem hohen gerätetechnischen Aufwand verbunden.

Andere Methoden, die tatsächlich die Gesamtaktivitätsbestimmung beschreiben, bestehen in der Messung des Adenosintriphosphatgehaltes (ATP-Gehaltes) oder der zellulären Energieladung (AEC) (GELLER et al., 1991). Das Adenosintriphosphat stellt den universellen Überträger chemischer Energie dar und spielt daher eine wesentliche Rolle im Metabolismus der Zellen. Sein Gehalt in der Zelle schwankt abhängig von ihrem Aktivitätsniveau und schwindet nach ihrem Tod (MAIER et al., 2000). Im Vergleich zu anderen Metaboliten ist das ATP in hoher Konzentration vorhanden und gleichmäßig im Protoplasma der Mikroorganismen verteilt, wodurch es extrahierbar ist (LAZAROVA & MANEM, 1995).

Die Quantifizierung besteht in der Messung der Lichtmenge, die bei der Oxidation von Luciferin zu Oxyluciferin in Anwesenheit von ATP hergestellt wird (Gl. 3.7).



Die Energieladung ist ein Gewichtsverhältnis von zellulären Adenylaten (AMP, ADP, ATP), die Indikatoren für den Energiezustand der Mikroorganismen sind (Gl. 3.8).

$$AEC = \frac{ATP + 0.5ADP}{ATP + ADP + AMP} \quad (3.8)$$

ADP und AMP müssen durch enzymatische Reaktionen zum ATP umgesetzt und dann erst quantifiziert werden. Allerdings ist ATP, daher auch AEC, kein praktischer Parameter zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität im Hinblick auf die Komplexität der quantitativen Bewertung und der Empfindlichkeit gegen ATP-Extraktionsverfahren (GIKAS & LIVINGSTON, 1993 und BENSALD et al., 2000).

Aus der Literatur ist auch der Biomassegehalt als eine Messgröße, welche die Aktivität der Mikroorganismen widerspiegelt, bekannt. Jedoch ist die gravimetrische Messung des Biomassegehalts in Biofilmreaktoren aufgrund der inhomogenen Struktur des Biofilms auch keine geeignete Größe für die Bestimmung der Aktivität, da die Differenzierung nach biologisch aktiven und inaktiven Zellen nicht möglich ist.

Eine sehr genaue Methode zur Bewertung des physiologischen Zustandes der Mikroorganismen und gleichzeitig eine viel versprechende Alternative zu den oben erwähnten Vorgehen stellt die Bestimmung der Enzymaktivität (BLENKINSOPP & LOCK, 1990 und LAZAROVA & MANEM, 1995) oder der Ribonukleinsäure dar (PAUL & CLARK, 1996 und SCHWARZ, 2004). In den folgenden Kapiteln werden die Grundlagen dieser beiden Methoden erläutert. Es wird ausführlich auf die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität eingegangen sowie die Atmungsaktivität, die als Maßstab für weitere Methoden der Aktivitätsbestimmung Verwendung findet, dargestellt.

3.2.4.1. Enzymaktivität

Die Mikroorganismen enthalten eine Reihe von Enzymen, die für die Katalyse aller chemischen Reaktionen zuständig sind. Um den Mechanismus einer enzymatisch katalysierten Reaktion darzustellen, wird folgende Formel verwendet (Gl. 3.9):



E	Enzym;
S	Substrat;
ES	Enzym-Substrat-Komplex;
P	Produkt;

k_1, k_{-1}, k_2 Geschwindigkeitskonstanten.

In einem Gleichgewichtszustand ist die ES-Bildungsgeschwindigkeit gleich der Geschwindigkeit, die sich aus der Summe des ES-Zerfalls zum Produkt und zum Substrat ergibt (Gl. 3.10):

$$k_1([E] - [ES]) \cdot [S] = k_2[ES] + k_{-1}[ES] \quad (3.10)$$

Die Geschwindigkeitskonstante k_2 ist wesentlich kleiner als k_1 , daher wird die Geschwindigkeit der Gesamtreaktion V durch k_2 und die Konzentration des ES-Komplexes bestimmt (Gl. 3.11):

$$V = k_2 \cdot [ES] \quad (3.11)$$

Wenn das ganze Enzym mit dem Substrat gesättigt wird ($[E] = [ES]$), liegt die Maximalgeschwindigkeit V_{\max} vor (Gl. 3.12):

$$V_{\max} = k_2 \cdot [E] \quad (3.12)$$

Durch mathematische Umformung der Gleichungen 3.10, 3.11 und 3.12 lässt sich die Michaelis-Menten-Gleichung ableiten (Gl. 3.13):

$$V = V_{\max} \cdot \frac{[S]}{K_m + [S]} \quad (3.13)$$

V	Reaktionsgeschwindigkeit [g/g·h];
V_{\max}	maximale Reaktionsgeschwindigkeit [g/g·h];
K_m	Michaeliskonstante [mg/L].

welche die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Substratkonzentration beschreibt (Abb. 3.8a).

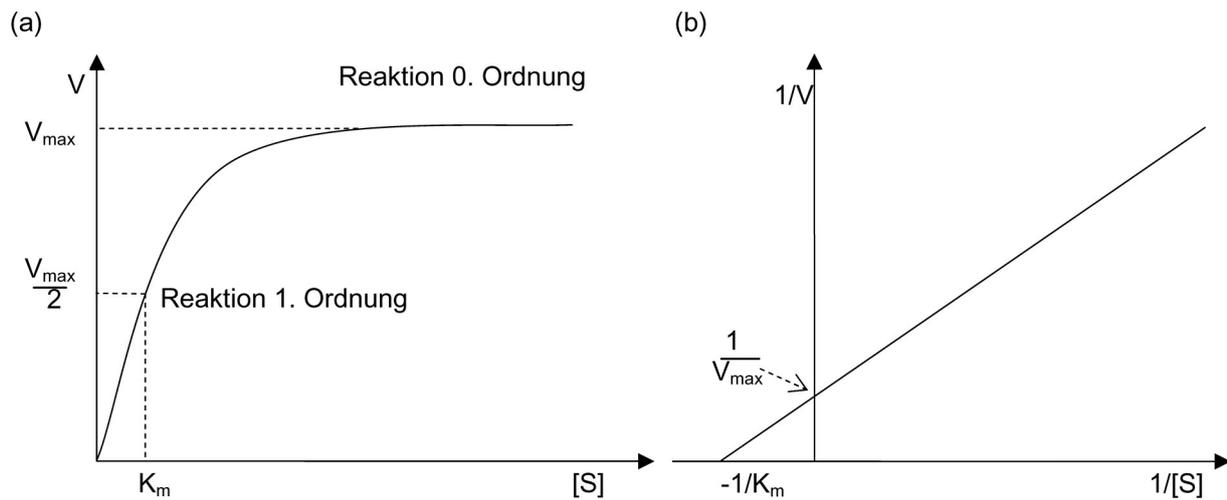


Abb. 3.8: Grafische Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung: (a) Abhängigkeit der Geschwindigkeit einer enzymkatalysierten Reaktion von der Substratkonzentration, (b) Linearisierung nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung der Konstanten K_m und V_{\max}

Die Michaeliskonstante K_m ist eine Zusammenfassung der Reaktionskonstanten (Gl. 3.14):

$$K_m = \frac{k_2 + k_{-1}}{k_1} \quad (3.14)$$

Zur Ermittlung der V_{\max} und K_m kann die transformierte Darstellung nach Lineweaver-Burk angewendet werden (Gl. 3.15 und Abb. 3.8b):

$$\frac{1}{V} = \frac{1}{V_{\max}} + \frac{K_m}{V_{\max} \cdot [S]} \quad (3.15)$$

Die Reaktionsgeschwindigkeit ist proportional zur Enzymaktivität, die für gewisse Enzyme durch eine Bioanalyse nachgewiesen werden kann. Ausgehend von der Reaktion (Gl. 3.9) basiert diese Bioanalyse auf einer Messung: (i) der Abnahme der Konzentration eines Substrats ($-d[S]/dt$), das durch das Enzym in das Produkt umgewandelt wird, oder (ii) der Zunahme der Konzentration eines Produktes ($d[P]/dt$) der enzymatischen Reaktion (HARTMANN, 1992). Die Substrate und die Reaktionsprodukte werden durch chemische, spektroskopische oder fluorimetrische Nachweisverfahren erfasst (Tab. 3.2).

Tab. 3.2: Ausgewählte Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Enzymaktivitäten (ATLAS & BARTHA, 1981; OBST & SCHMITZ, 1983 und MAIER et al., 2000)

Enzym	Enzymatische Reaktion	Substrat	Beschreibung des Verfahrens
Dehydrogenase	Abspaltung von Wasserstoffatomen	Tetrazoliumsalz	Reduziertes Tetrazoliumsalz wird mit Ethanol extrahiert und spektrophotometrisch quantifiziert.
Phosphatase	Abspaltung der Phosphorsäure aus Phosphorsäureestern oder Polyphosphaten	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat	<i>p</i> -Nitrophenylphosphat wird zum <i>p</i> -Nitrophenol umgesetzt, in einer wässrigen Lösung extrahiert und spektrophotometrisch quantifiziert.
Amylase	Abbau von Polysacchariden (z. B. Stärke)	Stärke	Die restliche Stärke wird nach der Reaktion mit Iod spektrophotometrisch quantifiziert.
Chitinase	Abbau von Chitin	Chitin	Die Produktion von reduzierendem Zucker wird mittels Anthron Reagenz gemessen.
Cellulase	Abbau der Cellulose	Cellulose	Die Produktion von reduzierendem Zucker wird mittels Anthron Reagenz gemessen.
Nitrogenase	Reduktion des Luftstickstoffs	Acetylen	Acetylen wird zum Ethylen umgewandelt und gemessen mittels der Gaschromatographie; die Stickstofffixierung wird mithilfe eines Koeffizienten ausgerechnet.

Welche Methode zur Bestimmung der mikrobiellen Enzymaktivitäten gewählt wird, hängt generell von der jeweiligen Fragestellung ab (OBST & SCHMITZ, 1983). Mittels einiger der oben erwähnten Verfahren, wie der Chitinase- oder Cellulasetest, wird eine mikrobielle Aktivität der für die speziellen Abbauewege typischen Enzyme bestimmt. Andere, wie die häufig verwendete Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität, ermöglichen eine Aussage über die Gesamtaktivität der Mikroorganismen und können zur Kontrolle der biologischen Stoffumsetzungen und Beschreibung der Effizienz mikrobieller Reinigung angewendet werden (ATLAS & BARTHA, 1981 und OBST, 1995).

3.2.4.2. Dehydrogenasenaktivität

Die Dehydrogenasen befinden sich im Zytoplasma oder sind strukturegebunden an die Zytoplasmamembran der metabolisch aktiven Mikroorganismen. Sie stellen ein Element des Stoffwechsels von aeroben, fakultativ aeroben und anaeroben Mikroorganismen dar, das an die Herstellung der biologisch verfügbaren Energie (ATP) gebunden ist (BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK, 2005). Diese Enzyme katalysieren die Abspaltung des Wasserstoffes (Gl. 3.16) bzw. je zweier Protonen (2H^+) und Elektronen (2e^-) von

Wasserstoffdonatoren (Dehydrierung des Substrats) und deren Übertragung auf Endakzeptoren (LOPEZ et al., 1986).



Folglich wird die enzymatische Fähigkeit der Mikroorganismen zur Dehydrierung des reduzierten organischen Substrats unter definierten Bedingungen als die Dehydrogenasenaktivität bezeichnet (PN-82/C-04616.08, 1983). Im Gegensatz zu vielen anderen Enzymen erlischt die Aktivität der Dehydrogenasen mit dem Tod der Zellen. Sie kann daher ein Maß für die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen sein und die Abbaukapazität der Biozönose widerspiegeln (OBST, 1995 und SCHWARZ, 2004).

Die Dehydrogenasenaktivität und dadurch auch die metabolisch aktiven Bakterien werden durch verschiedene Tetrazoliumsalze nachgewiesen. Die Salze dienen als artifizielle Endakzeptoren. Sie ersetzen die natürlich vorkommenden H^+/e^- -Akzeptoren und übernehmen die durch die Dehydrogenasen abgetrennten zwei Elektronen und eines von zwei Protonen. Gleichzeitig erfolgt die Reduktion des wasserlöslichen und fast farblosen Tetrazoliumsalzes zum rötlichen, unlöslichen Formazanprodukt (Abb. 3.9), das sich innerhalb der Zellen akkumuliert und anschließend nach einer definierten Reaktionszeit auf verschiedenen Wegen gemessen werden kann.

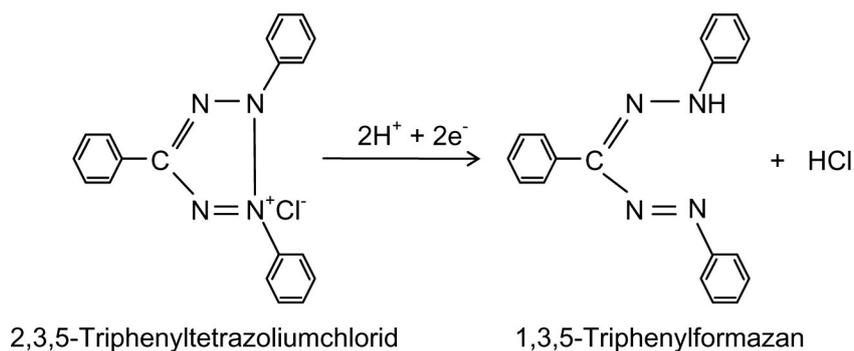


Abb. 3.9: Reduktion des Tetrazoliumsalzes anhand des Beispiels von 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC)

Zellen, die roten Farbstoffkomplex akkumuliert haben, können mikroskopisch identifiziert und aufgezählt werden, was die Ermittlung vom prozentualen Anteil der metabolisch aktiven Mikroorganismen an der ganzen Biozönose ermöglicht, während die ge-

samte Formazanproduktion quantitativ mittels Absorptionsspektrophotometrie bestimmt werden kann. Dazu muss das produzierte Formazan aus den Zellen mit organischen Extraktionsmitteln z. B. Ethanol extrahiert werden (MAIER et al., 2000 und McCLUSKEY et al., 2005).

Am häufigsten werden die 2-(*p*-Iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid (INT), 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) und 5-Cyano-2,3-di-4-tolyltetrazoliumchlorid (CTC) verwendet (STENELAIRE et al., 2001 und YIN et al., 2005).

Seit kurzem ist eine neue Generation der Tetrazoliumsalze erhältlich: MTS, WST-1 und XTT. Sie unterscheiden sich von den oben erwähnten Salzen dadurch, dass sie die Sulfongruppen enthalten. Infolgedessen ist das nach der Reduktion entstehende orange-rote Formazan wasserlöslich und kann quantitativ ohne vorhergehende Extraktion ausgewertet werden. Die Menge des gebildeten Formazans ist proportional zur Dehydrogenasenaktivität der Mikroorganismen (McCLUSKEY et al., 2005).

Die Spezifität des Dehydrogenasentests hängt von der verfügbaren Substrat-, Cosubstrat- sowie dem Enzym-Muster ab (REICHARDT, 1978). Die maximale potenzielle respiratorische Kapazität der Mikroorganismen wird durch Inkubation des aus den Zellen hergestellten Enzymextraktes⁷ mit der Tetrazoliumsalzlösung und einer Substratlösung erfasst, wobei die Substratlösung die Atmungsstimulatoren wie NADH, NADPH und Succinate enthält (BLENKINSOPP & LOCK, 1990). Diese Vorgehensweise wurde für das Meeresplankton entwickelt. Die Zugabe der Atmungsstimulatoren erhöht das Meßsignal, so dass auch im oligotrophen Gewässer Bioaktivität nachgewiesen werden kann (REICHARDT, 1978). Die *in situ* Aktivität wird mit intakten Zellen, ohne Zugabe von Atmungsstimulatoren und im angenäherten Substratmilieu des Biotops erfasst (BLENKIN-SOPP & LOCK, 1990).

Seit 1941, als die intrazelluläre Reduktion des 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorids durch Dehydrogenasen in Hefen und Bakterien von KUHN & JERCHEL (1941) nachgewiesen

⁷ Nach dem Zellaufschluß ist die Aktivität schnell zu messen (OBST, 1995)

wurde, fand die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität eine breite Anwendung in unterschiedlichen Bereichen der Forschung. Die verschiedenen Tetrazoliumsalze wurden eingesetzt u.a. zur Bestimmung der Aktivität von T-Zellen⁸ und einiger Zelllinien (ROEHM et al., 1991), von Reinkulturen wie *E. coli*, *Pseudomonas putida* und *Bacillus subtilis* (ROSLEV & KING, 1993), Pilzsporen (STENTELAIRE et al., 2001), Meeresplankton (PACKARD et al., 1983), Bakterioplankton im eutrophen Ästuar (JEFFREY & PAUL, 1986), Flussbiofilmen (BLENKINSOPP & LOCK, 1990; CLARET & FONTVIELLE, 1996 und ROMANI & SABATER, 2001) und Bodenmikroorganismen (TREVORS et al., 1982). Außerdem wurde der Dehydrogenasentest zur Kontrolle des Prozessverlaufes z. B. beim thermophilen und mesophilen Kompostierungsstadium (BARRENA et al., 2008) sowie zur Beurteilung der anaeroben Bioabbaubarkeit organischer Stoffe (HONGWEI et al., 2002) verwendet. Des Weiteren untersuchten LE BIHAN & LESSARD (1998) und LIU & TAY (2001) basierend auf der Dehydrogenasenaktivität den Einfluss der Betriebsparameter, -bedingungen und toxischer Substanzen auf die Biomasse in einem Biofilter und einem Ringscheibenreaktor.

Auf dem Gebiet der Abwasserreinigung setzten BUCKSTEEG & THIELE (1959) den TTC-Test zur Bestimmung der Aktivität des Belebtschlammes ein. Sie haben auch die Begriffe der Gesamtaktivität ($\mu\text{g TF}/10 \text{ mL}$ des Abwasser-Belebtschlammgemisches) und der spezifischen Aktivität ($\mu\text{g TF}/\text{mg}$ Trockenrückstand des Schlammes) eingeführt. Seitdem wurde die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität hauptsächlich für Untersuchungen des Belebtschlammes wie z. B. bei LOPEZ et al. (1986) und GRIEBE et al. (1997) und Fadenbakterien (KIM et al., 1994) genutzt. Im Hinblick auf die Schwierigkeiten mit den Probenentnahmen verwendete man sie seltener für die fixierte Biomasse (LE BIHAN & LESSARD, 1998). Bei Verwendung wurde die Biomasse meist vom Trägermaterial abgetrennt, suspendiert und weiter wie ein Belebtschlamm betrachtet (RITTMANN et al., 1992 und COLE et al., 2004). Dies konnte jedoch zur Verminderung der Aktivität führen. Die Aktivitätsbestimmung ohne vorhergehende Abtrennung der Biomasse wurde mehrmals als präziser bezeichnet, jedoch nur für Biofilme auf Glas-

⁸ Thymusabhängige Lymphocyten

perlen, Aktivkohlegranulat und Sandproben eingesetzt (BLENKINSOPP & LOCK, 1990; CLARET & FONTVIEILLE, 1996 und QING et al., 2006).

Tab. 3.3: Anwendung der verschiedenen Tetrazoliumsalze zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität des Biofilms

Tetrazoliumsalz	Anwendung	Inkubationszeit (Inkubationstemperatur)	Wellenlänge [nm]	Einheit	Literaturquelle
INT	Biofilm (Ringscheibenreaktor)	20 min (22 ± 2 °C)	490	Abs/mg TS	LIU & TAY (2001)
INT	Flussbiofilm	1 - 16 h (10 °C)	480	µg INT-F/cm ² ·h	BLENKINSOPP & LOCK (1990)
INT	Biofilm (Wirbelschichtreaktor)	1 h (25 °C)	mikroskopische Untersuchung	-	RITTMANN et al. (1992)
INT	Biofilm (Membranbelebung)	2 h (40 °C)	464	µg INT-F/mm ²	COLE et al. (2004)
INT	Flussbiofilm	10 - 12 h	480	µg INT-F/cm ² ·h	ROMANI & SABATER (2001)
TTC	Biofilm (Biofilter)	keine Daten	Keine Daten	mg TF/h·L*	LE BIHAN & LESSARD (1998)
TTC	Biofilm (Aktivkohlefilter)	24 h (37 °C)	492	g TF/g TSC·h**	QING et al. (2006)
TTC	Biofilm (Biofilter)	1 h (30 °C)	490	mg TF/g VSS	LE BIHAN & LESSARD (2000)
CTC	Flussbiofilm	3 h (20 °C)	445	µM CTC-F/g TS·h	CLARET & FONTVIEILLE (1996)
CTC	Flussbiofilm	1 h (25 °C)	mikroskopische Untersuchung	-	ARAYA et al. (2003)

* Menge des Wassers in Litern von der Rückspülung des Biofilters

** TSC = Trockensubstanz der Aktivkohle

Es kam verhältnismäßig oft zu einer Modifikation der Methode zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität (Tab. 3.3).

Hierbei wurden mehrere analytische Vorgehensweisen und optimale experimentelle Bedingungen empfohlen, wobei sich die Unterschiede vorwiegend auf die Inkubationszeit (20 min - 24 h) und Inkubationstemperatur (10 - 40 °C) aber auch auf das organische Substrat, die Tetrazoliumsalzkonzentration sowie die Extraktionslösung oder Wellenlänge der Absorptionsmessung beziehen.

In Abhängigkeit von der Prozedur betragen die Wellenlängen, die zu einem Absorptionsmaximum von 1,3,5-Triphenylformazan führen, 480 nm, 485 nm, 490 nm und 492 nm. Die unterschiedlichen Absorptionsmaxima resultieren aus den verschiedenen eingesetzten Lösungsmitteln, obwohl für ein Lösungsmittel teilweise mehrere Wellenlängen berichtet wurden (Tab. 3.4). Die so gemessenen Dehydrogenasenaktivitäten können nicht miteinander verglichen werden.

Tab. 3.4: Wellenlängen der Absorptionsmessung von 1,3,5-Triphenylformazan

Wellenlänge [nm]	Extraktionsmittel	Literaturquelle
480	96 % Ethanol	RYSISOV-NIELSEN (1975)
	70 % Ethanol	BUCKSTEEG & THIELE (1959)
	70 % Ethanol	DEV L3 (1993)
485	Tetrachloroethylene-acetone (2:3)	BURTON & LANZA (1986)
	n-Butanol	KLAPWIJK et al. (1974)
	70 % Ethanol	BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK (2005)
	96 % Ethanol	LENHARD (1968)
490	n-Butanol	PN-82/C-04616.08 (1983)
492	Toluene	QING et al. (2006)

Die Dehydrogenasenaktivität wird in verschiedenen Einheiten dargestellt, meistens aber als Menge an produziertem Formazan pro Trockengewicht der Biomasse (oder Flächeneinheit des Trägermaterials) pro Inkubationszeit angegeben.

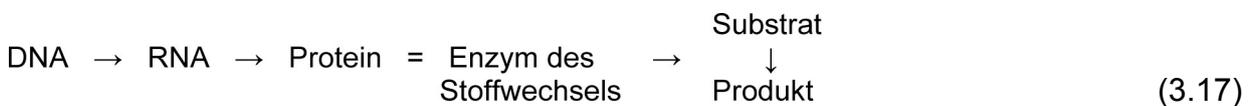
3.2.4.3. Nukleinsäurekonzentration

Die Nukleinsäuren sind Biopolymere, die aus Nukleotiden aufgebaut sind und als Informationsspeicher und Signalüberträger dienen. Grundsätzlich wird zwischen zwei verschiedenen Nukleinsäuren unterschieden: Ribonukleinsäure (RNA) und Desoxyribonukleinsäure (DNA), wobei beide einen integralen Bestandteil der Proteinbiosynthese darstellen.

In der DNA ist die genetische Information für den Bau von Proteinen enthalten. Die höher molekulare messenger-RNA (mRNA⁹), die eine geringe Halbwertszeit aufweist, nimmt die auf der DNA liegende genetische Information (Transkription) und überträgt

⁹ 2-10 % der gesamten RNA der Zelle

sie zum Ribosom, wo sie als Vorlage für die Proteinbiosynthese dient. Einzelne Aminosäuren werden von der niedermolekularen transfer-RNA (tRNA¹⁰) aus dem Zytoplasma aufgenommen und in eine für die Synthese des spezifischen Proteins erforderliche Position (zum Ribosom) transportiert. Außer mRNA und tRNA befindet sich in der Zelle die ribosomale RNA (rRNA¹¹). Sie stellt einen Bestandteil der Ribosomen dar. Während der Proteinsynthese wird in der rRNA die Basensequenz der mRNA in die Aminosäuresequenz des Proteins übersetzt (Translation). Das Ribosom verknüpft die Aminosäuren zu einer Kette. Anschließend entsteht ein Enzymprotein, das am Bau- und Energiestoffwechsel beteiligt ist (Gl. 3.17).



Während die zelluläre DNA stabil ist und zur Bestimmung der Biomasse (aktive und inaktive Bakterien) angewendet werden kann, hängt die RNA-Konzentration von der Wachstumsrate der Zellen ab und kann zur Bestimmung der metabolischen Aktivität dienen (MUTTRAY & MOHN, 1998; SPRING et al., 2000 und SCHWARZ et al., 2006).

Es gibt verschiedene Analysemethoden, welche die Bestimmung der Nukleinsäuren in Umweltproben ermöglichen. Die klassischen Methoden bestehen in den spektrophotometrischen Messungen, die spezifische Absorption der Nukleinsäuren verwenden oder in den fluorometrischen Messungen, die fluoreszierende Farbstoffe benötigen (DELL'ANNO et al., 1998). Von den vorhandenen Nukleinsäuren wird hauptsächlich die DNA-Konzentration ermittelt. Aufgrund der Ribonukleasen, Enzyme, die speziell die RNA abbauen und sogar nach dem Autoklavieren wieder renaturieren können, ist die RNA deutlich seltener untersucht worden (MORAN et al., 1993; PAUL & CLARK, 1996 und SCHWARZ, 2004). Außerdem betreffen die meisten Untersuchungen der RNA die Messung der rRNA, während die „Gesamt-RNA“ unter deren Begriff die Summe von tRNA und rRNA¹² zu verstehen ist, kaum ermittelt wurde. Die Bestimmung der RNA

¹⁰ Etwa 15 % der gesamten RNA der Zelle

¹¹ Etwa 80 % der gesamten RNA der Zelle

¹² Die mRNA wurde aufgrund sehr geringer Menge und Halbwertszeit nicht quantifiziert.

muss um Ribonuklease-freie Arbeiten und Chemikalien ergänzt werden (SCHWARZ, 2004).

Eine Alternative zu den oben erwähnten Methoden stellt die simultane Bestimmung der Nukleinsäuren mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. high performance liquid chromatography, HPLC) - früher auch Hochdruckflüssigchromatographie (engl. high pressure liquid chromatography) genannt - dar. Es ist ein Trennverfahren, in dem die zu analysierende Substanz, die sich in einem Laufmittel befindet (= die mobile Phase), in eine Trennsäule mit hohem Druck gepumpt wird. Die Stärke der Wechselwirkung der Substanz mit dem Füllmaterial der Säule (= die stationäre Phase) ergibt sich aus den verschiedenen Retentionszeiten der Substanzbestandteile. Unterschiedlich stark aufgehaltene Komponenten verlassen die Säule zu verschiedenen Zeiten. Beim Austritt aus der Säule können die einzelnen Stoffe mit einem geeigneten Detektor nachgewiesen werden. Die Messwerte werden in Form eines so genannten Chromatogramms dargestellt (DELL'ANNO et al., 1998).

Die HPLC wurde selten zur Nukleinsäurebestimmung angewendet; die einzelnen darauf bezogenen Arbeiten stammen von COLPAN (1983), COPPELLA et al. (1987), DELL'ANNO et al. (1998) und SCHWARZ (2004). COLPAN (1983) entwickelte ein Verfahren für eine schnelle und effektive Isolierung von Viroiden aus Pflanzen. COPPELLA et al. (1987) führte eine erfolgreiche Trennung der Nukleinsäuren vom *E. coli* Zellysats mittels HPLC durch. Ein paar Jahre später setzte DELL'ANNO et al. (1998) die weiterentwickelte Methode von COPPELLA et al. (1987) für die Ermittlung der DNA, RNA und des RNA/DNA-Verhältnisses in marinen Sedimente ein und verglich sie mit den klassischen Methoden für die Extrahierung und Quantifizierung der Nukleinsäuren. Einen weiteren Fortschritt brachte SCHWARZ (2004), der die Methode um verschiedene Parameter wie die Ribonuklease-freien Arbeiten und die Probenentnahme mit flüssigem Stickstoff ergänzte, modifizierte und optimierte und zur Bestimmung der mikrobiellen Biomasse und Aktivität im Sandfilter anwendete. Hierbei ist zu betonen, dass durch die Isolierung der DNA und RNA aus derselben Fraktion der Probe und durch die simultane quantitative Erfassung mit der HPLC die Ergebnisunterschiede, die aus der mikrobiellen Heterogenität der Umweltproben oder den Extraktionsbedingungen resultieren können, minimiert wurden (HURT et al., 2001). Somit kann sowohl ein Überblick über die Populationsgröße als auch über deren katabolische Aktivität gegeben werden (YU

& MOHN, 1999 und JONTOFSOHN, 2002). Die Methode erfüllt die Kriterien, die HURT et al. (2001) als erforderlich für eine Methode zur Gewinnung der Nukleinsäuren aus den Umweltproben dargestellt haben. Das sind u.a. (i) einfache, schnelle und kostengünstige Extraktions- und Reinigungsmethode, (ii) hohe Extraktionseffizienz, (iii) Zuverlässigkeit, Universalität und Anwendungsbreite, und wie schon oben erwähnt (iv) gleichzeitige Extraktion der DNA und RNA.

3.2.4.4. Atmungsaktivität

Der aus den Stoffwechselprozessen aerober Mikroorganismen resultierende Sauerstoffverbrauch bzw. die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauches infolge von Atmung können mittels respiratorischer Messungen ermittelt, auf die Biomasse bezogen und als Atmungsaktivität ausgedrückt werden.

Unter der Voraussetzung, dass der Stoffwechsel vollkommen aerob gedeckt wird, kann die Atmungsaktivität als Maß für die Stoffwechselaktivität der gesamten Biomasse dienen und Informationen über den jeweiligen Zustand des Systems liefern (ATV, 1997). Die zusätzliche Anwendung von selektiven Hemmstoffen bei der Sauerstoffverbrauchsmessung ermöglicht die Bestimmung der Aktivitäten von einzelnen vorhandenen Gruppen (Heterotrophen, ammonium- und nitritoxidierenden Bakterien), wobei die Inhibitoren nur umgehend und komplett die Aktivität der als Ziel gesetzten Population beinhalten sollen ohne die Aktivitäten der anderen Populationen zu beeinflussen (GINESTET et al., 1998). Ausgehend davon können mittels der Sauerstoffverbrauchsmessung sowohl die endogene Atmungsaktivität der Biomasse (Grundatmung) bei Heterotrophen und/oder Nitrifikanten als auch die maximale Atmungsaktivität in Substratgegenwart (Substratatmung) bestimmt werden. Beim Einsatz der verschiedenen Substrate ist zusätzlich eine Aussage über deren Abbaubarkeit sowie den Einfluss der Gift- bzw. Hemmstoffe auf dem Stoffwechsel der Mikroorganismen möglich (YIN et al., 2005).

In der Forschung wurde die Messung der Atmungsgeschwindigkeit bzw. Atmungsaktivität öfter für Untersuchungen des Belebtschlammes eingesetzt und entweder zur Abschätzung der aktiven Fraktion der Biomasse oder als Maßstab für andere Methoden der Aktivitätsbestimmung verwendet (ALEF, 1991). LOPEZ et al. (1986) untersuchte den

Effekt vom Schlammalter auf die Dehydrogenasenaktivität (INT-Test) in chlorbehandelten Proben. Die Atmungsgeschwindigkeit wurde zusätzlich gemessen und mit den Ergebnissen der ersten Methode verglichen. Wenige Jahre später bestimmten BENSID et al. (2000) und McCLUSKEY et al. (2005) die mikrobielle Aktivität eines stabilen Belebtschlammes mittels der Sauerstoffverbrauchsmessung und des Dehydrogenasentests und wiesen ein lineares Verhältnis zwischen den Ergebnissen der beiden Messungen nach. Auf einen Zusammenhang zwischen Sauerstoffverbrauch und ATP-Gehalt - einem anderen Maß der mikrobiellen Aktivität - wiesen LAZAROVA & MANEM (1995) in ihrem Übersichtartikel zur Biofilmcharakterisierung und Aktivitätsanalyse in Wasser- und Abwasserreinigung hin. Des Weiteren wendeten LØKKEGAARD BJERRE et al. (1998) die Sauerstoffverbrauchsmessung zur Aktivitätsbestimmung des auf dünnen, rauen Plastikplättchen wachsenden Biofilms an.

4. Hintergrund und Zielsetzung der Arbeit

Scheibentauchkörper nach heutiger Ausprägung werden seit nunmehr 50 Jahren erfolgreich und nahezu universell für die Behandlung kleinerer und mittlerer Abwassermengen eingesetzt. Das erste Regelwerk der ATV zur Dimensionierung von Scheibentauchkörpern wurde vor annähernd 20 Jahren publiziert (ATV-ARBEITSBLATT-A 135; 1989). Auch zwei zwischenzeitlich erschienene Novellierungen haben am Prinzip der Bemessung nichts verändert. Nach wie vor wird die Dimensionierung, differenziert nach dem Reinigungsziel und der Anzahl der Kaskaden, auf der Basis einer zulässigen Scheibenbelastung vorgenommen. Dieser kompakte und leicht überschaubare Bemessungsvorgang liegt vorrangig in der Einfachheit der Technologie begründet, wirft aber andererseits auch die Frage auf, ob diese Vorgehensweise heute nach wie vor als Stand der Technik angesehen werden kann.

Dieses Defizit an biotechnologisch basierter Herangehensweise beruht nicht zuletzt auch auf der Komplexität der Biofilmmtechnologie. In einer Ära der Renaissance von Biofilmmtechnologien und einem erweiterten Verständnis der Zusammenhänge und Abläufe in Biofilmen einerseits und weiter entwickelten Untersuchungsmethoden und Werkzeugen ist es nur naheliegend, die offenen Fragen aufzugreifen und nach Antworten zu suchen.

Derzeit werden Parameter, welche die Aktivität des Biofilms beschreiben, nicht betrachtet und folglich auch nicht einbezogen. Die zuvor getroffenen Aussagen über die Bedeutung der mikrobiellen Aktivität erfordern die Entwicklung einer Methode zur Quantifizierung der Aktivität des Scheibenbewuchses. Somit ist die Verfügbarkeit einer schnellen, kostengünstigen und einfachen Methode zur Beurteilung der mikrobiellen Aktivität in Biofilmanlagen ein wesentliches Element für das Verständnis, die Kontrolle und Optimierung der im Biofilm ablaufenden Prozesse (McCLUSKEY et al., 2005).

Aus diesem Grund wird im Rahmen der vorliegenden Arbeit zunächst eine auf der Dehydrogenasenaktivität basierende Analysenmethode zur Bestimmung des physiologischen Zustands des Biofilms in Scheibentauchkörpern entwickelt. Die Methode soll die Stoffwechselaktivität des intakten Biofilms erfassen und dabei weder die intrazellulären noch die extrazellulären Prozesse behindern, um dadurch einen möglichen Aktivitäts-

verlust zu verhindern. Des Weiteren muss die analytische Prozedur an die hohe Biomassekonzentration in Scheibentauchkörpern angepasst werden.

Zu diesem Zweck wurde eine Scheibentauchkörperanlage im Labormaßstab mit entfernbaren Aufwuchsplättchen konzipiert, konstruiert und betrieben. Die Plättchen gewährleisten einen reproduzierbaren Aufwuchs des Biofilms auf definierten Oberflächen der Größe 10 cm². Sie können, ohne die Biofilmstruktur zu zerstören, entnommen und den Untersuchungen unterzogen werden. Die Anlage wurde mit synthetischem Abwasser beschickt, um gleich bleibende Bedingungen für das Biofilmwachstum sicher zu stellen.

Im zweiten Schwerpunkt der Arbeit sollte die Brauchbarkeit der entwickelten Methode für den Biofilm aus Scheibentauchkörpern aufgezeigt werden.

Wesentlich in Bezug auf die Scheibentauchkörper-technologie ist das Fehlen konkreter Aussagen, bei welchen Biofilmdicken bzw. bei welchem Bewuchs eine optimale Leistung der Scheibentauchkörper zu erwarten ist. Solche Kenntnisse sind jedoch wichtig, da bei dickeren Biofilmen die Unterschichten keinen wesentlichen Beitrag zu dem Reinigungsergebnis leisten (ZHANG et al., 1994). Es sollte dementsprechend unter Verwendung des Dehydrogenasentests eine Dicke bzw. Biofilmmenge bestimmt werden, ab derer die Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft, bezogen auf die Scheibenfläche, nicht weiter gesteigert werden kann.

Darüber hinaus sollte es untersucht werden, ob die Schwankungen der Temperatur und Substratkonzentration als Änderung der Dehydrogenasenaktivität erkannt werden können. Die Kenntnisse zum Temperatureinfluss auf den Substratumsatz der Mikroorganismen in Biofilmreaktoren sind bisher sehr dürftig (ZILOUEI et al., 2006). Generell können jedoch sowohl die Temperatur als auch die Substratkonzentration neben der Sauerstoffkonzentration und dem pH-Wert als die wichtigsten geschwindigkeitsbestimmenden Kriterien des Reinigungsprozesses angesehen werden (HARTMANN, 1992). Der Zielsetzung der Arbeit entsprechend, sollen die zu quantifizierenden Einflussgrößen variiert sowie die restlichen Randbedingungen kontrolliert und konstant gehalten werden.

In Ergänzung zu den vorab skizzierten Untersuchungen soll auf Basis der Dehydrogenasenaktivitätswerte und RNA-Konzentrationen im Biofilm eine longitudinale Verteilung der Aktivität in den einzelnen Kaskaden des Scheibentauchkörpers dargestellt werden. Dies ist für die Charakterisierung und Modellierung des kontinuierlichen Reaktorbetriebs von entscheidender Bedeutung (LINDEMANN, 2002).

Die Ergebnisse aus dieser Arbeit sollen zur weiteren Aufklärung der in Scheibentauchkörpern ablaufenden Prozesse beitragen und die grundlegenden Kenntnisse auf diesem Gebiet erweitern. Die Arbeit greift die grundlegenden Fragestellungen wie Temperatureinfluss oder Einfluss der Substratkonzentration auf die Aktivität des Biofilms auf und eröffnet damit die Möglichkeit einer Weiterentwicklung und einer Effizienzsteigerung der Scheibentauchkörpertechnologie. Ferner sollen die Untersuchungen wegweisende Hinweise zur Verteilung der mikrobiellen Biomasse und deren Aktivität in den einzelnen Kompartimenten eines Scheibentauchkörpers liefern.

5. Material und Methoden

5.1. Aufbau und Betrieb der Versuchsanlage

5.1.1. Aufbau der Versuchsanlage

In dieser Arbeit wurde ein Scheibentauchkörper im labortechnischen Maßstab eingesetzt, um mit reproduzierbaren Biofilmproben arbeiten zu können. Die Anlage bestand aus zwei, von Abwasser durchströmten, hintereinander angeordneten Kaskaden (Kaskadenordnung), die mit einer Wand abgetrennt wurden.

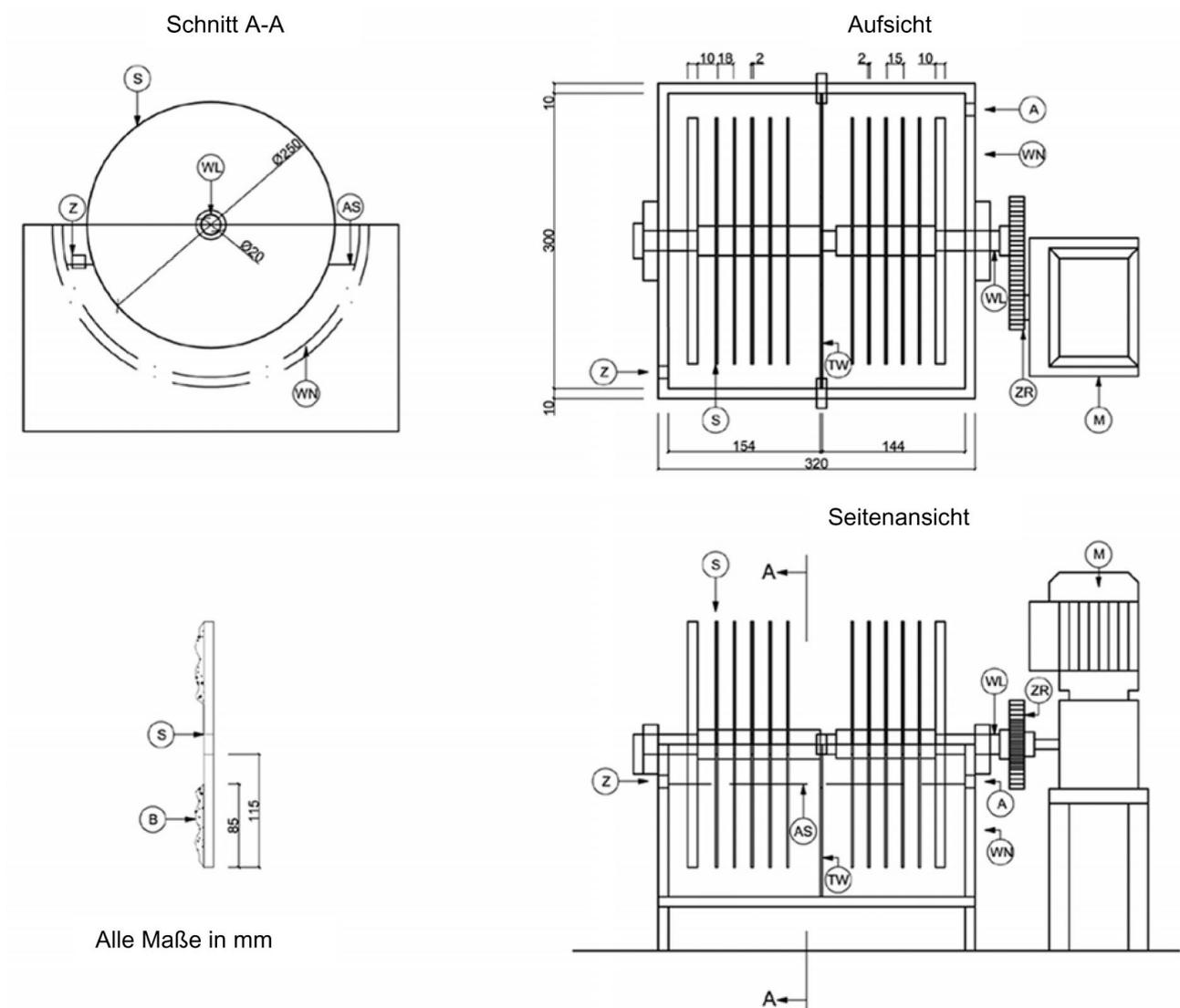


Abb. 5.1: Schema der Versuchsanlage (A = Ablauf, AS = Abwasserspiegel, B = Biofilm, S = Scheibe M = Getriebemotor, TW = Trennwand, WL = Welle, WN = Wanne, Z = Zulauf, ZR = Zahnrad)

Eine horizontale Achse fasste 12 kreisrunde Scheiben (\varnothing 250 mm), die sich in geringen Abständen voneinander befanden und zu 40 % im Abwasser eingetaucht waren. In Abbildung 5.1 und Tabelle 5.1 ist die Ausstattung der Anlage dargestellt.

Tab. 5.1: Ausstattung der Versuchsanlage

Bezeichnung	Einheit	Wert
Wanne		
Durchmesser	mm	320
Länge	mm	320
Wanddicke	mm	10
Arbeitsvolumen	L	7,5*
Anzahl der Kaskaden		2
Scheibe		
Anzahl pro Kaskade		6
Durchmesser	mm	250
Profil		Glatt
Material		HDPE**
Abstand	mm	18/15***
Eintauchtiefe	%	40
Gesamtscheibenfläche****	m ²	1,18
Benetzte Oberfläche	m ²	1,06
Welle		
Durchmesser	mm	20

* unter Berücksichtigung der Scheiben aber nicht des Biofilms

** HDPE = Polyäthylen hoher Dichte

*** 18 mm in der ersten Kaskade, 15 mm in der zweiten Kaskade

**** $V_{\text{ges}}/A_{\text{ges}} = 6,36 \text{ L/m}^2$

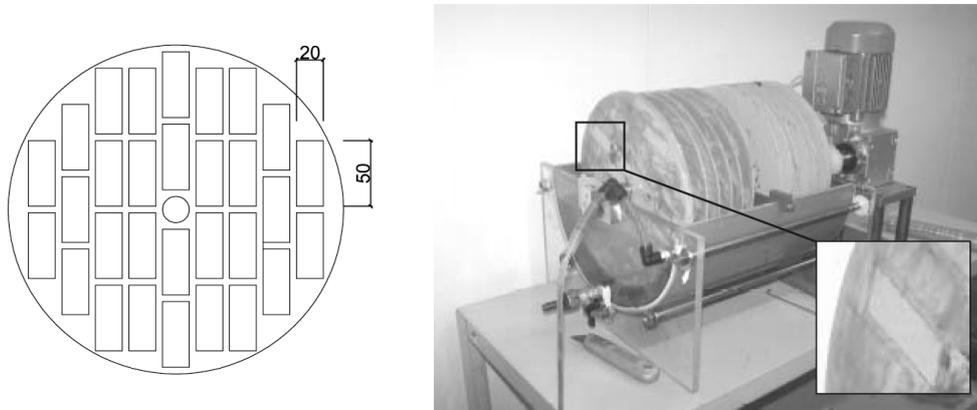


Abb. 5.2: Versuchsanlage mit entfernbaren Plättchen für die Biofilmprobentnahme

Auf der Fläche der Scheiben wurden jeweils entfernbare Plättchen (Plättchengröße 2 x 5 cm, Dicke 2 mm) installiert, um gleich beschaffene Oberflächen für die Biofilmbesiedlung und Entwicklung zu gewährleisten. Diese Plättchen konnten ohne die Biofilmstruktur zu zerstören entnommen und anschließend untersucht werden (Abb. 5.2)

5.1.2. Verwendetes Abwasser

Zur kontinuierlichen Versorgung der Anlage und für die Messung der Dehydrogenaseaktivität wurde ein synthetisches Abwasser mit Zuckerrübenmelasse als einzige Kohlenstoffquelle eingesetzt. Melasse ist ein Nebenprodukt der Zuckerherstellung aus Zuckerrüben, die bis zu 60 % Zucker und diverse Mineralstoffe enthält. Zusätzlich wurden NH_4Cl als Stickstoff- und K_2HPO_4 als Phosphorquelle verwendet, da diese Elemente nicht in für das Leben der Mikroorganismen ausreichender Menge in der Melasse enthalten sind (Tab. 5.2).

Tab. 5.2: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers

Abwasserkomponente	Konzentration [mg/L]
Melasse (Südzucker; Offenau, Deutschland)	500
NH_4Cl (AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland)	382
K_2HPO_4 (AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland)	76

In Anlehnung an die im Arbeitsblatt ATV-DVWK-A 131 (2000) aufgezählten einwohnerspezifischen Frachten nach der Vorklärung (40 g $\text{BSB}_5/\text{EW}\cdot\text{d}$ und 10 g $\text{TKN}/\text{EW}\cdot\text{d}$) wurde ein BSB_5/TKN -Verhältnis von ca. 4:1 eingestellt (BLANK et al., 2008).

Aufgrund der möglichen mikrobiellen Umsetzungen im Vorratsgefäß wurde in der Regel arbeitstäglich frisches Abwasser zubereitet.

5.1.3. Betrieb der Versuchsanlage

Um die erste Anheftung von einzelnen Bakterienzellen an der Oberfläche des Scheibentauchkörpers zu erleichtern, wurden die Scheiben mit einer in Petrolether gelösten Stearinsäure eingerieben. Die Anlage wurde dann mit Abwasser aufgefüllt und mit

Mikroorganismen aus einer mit gleichem Abwasser beschickten Labormaßstabsanlage inokuliert, was eine zusätzliche Verkürzung der Anlaufphase und eine artenreiche Biomasse auf den Scheiben gewährleistete.

Nach einer Woche Batch-Betrieb wurde das Abwasser aus dem Vorratsgefäß mit einer Schlauchpumpe in den Scheibentauchkörper geleitet, wobei der Durchfluss bei ca. 34 Liter pro Tag eingestellt wurde. Das entsprach einer hydraulischen Belastung von 0,029 m³ Abwasser pro m² Scheibenoberfläche pro Tag und einer organischen Belastung von ungefähr 8,1 g BSB₅ pro m² pro Tag. Die Rotationsgeschwindigkeit wurde mit Hilfe des Getriebemotors (Spiroplan® W10 DT56M4/TF, SEW-EURODRIVE; Deutschland) mit einem Frequenzumrichter (MOVITRAC® 07 Typ 07A004-2B1-4-00, SEW-EURODRIVE; Deutschland) aufbauend auf den praktischen Erfahrungen von BLANK et al. (2008) auf 4 rpm eingestellt.

Um den Temperatureinfluss auf die Aktivität des Biofilms untersuchen zu können, wurde die Versuchsanlage in einer Klimakammer untergebracht. Die detaillierten Betriebsbedingungen sind in Tabelle 5.3 aufgeführt.

Tab. 5.3: Betriebsbedingungen des Scheibentauchkörpers

Betriebsbedingungen	Wert
Abwassertemperatur	variiert
	Phase 1: 24,7 °C
	Phase 2: 32,6 °C
Durchfluss	34 L/d
HRT	5 h
Hydraulische Scheibenbelastung	0,029 m ³ /m ² d
Organische Scheibenbelastung (CSB)	~ 9,5 g/m ² d
Organische Scheibenbelastung (BSB ₅)*	~ 8,1 g/m ² d
Rotationsgeschwindigkeit	4 rpm

* BSB₅/CSB (Zulauf) = 0,85

Die Biofilmproben wurden, nachdem der Reaktor einen stabilen Zustand erreicht hatte, entnommen. Der stabile Zustand wurde durch die konstante Zusammensetzung des Ablaufes (siehe Kap. 5.2) bzw. ähnlicher Umsatzleistungen an aufeinander folgenden Tagen ermittelt. Um den Biofilmzustand nicht zu verändern, erfolgte die Bestimmung der Dehydrogenasen- und Atmungsaktivität sofort nach Entnahme der Proben. Ein Teil

der Proben wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Analyse der Nucleinsäurenkonzentration bei -80 °C gelagert. Auf die weitere Behandlung der Proben wird in den nachfolgenden Kapiteln 5.4, 5.5 und 5.6 ausführlicher eingegangen.

5.2. Analytische Methoden zur Charakterisierung des Abwassers

In dieser Arbeit wurde das Abwasser auf konventionelle Parameter (pH-Wert, Sauerstoffgehalt, elektrische Leitfähigkeit und Temperatur) sowie chemische Zusammensetzung untersucht.

Unter Verwendung von Dr. Lange Küvettentests (Dr. Lange; Düsseldorf, Deutschland) (Tab. 5.4) wurden die Proben bezüglich des CSB, $\text{NH}_4\text{-N}$, $\text{NO}_3\text{-N}$ und $\text{PO}_4\text{-P}$ ausgewertet. Die Durchführung der Messungen erfolgte nach Anleitung des Herstellers.

Tab. 5.4: Eingesetzte Küvettentests zur chemischen Analyse des Anlagenzulaufes und -ablaufes

Parameter	Probe	Küvettentestnummer	Messbereich [mg/L]
CSB	Zulauf	LCK 514	100 - 2000
	B1	LCK 314	15 - 150
	B2	LCK 314	
	Ablauf	LCK 314	
$\text{NH}_4\text{-N}$	Zulauf	LCK 303	2 - 47
	B1	LCK 303	
	B2	LCK 303	
	Ablauf	LCK 303	
$\text{NO}_3\text{-N}$	Zulauf	LCK 339	0,23 - 13,5
	B1	LCK 340	5 - 35
	B2	LCK 340	
	Ablauf	LCK 340	
$\text{PO}_4\text{-P}$	Zulauf/Ablauf	LCK 350	2 - 220

Der BSB_5 -Wert wurde mit einem BODtrak-Analysator der Firma Hach-Lange respirometrisch ermittelt.

5.3. Analytische Methoden zur Charakterisierung des Biofilms

Die Bestimmung des Trockengewichts des Biofilms sowie des Glührückstands (GR) und -verlusts (GV) erfolgte in Anlehnung an die DIN EN 12880 (2000) und DIN EN 12879 (2000).

5.3.1. Bestimmung des Trockengewichts

Die Bestimmung des Trockengewichts erfolgte gravimetrisch. Zu diesem Zweck wurde ein kleines Alufolienstück in einen Porzellantiegel eingesetzt und im Wärmeschrank auf 105 °C erwärmt oder bei anschließender Bestimmung des Glühverlusts auf 550 °C vorerhitzt. Nach der Abkühlung auf Raumtemperatur im Exsikkator (mit Silicagel als Trockenmittel) wurde das Alufolienstück auf einer Analysenwaage mit einer Genauigkeit von 0,1 mg genau ausgewogen (m_1). Anschließend wurde die Biofilmprobe einer bestimmten Scheibenfläche (SF) in das Alufolienstück eingesetzt, im Wärmeschrank bei 105 °C bis zur Massekonstanz getrocknet, auf Raumtemperatur abgekühlt und gewogen (m_2). Die Trockenmasse des Biofilms (TS) wurde aus der Massedifferenz bestimmt und in g/m^2 oder mg/cm^2 der Scheibe angegeben (Gl. 5.1).

$$TS = \frac{(m_2 - m_1)}{SF} \quad [\text{g/m}^2] \quad (5.1)$$

Dabei ist:

TS	das Trockengewicht einer Biofilmprobe [g/m^2];
m_1	die Masse des Alufolienteils [g];
m_2	die Masse des Alufolienteils mit der getrockneten Biofilmprobe [g];
SF	Scheibenfläche [m^2].

5.3.2. Bestimmung von Glührückstand und Glühverlust

Der Glührückstand wurde im Anschluss an die Bestimmung des Trockengewichts ermittelt, indem die getrocknete Biomasse (m_2) im Muffelofen auf 550 °C erhitzt und

mindestens 60 Minuten geglüht wurde. Nach dem Abkühlen im Exsikkator wurde das Alufolienstück mit der geglühten Probe ausgewogen (m_3).

Zur Berechnung des Glühverlusts (GV) und des Glührückstands (GR) einer Biofilmprobe wurden Formeln 5.2 und 5.3 verwendet:

$$GV = \frac{(m_2 - m_3)}{SF} \quad [\text{g/m}^2] \quad (5.2)$$

$$GR = \frac{(m_3 - m_1)}{SF} \quad [\text{g/m}^2] \quad (5.3)$$

Hierbei sind:

GV	der Glühverlust der Trockenmasse einer Biofilmprobe [g/m ²];
GR	der Glührückstand der Trockenmasse einer Biofilmprobe [g/m ²];
m_3	die Masse des Alufolienstücks mit der geglühten Trockenmasse der Biofilmprobe [g].

5.4. Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität

5.4.1. Konventionelle Methode

Zur Erfassung der Dehydrogenasenaktivität des Biofilms mittels der konventionellen Methode wurde der Biofilm von den repräsentativen Plättchen (siehe Abb. 5.2) entfernt, suspendiert und weiter wie ein Belebtschlamm in Anlehnung an DEV L3 (1993) betrachtet¹³. Ein Teil des suspendierten Biofilms wurde zur Bestimmung des Trockengewichtes des Biofilms verwendet, ein anderer Teil wurde in Reagenzgläser gegeben

¹³ Gegen Ende der Bearbeitungszeit dieser Arbeit ist ein neuer Norm-Entwurf DIN 38412-3 (2008) zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität von Belebtschlämmen herausgegeben worden, der die Durchführung des Tests ausführlicher beschreibt und sich u.a. hinsichtlich Inkubationszeit, -temperatur und Wellenlänge der Absorptionsmessung von der DEV L3 (1993) unterscheidet.

und mit der zu prüfenden Substanz bzw. dem synthetischem Abwasser (siehe Kap. 5.1.2) und der TTC-Lösung bei 25 °C inkubiert (Abb. 5.3).

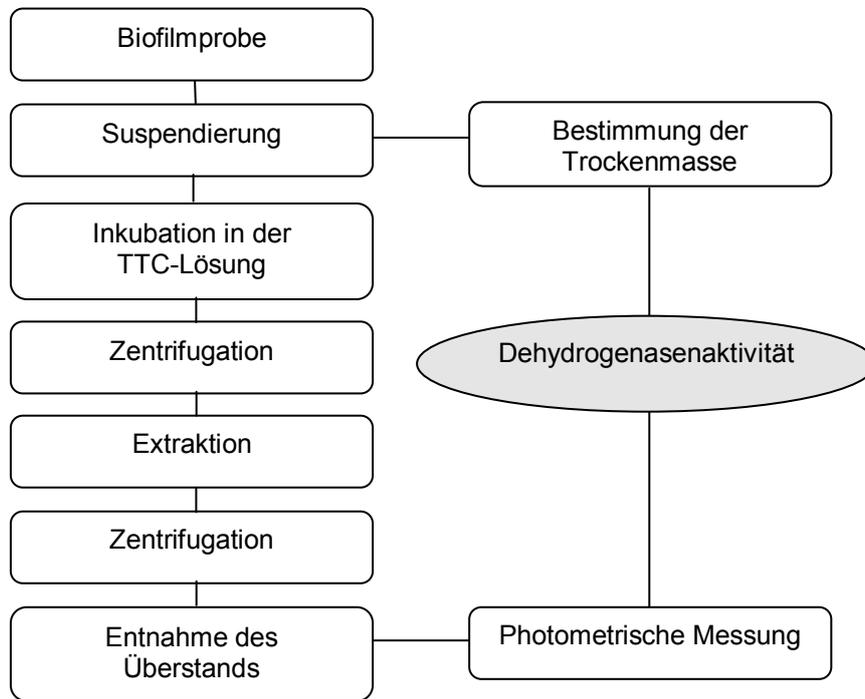


Abb. 5.3: Flussdiagramm für die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität mit der konventionellen Methode

Die Inkubationszeit betrug 3 Stunden. Nach dieser Zeit wurden die Proben 10 Minuten bei 6000 rpm zentrifugiert. Die überstehende Lösung wurde abgegossen und Ethanol¹⁴ zugegeben. Nach kräftigem Schütteln wurde die Probe erneut zentrifugiert. Die 1,3,5-triphenylformazanhaltige Lösung wurde abgegossen und die Absorption photometrisch bei 480 nm gegen die formazanfreie Kontrollprobe gemessen.

Die Berechnung erfolgte nach Formel (Gl. 5.4):

$$TTC - DHA = \frac{e \cdot 188}{tm} \quad [\mu\text{g TF/mg TS}] \quad (5.4)$$

¹⁴ d = 0,81 g/cm³, ca. 92 %

e	die bei 480 nm und einer Schichtdicke von 10,0 mm gemessene Extinktion;
tm	die durch Trocknen bei 105 °C bestimmte Trockenmasse des suspendierten Biofilms [mg].

5.4.2. Modifizierte Methode

Der Nachweis der Dehydrogenasenaktivität erfolgte mit 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) nach einer Modifikation der von BLENKINSOPP & LOCK (1990), QING et al. (2006) und ROMANÍ & SABATER (2001) angewendeten Methoden, die in der Messung der Aktivität der intakten mikrobiologischen Gemeinschaft bestanden. Es wurde die *in situ* Aktivität der Zellen ohne Störungen der intrazellulären und extrazellulären Prozesse durch die Vorabtrennung der Biomasse vom Trägermaterial erfasst.

Aus Gründen der Reproduzierbarkeit wurde das synthetische Abwasser verwendet (siehe Kap. 5.1.2).

5.4.2.1. Herstellung der Lösungen

2,3,5-Triphenyltetrazoliumchloridlösung:

5 g 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (AppliChem GmbH; Darmstadt, Deutschland) wurden in 1 Liter Wasser gelöst. Die fertige 0,5%ige Lösung wurde kühl und in einer dunklen Flasche lichtgeschützt aufbewahrt.

1,3,5-Triphenylformazan-Stammlösung:

100 mg 1,3,5-Triphenylformazan (BioChemika, Fluka, Sigma Aldrich; Deutschland) wurden in 80 mL 99%igem Ethanol gelöst und auf 100 mL aufgefüllt.

1,3,5-Triphenylformazan-Arbeitslösung:

25 mL der Stammlösung wurden in einen Messkolben überführt und auf 500 mL mit 99%igem Ethanol aufgefüllt. Die Triphenylformazankonzentration der Lösung betrug 50 µg/mL.

5.4.2.2. Wellenlänge der Absorptionsmessung

Um das Absorptionsmaximum von 0,017 mM 1,3,5-Triphenylformazan in 99%igem Ethanol zu bestimmen, wurde die Extinktion der Lösung als Funktion der Wellenlänge im Spektralbereich von 475 bis 495 nm gemessen (Abb. 5.4). Die maximale Extinktion fand bei 484 nm statt. Diese Wellenlänge wurde dann als geeignet für den Nachweis des vom Biofilm gebildeten Formazans angenommen.

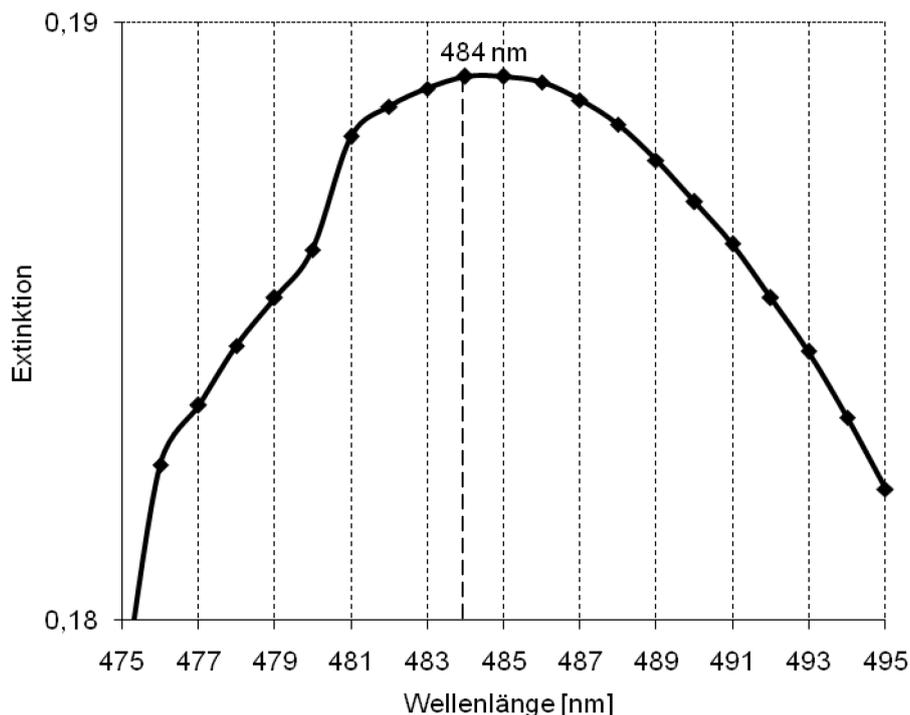


Abb. 5.4: Absorbanzspektrum von 1,3,5-Triphenylformazan

5.4.2.3. Ausführung

Zur Erfassung der TTC-Reduktion wurden die Plättchen (5 x 2 cm) mit Biofilm (Abb. 5.2) von den Scheiben der Scheibentauchkörperanlage entfernt und in synthetisches Abwasser (siehe Kap. 5.1.2) eingesetzt. Nach der Zugabe der 0,5%igen TTC-Lösung¹⁵ wurde die Probe 5 Minuten mit Stickstoff gestrippt. Anschließend erfolgte eine zweistündige Inkubation bei *in situ* Temperatur und einem zirkumneutralen pH-Wert. Nach der Inkubationszeit wurde jede Biofilmprobe kurz mit Wasser gespült,

¹⁵ 150 mL synthetisches Abwasser und 25 mL TTC

um das ungebundene Formazan abzulösen. Der Biofilm wurde von den Aufwuchsplättchen entfernt und in die mit 10 mL erwärmten Ethanol (99%ig) gefüllten Zentrifugenröhrchen gegeben. Anschließend wurde das Formazan 15 Minuten extrahiert. Zusätzlich wurde jede Biofilmprobe mit dem Ultraschalldesintegrator (Vibra cell 130, SONICS; Newtown, CT, USA) bei einer Frequenz von 80 kHz und einer Outputleistung von 6 W mit einer 2 mm-Mikrosonde mit Pausen 5 Minuten lang behandelt, um die Polysaccharidmatrix zu zerstören und einen einfachen Zugang für das Extraktionsmittel zu ermöglichen. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten bei 5000 rpm zentrifugiert. Die alkoholische Formazanlösung wurde abgegossen und die Absorption photometrisch bei 484 nm gegen Ethanol gemessen. In den Fällen, wo nach der Extraktion die Zellen noch gefärbt blieben, wurde erneut Ethanol zugegeben und die Extraktion (teilweise nur kräftiges Schütteln) bis zur vollständigen Entfärbung der Biomasse wiederholt. Bei den Extinktionswerten über 1,0 wurde die Flüssigkeit entsprechend mit Ethanol verdünnt. Abschließend wurde das Trockengewicht des Biofilms bestimmt. In Abbildung 5.5 ist die Dehydrogenasenaktivitätsbestimmung schematisch dargestellt.

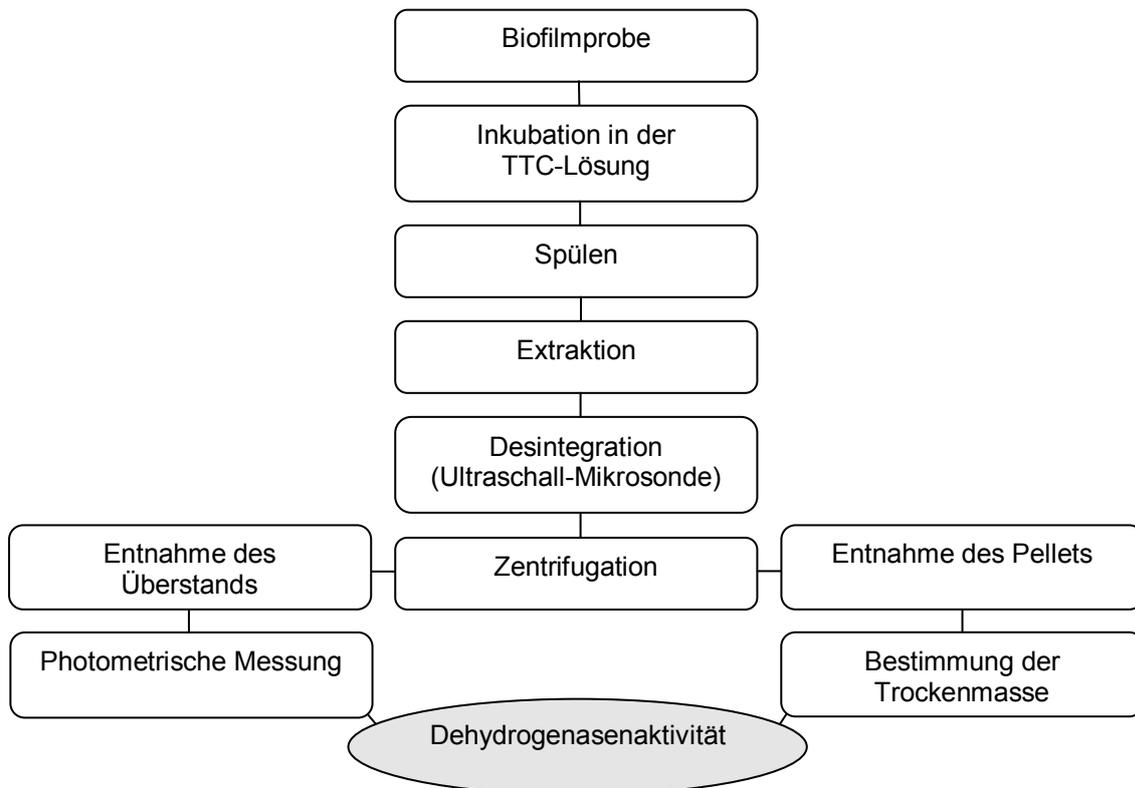


Abb. 5.5: Flussdiagramm für die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität mit der modifizierten Methode

5.4.2.4. Aufbereitung der Kontrollproben

Die Kontrollproben (tote Biofilmproben) wurden bei halbstündiger Inkubation im 37%igen Formaldehyd und mehrmaligen Wasserspülungen vorbereitet und wie die anderen Biofilmproben weiter behandelt. Die photometrisch bestimmte Absorption galt als die Hintergrundabsorption, die nicht durch die lebenden Mikroorganismen verursacht ist und wurde anschließend vom Wert der aktiven Biofilmprobe subtrahiert.

5.4.2.5. Erstellung der Kalibriergeraden

Es wurden Volumina von 1, 5, 10, 20, 30 mL der 1,3,5-Triphenylformazan-Arbeitslösung abgemessen, in den Messkolben überführt und auf 100 mL mit Ethanol (99%ig) aufgefüllt. Anschließend wurde die Absorption¹⁶ der Standardlösungen (Konzentrationen: 1, 5, 10, 20 und 30 µg/mL) bei 484 nm im Photometer gegen Ethanol gemessen und die Kalibriergerade erstellt (nach BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK, 2005).

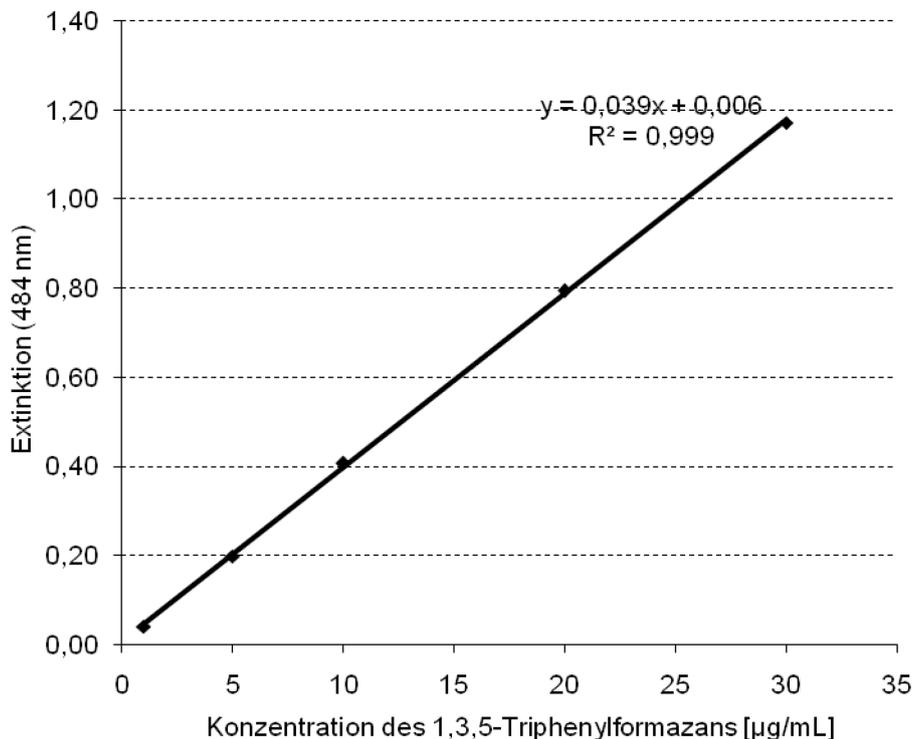


Abb. 5.6: Extinktion der Triphenylformazanlösung als Funktion der Konzentration

¹⁶ Die gemessene Absorption wird automatisch umgerechnet und als Extinktion angezeigt.

5.4.2.6. Berechnung der Ergebnisse

Die Berechnung der gebildeten Formazanmenge erfolgte nach Formel 5.5:

$$n_{TF} = \frac{E_{484} \cdot v}{\epsilon_{484} \cdot d} \cdot 10^{-3} \quad [\text{mol}] \quad (5.5)$$

Hierbei stehen die einzelnen Formelzeichen für folgende Größen:

n_{TF}	Formazanmenge [mol];
E_{484}	Extinktion des Reaktionsgemisches bei 484 nm;
v	Volumen des Extraktionsmittels [mL];
d	Schichtdicke des Reaktionsgemisches bei der Absorbanzmessung [cm], $d = 1$ cm;
10^{-3}	Umrechnung von Milliliter in Liter;
ϵ_{484}	molarer Extinktionskoeffizient [L/mol·cm].

Der molare Extinktionskoeffizient wurde aus dem Lambert-Beer'schen Gesetz abgeleitet und betrug (Gl. 5.6):

$$\epsilon_{484} = \frac{E_{484}}{c \cdot d} \quad [\text{L/mol}\cdot\text{cm}] \quad (5.6)$$

Dabei ist:

c	Konzentration der absorbierenden Substanz [mol/L].
-----	--

Aus dem folgenden Zusammenhang (Gl. 5.7) ergibt sich die Formazanmasse (m_{TF}):

$$m_{TF} = n_{TF} \cdot M_{TF} \quad [\text{g}] \quad (5.7)$$

Mit:

M_{TF}	Molare Masse des Triphenylformazans [g/mol], $M_{TF} = 300,36284$ g/mol.
----------	---

Die Dehydrogenasenaktivität (TTC-DHA) des Biofilms wird entweder als Triphenylformazanmasse (Gl. 5.8) oder als Triphenylformazanmenge (Gl. 5.9) errechnet, die durch 1 mg des Biofilms während 2 h gebildet wurde.

$$TTC - DHA = \frac{m_{TF}}{TS \cdot t} \cdot 10^6 \quad [\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}] \quad (5.8)$$

$$TTC - DHA = \frac{n_{TF}}{TS \cdot t} \quad [\text{mol TF/mg TS}_{2\text{h}}] \quad (5.9)$$

Hierin bedeuten:

TS	Trockengewicht des Biofilms auf einem Aufwuchsplättchen (10 cm ²) bestimmt durch Trocknen bei 105 °C [mg];
t	Inkubationszeit [h], t = 2 h;
10 ⁶	Umrechnung von Gramm in Mikrogramm.

Unter der Voraussetzung, dass der Stoffwechsel vollkommen aerob gedeckt wird, kann die Dehydrogenasenaktivität als Sauerstoffäquivalent ausgedrückte Menge an Formazan dargestellt werden. In der Elektronentransportkette werden 2 Elektronen eingesetzt um 0,5 Mol Sauerstoff zu 1 Mol Wasser umzubilden. 2 Elektronen werden auch in der Reduktion von TTC zum 1,3,5-Triphenylformazan (TF) genutzt. Dementsprechend ist 1 Mol TF äquivalent zu 0,5 Mol (16000 mg) molekularem Sauerstoff (Gl. 5.10).

$$TTC - DHA = \frac{n_{TF}}{TS \cdot t} \cdot 16000 \quad [\text{mg O}_2^*/\text{mg TS}_{2\text{h}}] \quad (5.10)$$

5.5. Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

Die Isolierung und Quantifizierung der hochmolekularen Nukleinsäuren erfolgte mittels HPLC, (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie) wobei die angewendete Methode auf der Methode von COPELLA et al. (1987) und DELL'ANNO et al. (1998) basierte und

von SCHWARZ (2004) modifiziert, optimiert und auf die abwasserdurchsickerten Sandfilter übertragen wurde.

5.5.1. RNase-freies Arbeiten

Die RNasen sind Enzyme, deren Funktion in der Hydrolyse der Ribonukleinsäuremoleküle (RNA) besteht. Da die RNase-Kontaminationen bei der RNA-Bestimmung mittels HPLC zu falschen Ergebnissen führen können, wurden spezielle Vorkehrungen getroffen um die Anwesenheit der RNasen zu vermeiden (SCHRIMPF, 2002). Es wurde ein spezielles Labor eingerichtet, wo die gesamten Arbeitsflächen und Geräte mit RNase Away™ (Molecular BioProducts; San Diego, CA, USA) gesäubert wurden und die Puffer-, Lösungs- und Probenaufbereitung stattfanden. Zusätzlich wurden bei jedem Schritt sterile Einmalhandschuhe getragen, die auch häufig durch neue ersetzt wurden. Alle Chemikalien und Verbrauchsmaterialien (Pipetenspitzen, Spritzenfilter) wurden in molekularbiologischer oder falls nicht erhältlich in steriler Qualität benutzt. Die ausschließlich für die RNase-freien Arbeiten verwendeten Materialien (Glas-, Metallgeräte, Magnetührstäbe, usw.) wurden mit 0,1%igem DEPC-Wasser gereinigt und durch trockene Hitze bei 220 °C im Trockenschrank für 16 Stunden sterilisiert (SCHWARZ, 2004). Das Diethylpyrocarbonat ist ein starker RNase-Inhibitor, der zur Zubereitung der RNase-freien Puffer und Lösungen in der Form von DEPC-Wasser verwendet wurde (SCHRIMPF, 2002). Die Herstellung des DEPC-Wassers erfolgte mittels der Versetzung eines Liters bi-destillierten Wassers mit 1 mL DEPC und mindestens 30 Minuten Rühren. Das DEPC reagiert mit Histidinresten von Proteinen und deaktiviert die RNasen. Allerdings kann es auch die In-vitro-Translation von mRNA inhibieren, muss also anschließend zu Ethanol und Wasser zersetzt werden, was u.a. durch Autoklavieren geschieht (20 - 25 Minuten, 121 °C, 1 atm) (SCHRIMPF, 2002).

5.5.2. Herstellung der Puffer und Lösungen

Die Herstellung der Puffer und Lösungen erfolgte wie in DELL'ANNO et al (1998) und SCHWARZ (2004) beschrieben.

Puffer A (in 1 L DEPC-Wasser):

300 g Harnstoff (= 5,0 M)

1,361 g KH_2PO_4 (= 0,1 M)

1,742 g K_2HPO_4 (= 0,1 M)

Puffer B (in 1 L DEPC-Wasser):

300 g Harnstoff (= 5,0 M)

1,361 g KH_2PO_4 (= 0,1 M)

1,742 g K_2HPO_4 (= 0,1 M)

112 g KCl (= 1,5 M)

Puffer C:

0,01%iges NaN_3 in DEPC-Wasser

Bei der Herstellung von Puffer A und B wurden Harnstoff, Phosphate und beim Puffer B zusätzlich KCl (Kaliumchlorid) in 0,8 Liter DEPC-Wasser gelöst. Da die Zugabe des Harnstoffes eine starke Abkühlung der Lösungen verursachte, wurden sie über Nacht auf 20 °C Raumtemperatur erwärmt und erst dann mit dem DEPC-Wasser auf 1 Liter aufgefüllt. Die pH-Werte wurden mit H_3PO_4 auf 6,90 eingestellt. Alle drei Puffer wurden ausschließlich über eine 0,45 μm Nylonmembran (Osmonics, Minnetonka; MN, USA) in der Reihenfolge: Puffer C, Puffer A, Puffer B filtriert, wobei bei Puffer A und B die Filter nach ca. 1 Liter gewechselt wurden.

Tris-HCl-Lysispuffer (in 1 L DEPC-Wasser):

6,05 g Tris

5,08 g NaCl

3,70 g EDTA

2,00 g SDS

8,1 mL HCl (33 %)

Der pH-Wert wurde mit NaOH auf pH 8,0 eingestellt.

5.5.3. Probenahme und Probenaufbereitung

Der Biofilm wurde von den einzelnen Scheiben der Scheibentauchkörperanlage entfernt, in Kryoröhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und

bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert, um die Hydrolyse der Ribonukleinsäuremoleküle durch die RNAsen zu vermeiden.

Für die HPLC Analyse wurden die Proben in leicht geöffneten Röhrchen bei $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Eiskondensationsraum der Gefriertrocknungsanlage Alpha 1-4 (Christ; Osterode am Harz, Deutschland) gefriergetrocknet. Die eingewogene Masse (3 - 7 mg) Biofilm wurde mit 1,0 mL Tris-HCl-Lysispuffer versetzt und mit dem Ultraschalldesintegrator (Vibra cell 130, SONICS; Newtown, CT, USA) bei einer Frequenz von 50 - 60 kHz und einer Output-Leistung von 2 W mit einer 2 mm-Mikrosonde 6 Mal (10 s mit jeweils 60 s Pause) behandelt (Abb. 5.7). Anschließend wurde die Probe 5 Minuten bei 4520 rpm (Universal 30 RF, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) zentrifugiert um die Nukleinsäuren in der flüssigen Phase vom Zellrückstand zu trennen. Der Überstand wurde durch einen sterilen $0,45\text{ }\mu\text{m}$ Cellulose-Acetat Einmal-Spritzenfilter (neoLab Migge Laborbedarf-Vertriebs GmbH; Heidelberg, Deutschland) filtriert und in einen Polypropylen-Probenbehälter gefüllt.

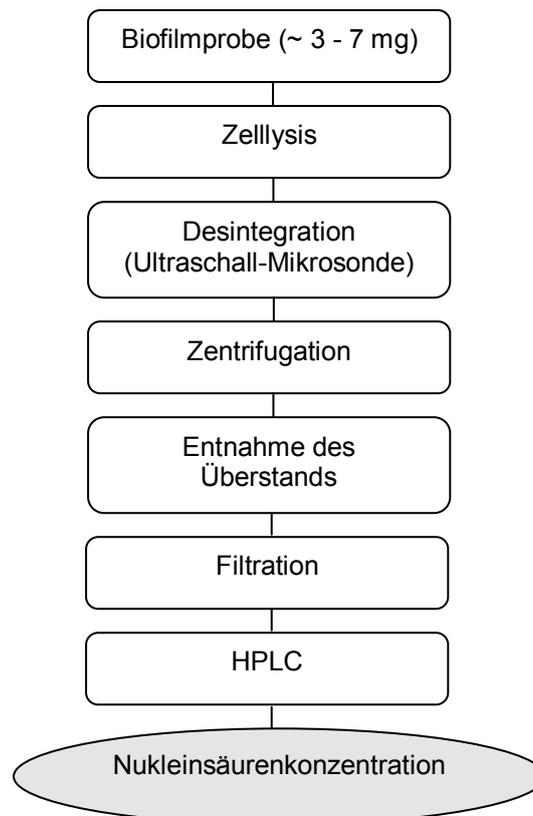


Abb. 5.7: Ablaufschema für die Probenaufbereitung zur Bestimmung der Nukleinsäurenkonzentration

5.5.4. HPLC-Messung

Die HPLC-Apparatur (HPLC Agilent 1050 Titan; Santa Clara, Kalifornien, USA) bestand aus einer quarternären Gradientenpumpe (79 852 B Titan), einem Online Entgaser (G 1303 A Titan), einem Autosampler (79 855 B Titan), einer Vorsäule KS 30/4 Nucleogen DEAE 4000-7 (Macherey-Nagel GmbH; Düren, Deutschland) und einer Trennsäule VA 125/6.2 Nucleogen DEAE 4000-7 (Macherey-Nagel GmbH; Düren, Deutschland), einem variablen Wellenlängendetektor (VWD 79 853C) mit Deuteriumlampe (79883-60002) und einer Standard Flusszelle (79853-60011) sowie einer Windows-Steuer- und Auswertesoftware (HP-Chemstation). In Abbildung 5.8 sind die Komponenten der HPLC Apparatur schematisch dargestellt.

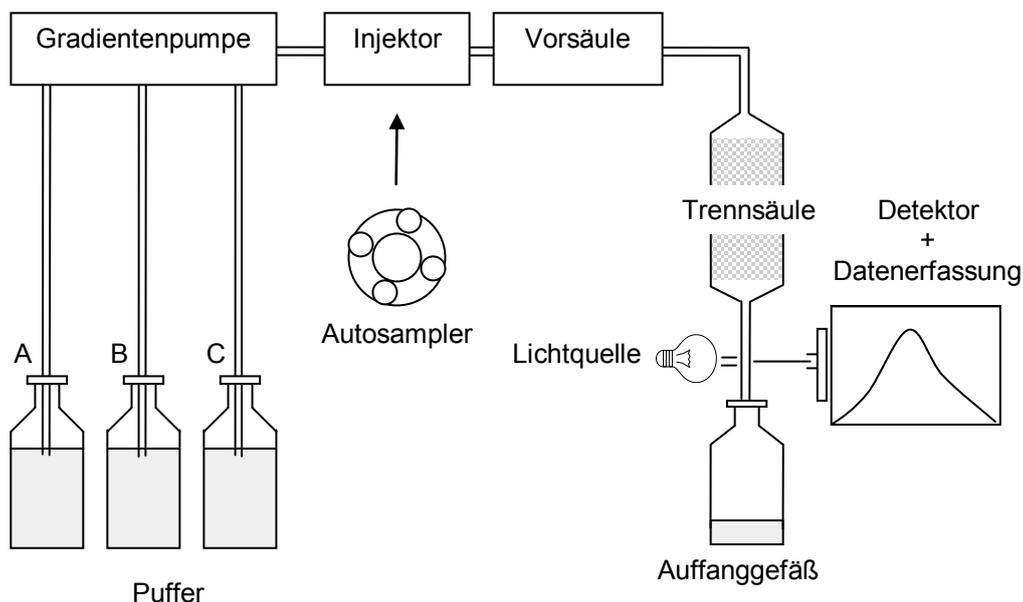


Abb. 5.8: Aufbau des HPLC-Systems

Die Puffer wurden mit dem eingestellten Gradienten (Tab. 5.5) durch die Vor- und Trennsäule mit den Gradientenpumpen gepumpt. Mit dem Gradienten A wurde die Trennsäule vor der Messung der Nukleinsäuren kalibriert. Danach wurden 10 μL der Probe mit Hilfe eines Autosamplers über einen Injektor in die Trennsäule injiziert und der Gradient B eingestellt. Anschließend wurde zur Reinigung der Säule der Gradient C eingestellt.

Tab. 5.5: Gradienten zur HPLC-Analyse

Gradient	Zeit [min]	Flussrate [mL/min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Puffer C [%]
A	Start	0	0	0	100
	1,25	1,6	0	0	100
	3,00	1,6	0	100	0
	4,20	1,6	0	100	0
	4,50	1,6	0	0	100
	10,00	1,6	0	0	100
B	Start	1,6	0	0	100
	0,32	1,6	0	0	100
	0,63	1,6	85	15	0
	6,25	1,6	85	15	0
	18,75	1,6	0	100	0
	18,95	1,6	0	100	0
	19,00	1,6	0	0	100
23,00	1,6	0	0	100	
C	Start	1,6	0	100	0
	3,00	1,6	0	100	0
	4,50	1,6	0	0	100
	11,00	1,6	0	0	100
	12,50	0	0	0	100

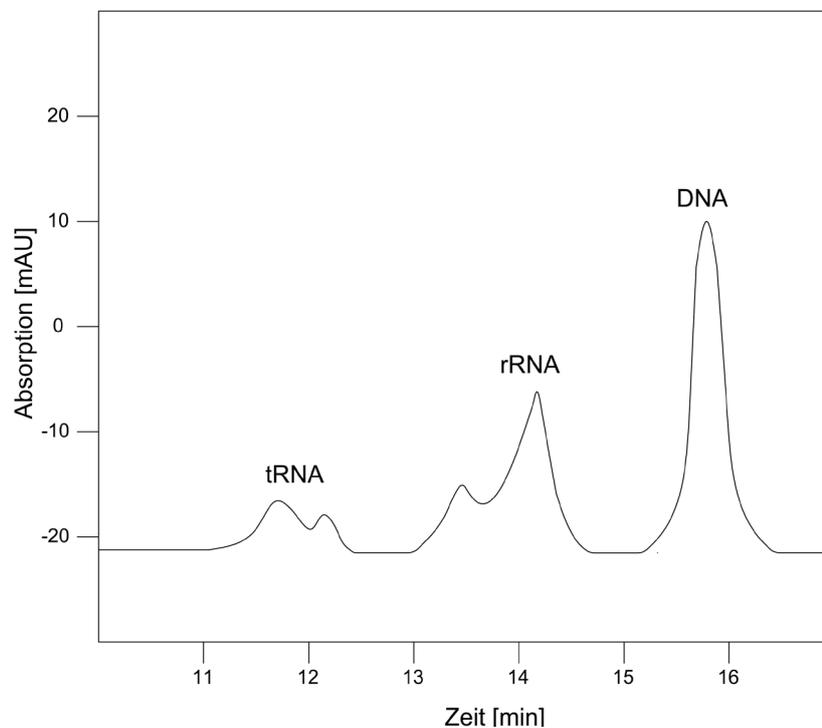


Abb. 5.9: HPLC-Chromatogramm mit einem tRNA-, rRNA- und einem DNA-Peak

Beim Austritt aus der Säule wurden die in der Probe vorhandenen Nukleinsäuren mit einem UV-Detektor bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Die Messwerte wurden dann als Chromatogramm dargestellt, in welchem die Peaks den nachzuweisenden Nukleinsäurentypen zugeordnet werden können (Abb. 5.9).

5.5.5. Kalibration

Zur externen Kalibration wurden die Nukleinsäurestandards des Bakteriums *Escherichia coli* verwendet:

DNA (type VIII): *Escherichia coli* Stamm B (Sigma Chemical, St. Louis, RO, USA; D-2001, Lot 39H4101)

tRNA (type XX):

Escherichia coli Stamm W (Sigma Chemical, St. Louis, RO, USA; R-1753, Lot 79H7490)

rRNA:

Escherichia coli Stamm W (Sigma Chemical, St. Louis, RO, USA; R-7628, Lot 117H7802)

Bestimmte Volumina von vorbereiteten und tiefgefrorenen Kalibrierlösungen wurden portioniert, mit einem Tris-HCl-Puffer verdünnt und wie die Biofilmproben (siehe Kap. 5.5.3) aufgearbeitet und gemessen (siehe Kap. 5.5.4). Die Kalibriergeraden sind in Abbildung 5.10 sowie Abbildung 5.11 dargestellt.

Die untersuchten Linearitätsbereiche für DNA, tRNA und rRNA betragen 10 - 1000 ng, 30 - 380 ng bzw. 30 - 350 ng. Laut SCHWARZ (2004) liegen die injizierten Mengen der tRNA und rRNA von 0 - 2500 ng und 0 - 3000 ng im linearen Bereich. Für die DNA wurde von einer Linearität bis zu 40 µg berichtet (SCHWARZ, 2004).

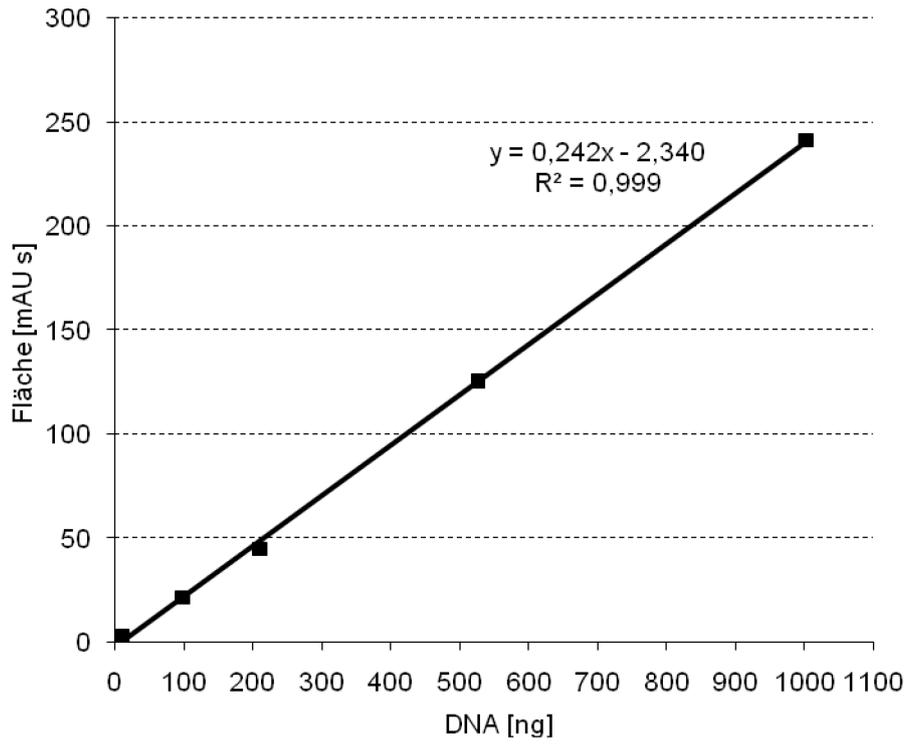


Abb. 5.10: Peakfläche als Funktion der DNA-Menge

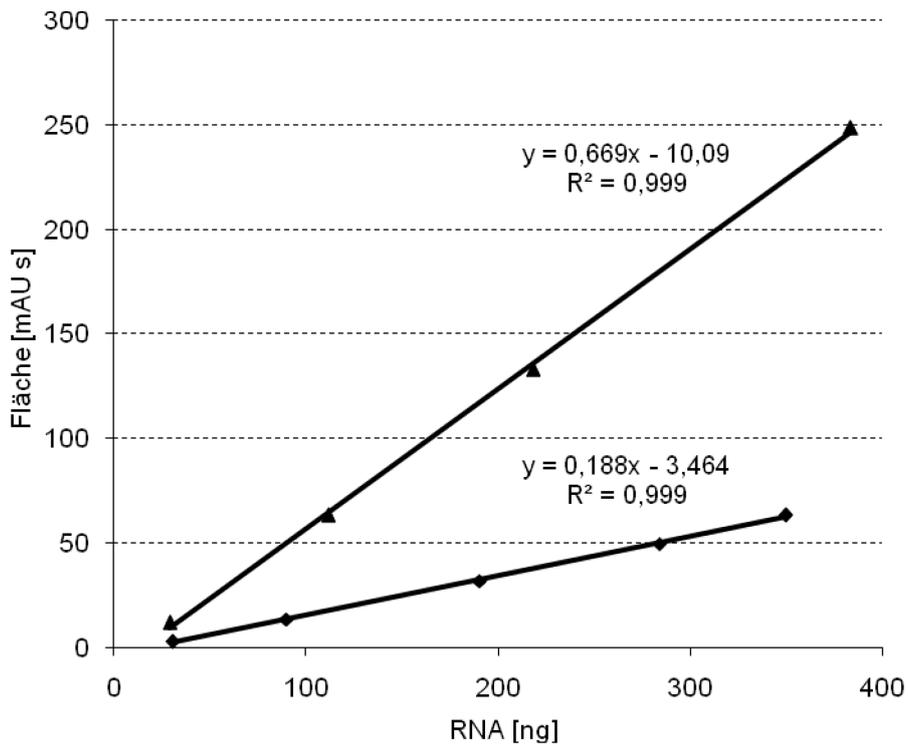


Abb. 5.11: Peakfläche als Funktion der (▲) tRNA- und (◆) rRNA-Menge

5.5.6. Berechnung der Ergebnisse

Über die Integration der unter den jeweiligen Peaks erhaltenen Fläche und unter Verwendung der betreffenden Kalibriergeraden erfolgte die quantitative Bestimmung der gesuchten Substanzen (Gl. 5.11).

$$\text{Konzentration} = \frac{P \cdot V}{J \cdot TS} \quad [\mu\text{g/g TS}] \quad (5.11)$$

Hierbei bedeuten:

P	Detektierte und berechnete Nukleinsäuremenge [μg];
V	Volumen des Extraktionsmittels [mL], V = 1 mL;
J	Injizierte Probenmenge [mL], J = 0,01 mL;
TS	Trockengewicht der Biofilmprobe [g].

5.6. Bestimmung der Atmungsaktivität

Zur Untersuchung der respiratorischen Aktivität des Biofilms wurde der Sauerstoffverbrauch bzw. die Geschwindigkeit des Sauerstoffverbrauchs infolge der Atmung gemessen (Grundatmung GA und Substratatmung SA). Die Sauerstoffabnahmemessung wurde in einem 250 mL Gefäß (Sauerstoffmesszelle) durchgeführt, das während des Versuchs fest verschlossen war, um den Luftsauerstoffeintrag zu verhindern. Im Gefäß befand sich eine Sauerstoffsonde, die an das Datenerfassungssystem auf dem Rechner angeschlossen wurde. In Abbildung 5.12 ist die Versuchsanordnung dargestellt.

Die Messung erfolgte unter festgelegten Laborbedingungen in Anlehnung an LØKKEGAARD BJERRE et al. (1998). Dabei wurden die repräsentativen Plättchen mit Biofilm von den Scheiben der Scheibentauchkörperanlage entfernt und mit Wasser gespült, um die suspendierte Biomasse zu entfernen und den adsorbierten CSB abzulösen. Die Proben wurden anschließend in ein Gefäß mit Abwasser (SA) oder Leitungswasser (GA) als Lösung gesetzt.

GA	Atmungsgeschwindigkeit (Grundatmung) [mg O ₂ /min];
TS	Trockengewicht des Biofilms auf einem Aufwuchsplättchen (10 cm ²) bestimmt durch Trocknen bei 105 °C [g];
60	Umrechnung von Minuten in Stunde.

6. Ergebnisse

Im folgenden Kapitel wird der Einfluss verschiedener Reaktionsparameter auf die Dehydrogenasenaktivität des Biofilms dargestellt. Die Methode zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität wird modifiziert. Anschließend wird, unter seine Verwendung die Aktivitätsänderung mit steigender Biofilmmenge ermittelt. Darüber hinaus wird untersucht, ob Veränderungen der Temperatur und Substratkonzentration als Schwankungen der Dehydrogenasenaktivität erkannt werden können. Des Weiteren wird, basierend auf den Dehydrogenasenaktivitätswerten, die Verteilung der Aktivität entlang des Scheibentauchkörpers dargestellt. Abschließend wird, als Ergänzung der mit dem Dehydrogenasentest gewonnenen Ergebnisse, die Verteilung der Biomasse und deren Aktivität in der Scheibentauchkörperanlage mittels HPLC bestimmt.

6.1. Reinigungsleistung der Anlage

Die Zusammensetzung des Zulaufes und Ablaufes der Anlage wurde bezüglich CSB, BSB₅, NH₄-N, NO₃-N und PO₄-P ausgewertet (siehe Kap. 5.2).

In Tabelle 6.1 sind die Eigenschaften des Abwassers sowie die maximalen, durchschnittlichen und minimalen Konzentrationen der Abwasserinhaltsstoffe aufgeführt.

Tab. 6.1: Merkmale des verwendeten Abwassers

Parameter	Einheit	Max	Mittel	Min
CSB*	mg/L	461	421	399
NH ₄ -N**	mg/L	113	93	71
NO ₃ -N	mg/L	0,4	0,3	0,2
PO ₄ -P	mg/L	38	36	32
TDS	mg/L	744	750	755
pH		7,8	7,5	7,4

* BSB₅/CSB = 0,85

** stellt nahezu den ganzen TKN dar

6.1.1. BSB₅-Elimination

Während des gesamten Untersuchungszeitraumes konnte eine sehr gute und stabile BSB₅-Elimination festgestellt werden. Es konnte eine mittlere BSB₅-Abbauleistung von über 93 % (Phase 1) und 95 % (Phase 2) beobachtet werden (Abb. 6.1Abb. 6.1).

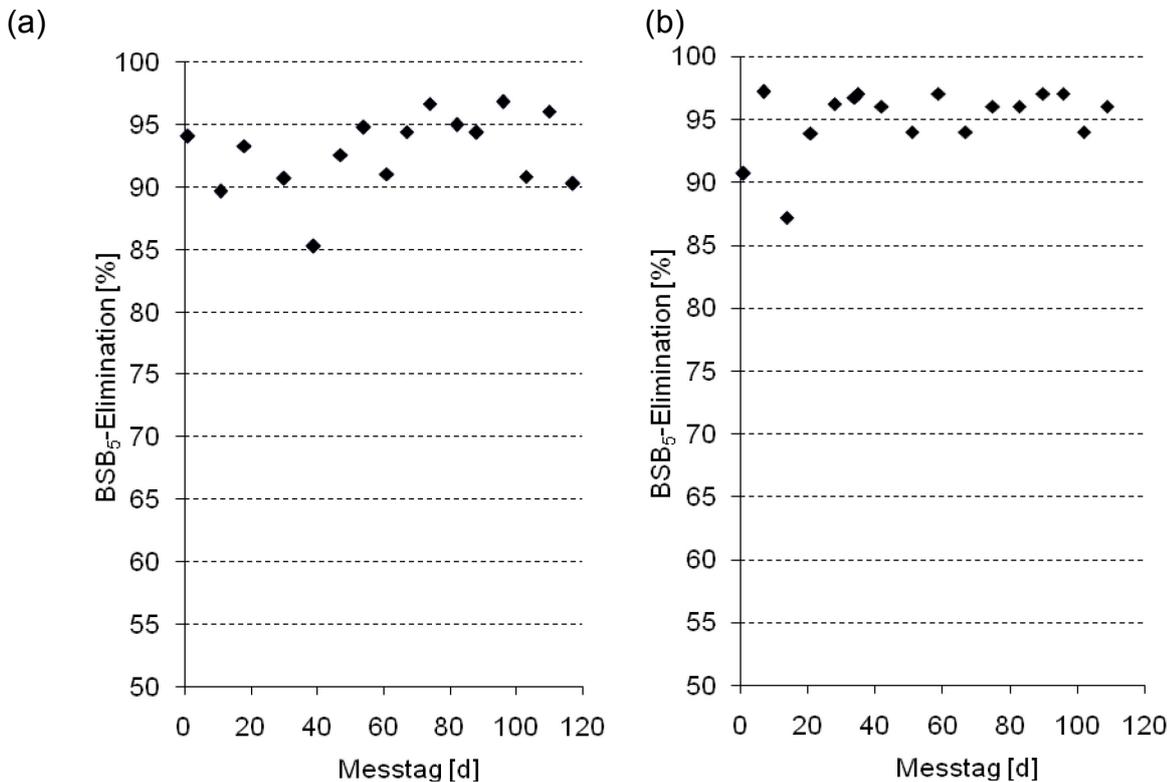


Abb. 6.1: BSB₅-Elimination im Gleichgewichtszustand: (a) Phase 1: Temperatur 24,7 °C, (b) Phase 2: Temperatur 32,6 °C

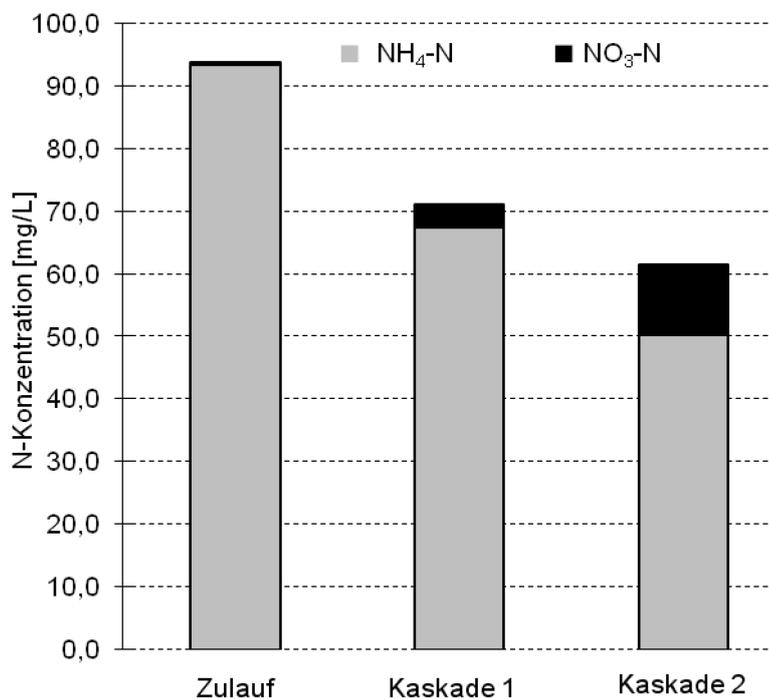
6.1.2. Stickstoffelimination

Die N_{ges}-Zulaufkraft der mit synthetischem Abwasser beschickten Anlage setzte sich über 99 % aus NH₄-N und zu einem vernachlässigbaren Anteil aus NO₃-N zusammen¹⁷. Die gemessenen mittleren NH₄-N und NO₃-N Konzentrationen bzw. Frachten im Zulauf, im Ablauf von Kaskade 1 und Kaskade 2 sind in Tabelle 6.2 und Abbildung 6.2 aufgezeigt.

¹⁷ Oxidierte Stickstoffverbindungen wie Nitrate und Nitrite kommen normalerweise nicht oder nicht in relevanten Mengen in kommunalen Abwässern vor (GALLERT & WINTER, 1999).

Tab. 6.2: Gemessene Konzentrationen von Ammonium- und Nitrat-Stickstoff

Parameter		N-Konzentration [mg/L]	N-Fracht [g/d]
Zulauf	NH ₄ -N	93,4	3,18
	NO ₃ -N	0,3	0,01
	Σ	93,7	3,19
Kaskade 1	NH ₄ -N	67,4	2,29
	NO ₃ -N	3,7	0,13
	Σ	71,1	2,42
Kaskade 2	NH ₄ -N	50,2	1,71
	NO ₃ -N	11,2	0,38
	Σ	61,4	2,09

Abb. 6.2: Konzentration von Ammonium- und Nitrat-Stickstoff entlang der Scheibentauchkörperanlage (Phase 2: Temperatur 32,6 °C, Scheibenbelastung 8,1 g BSB₅/m² d)

Die NH₄-N- und NO₃-N-Zulaufmengen der Anlage betragen entsprechend 3,18 g/d und 0,01 g/d. Nach der ersten Kaskade konnte eine NH₄-N- Elimination von 24,1 % (0,77 g/d) und eine NO₃-N-Bildung von 0,13 g/d beobachtet werden. Nach der zweiten Kaskade sank der NH₄-N-Wert um weitere 10,3 % (0,33 g/d) und es wurden zusätzliche 0,25 g NO₃-N/d gebildet.

6.2. Methodenentwicklung zur Bestimmung der Biofilmaktivität

6.2.1. Probenlagerung

Um abzuschätzen, wie lange die Zeitspanne zwischen der Probenahme und der Dehydrogenasenaktivitätsmessung sein kann, wurden Biofilmproben mit ähnlichem Bewuchs (Phase 1, siehe Tab. 5.3) vor der Messung 30 und 60 Minuten bei einer Inkubationstemperatur von 24,7 °C sowie 24 Stunden kühl in verschlossenen Plastikflaschen gelagert. Die Aktivität einer Probe wurde als Referenzwert sofort bestimmt (Tab. 6.3).

Tab. 6.3: Dehydrogenasenaktivitäten unterschiedlich lang gelagerter Biofilmproben

Lagerungsdauer	Aktivität [$\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$] Mittelwert \pm SD	Abnahme der Aktivität [%]*
Referenzwert	56,7 \pm 2,9	-
30 min	54,5 \pm 4,0	4,0
60 min	49,8 \pm 3,1	12,1
24 h	34,2 \pm 2,7	39,6

* im Verhältnis zum Referenzwert

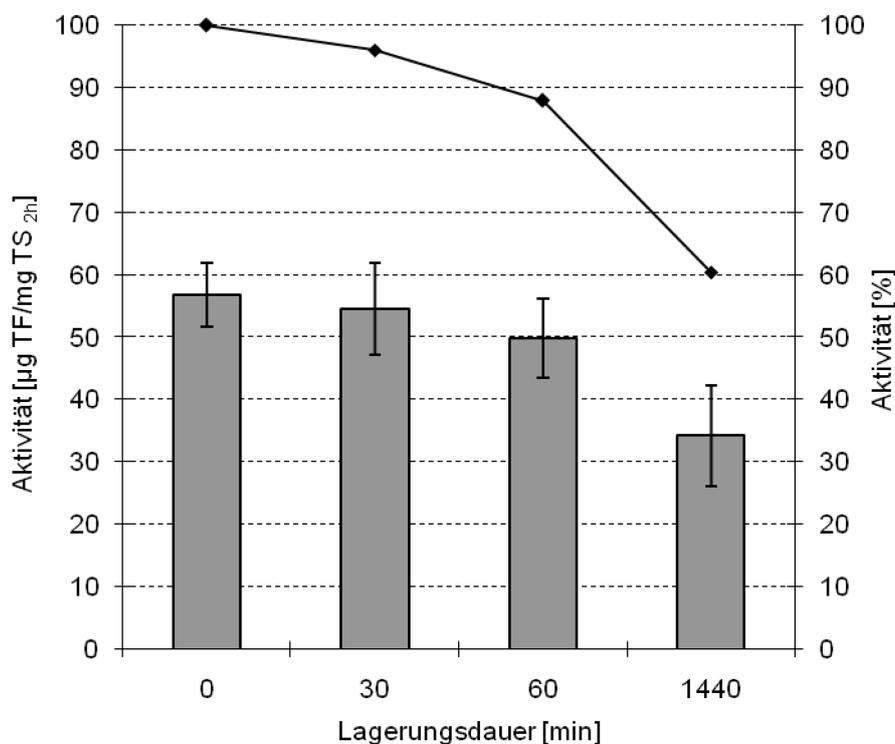


Abb. 6.3: Einfluss der Probenlagerung auf die Dehydrogenasenaktivität: (—◆—) Aktivität (%) (Phase 1, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus zwei Messungen)

In Abbildung 6.3 sind die gemessenen Aktivitätswerte \pm Standardabweichung (Säulen) sowie die Ergebnisse in Prozent gegenüber dem Bezugswert (100 %-Wert) dargestellt. Es ließ sich ein 4%iger Aktivitätsverlust innerhalb der ersten 30 Minuten der Probenaufbewahrung feststellen. Eine einstündige Verzögerung der Aktivitätsmessung ergab eine 12%ige Reduktion der Aktivität. Die eintägige Lagerung des Biofilms bei 4 °C führte wiederum zu einer 40%igen Abnahme der Aktivität (vgl. GRIEBE et al., 1997).

6.2.2. Sauerstoffanwesenheit

Aufgrund verschiedener Theorien in der Literatur zum Sauerstoffeinfluss auf das Ergebnis des Dehydrogenasentests wurde die Formazanproduktion in einem aeroben Medium beobachtet.

Zu diesem Zweck wurden drei Biofilmproben mit ähnlichem Bewuchs (Phase 2, siehe Tab. 5.3) in synthetisches Abwasser (siehe Kap. 5.1.2) mit 3,3 mg/L gelöstem Sauerstoff eingesetzt und die Sauerstoffkonzentration und Formazanproduktion nach verschiedenen Inkubationszeiten gemessen (Abb. 6.4). Die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität erfolgte ohne Abtrennung und Suspendierung des Biofilms.

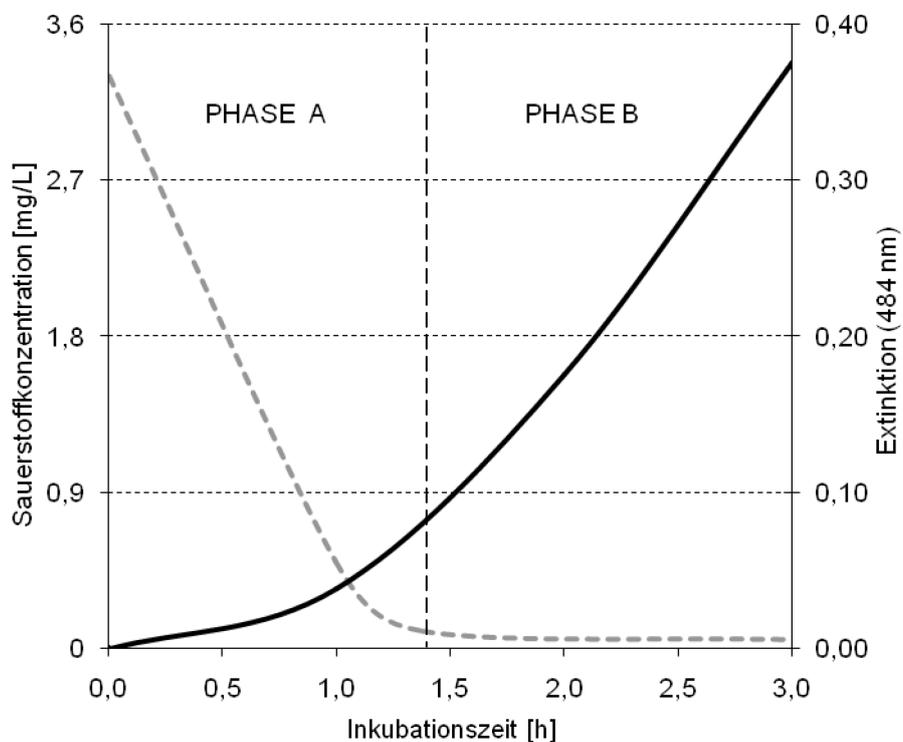


Abb. 6.4: Formazanbildung in einem aeroben Medium (Phase 2, siehe Tab. 5.3): (- -) Sauerstoffkonzentration [mg/L], (—) Extinktion der Formazanlösung

In Abbildung 6.4 ist zu erkennen, dass die Produktion des Formazans zunächst langsam einsetzte. Die Produktionsrate betrug $0,69 \mu\text{g TF/mg TS}\cdot\text{h}$ bis die Anaerobiose erreicht wurde (Phase A) und dann auf einen stabilen Wert von $3,04 \mu\text{g TF/mg TS}\cdot\text{h}$ (Phase B) anstieg.

Um das Ausmaß des Sauerstoffeinflusses zu quantifizieren, wurden Biofilmproben (Phase 2, siehe Tab. 5.3) mit annähernd gleichem Bewuchs ohne Zugabe von TTC in synthetisches Abwasser eingesetzt. Nachdem die Sauerstoffkonzentration im Abwasser einen Wert von etwa 0,1 erreichte, wurde das TTC zugegeben und die Inkubation gestartet.

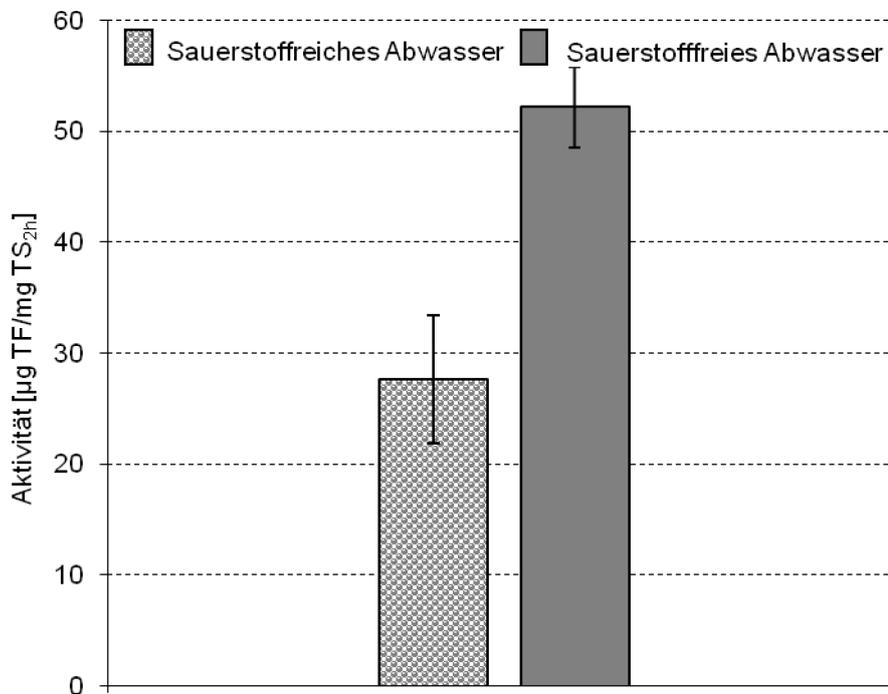


Abb. 6.5: Sauerstoffeinfluss auf die Dehydrogenasenaktivität (Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus drei Messungen)

Die unter diesen Bedingungen gemessene Aktivität des Biofilms betrug $52,1 \pm 3,6 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung). Andere Biofilmproben mit vergleichbarem Bewuchs wurden in frischem, sauerstoffreichem Abwasser mit der TTC-Lösung inkubiert. Nach zwei Stunden wurde das Formazan extrahiert und die Extinktion gemessen. Die Aktivität betrug hier $27,6 \pm 5,8 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ (Abb. 6.5).

Der Versuch wurde nochmals durchgeführt, wobei der Sauerstoff mit Stickstoff aus dem Abwasser verdrängt wurde. Eine 5-minütige Stickstoffbelüftung war ausreichend,

um den Sauerstoffgehalt in der Probe dem Nullwert anzunähern. Die ermittelten Werte der Aktivität deckten sich sehr gut mit den Ergebnissen der vorherigen Messung in sauerstofffreiem Abwasser.

6.2.3. Inkubationstemperatur

Biofilmprouben mit ähnlicher Bewuchsstärke wurden während des Betriebs in Phase 1 und Phase 2 von der ersten Scheibe des Scheibentauchkörpers entnommen und bei entsprechenden Temperaturen von 24,7 °C und 32,6 °C in synthetischem Abwasser inkubiert (Tab. 6.4). In Abbildung 6.6 sind die gemessenen Aktivitäten dargestellt.

Tab. 6.4: Merkmale des verwendeten Abwassers

Parameter	Einheit	Wert
CSB	mg/L	330
BSB ₅	mg/L	281
NH ₄ -N	mg/L	95,5
NO ₃ -N	mg/L	2,4
PO ₄ -P	mg/L	30,2
TDS	mg/L	653
pH		7,8

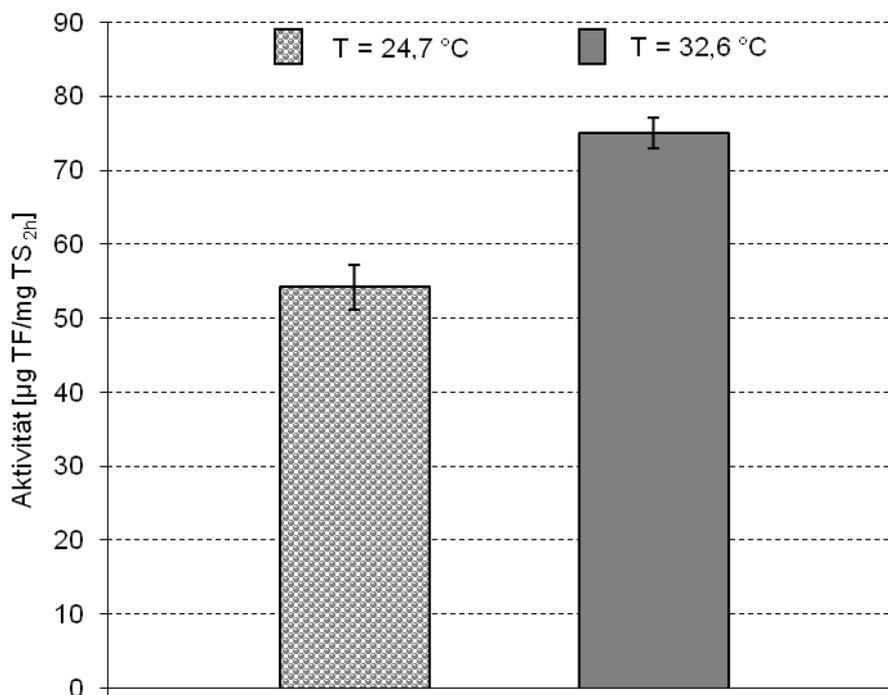


Abb. 6.6: Die Dehydrogenasenaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur (Mittelwerte aus drei Messungen)

Die Aktivität des Biofilms nimmt bei einer höheren Inkubationstemperatur zu. Die bei 24,7 °C bestimmte Aktivität betrug 54,2 µg TF/mg TS_{2h}. Bei 32,6 °C konnten, durch die gegebene mikrobielle Gemeinschaft, ca. 21 µg TF/mg TS_{2h} mehr produziert werden.

6.2.4. pH-Wert

Biofilmproben mit ähnlichem Bewuchs (Phase 2, siehe Tab. 5.3) wurden in synthetischem Abwasser (siehe Kap. 5.1.2) mit unterschiedlichen pH-Werten¹⁸ inkubiert und die Formazanproduktion gemessen (Tab. 6.5 und Abb. 6.7).

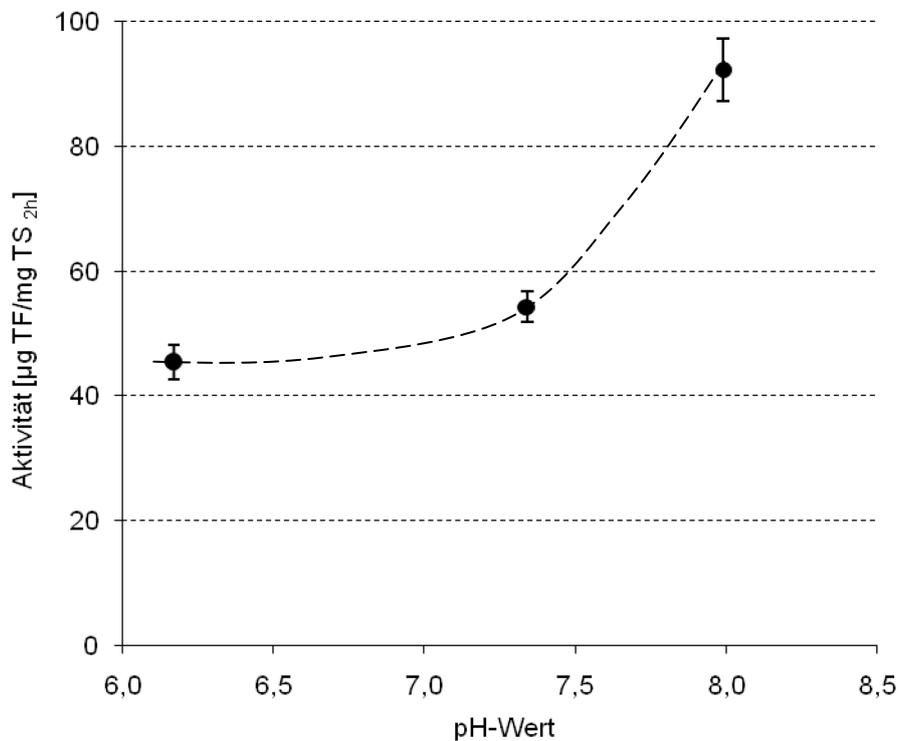


Abb. 6.7: Dehydrogenasenaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert (Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus drei Messungen)

¹⁸ Gewünschte pH-Wert wurde mit Essigsäure eingestellt.

Tab. 6.5: Dehydrogenasenaktivitäten in Abhängigkeit vom pH-Wert des Substrats (Mittelwert \pm Standardabweichung)

pH-Wert	Aktivität [$\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$] Mittelwert \pm SD
6,17	45,4 \pm 2,8
7,34	54,3 \pm 2,5
7,99	92,3 \pm 5,0

Es ist zu erkennen, dass die Formazanproduktion bzw. die Dehydrogenasenaktivität mit steigendem pH-Wert im untersuchten Bereich zwischen 6,0 und 8,0 zunahm.

6.2.5. Organisches Substrat

Die Biofilmaktivität wurde in Gegenwart von zwei unterschiedlichen Substraten verglichen. Dafür wurden Biofilmproben mit ähnlichem Bewuchs (Phase 2, siehe Tab. 5.3) mit 0,1 M Glukoselösung und synthetischem Abwasser inkubiert (siehe Kap. 5.1.2). Die produzierte Formazanmenge wurde auf die Trockenmasse des Biofilms bezogen (Abb. 6.8).

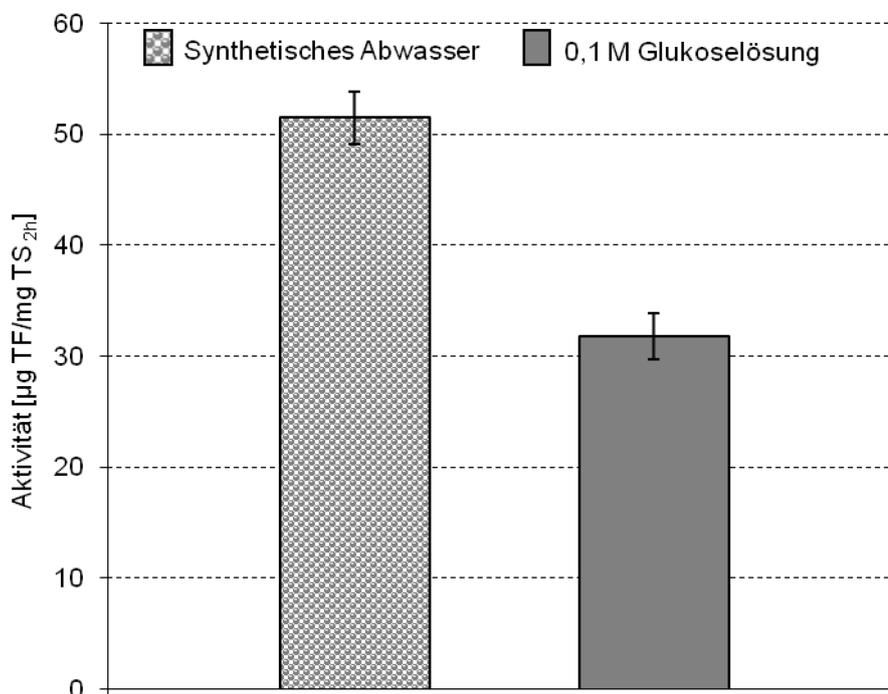


Abb. 6.8: Dehydrogenasenaktivität der Biofilmproben in Abhängigkeit von eingesetztem Substrat (Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus zwei Messungen)

Anhand der in Abbildung 6.8 dargestellten Versuchsergebnisse lässt sich zeigen, dass die Dehydrogenasenaktivität des Biofilms in Gegenwart der Glukose ($31,8 \pm 2,1 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$) niedriger war als der mit synthetischem Abwasser gemessene Wert ($51,4 \pm 2,4 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$).

6.2.6. Konzentration des Tetrazoliumsalses

Um die optimale Konzentration des Tetrazoliumsalses für die Bestimmung der Biofilmaktivität in Scheibentauchkörpern zu ermitteln, wurden die intakten Biofilmproben mit ähnlichem Bewuchs (Phase 2, siehe Tab. 5.3) mit drei verschiedenen Konzentrationen des TTC (1, 5 und 10 mg/L) und synthetischem Abwasser (siehe Kap. 5.1.2) bei einer Temperatur von $32,6 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert (Abb. 6.9).

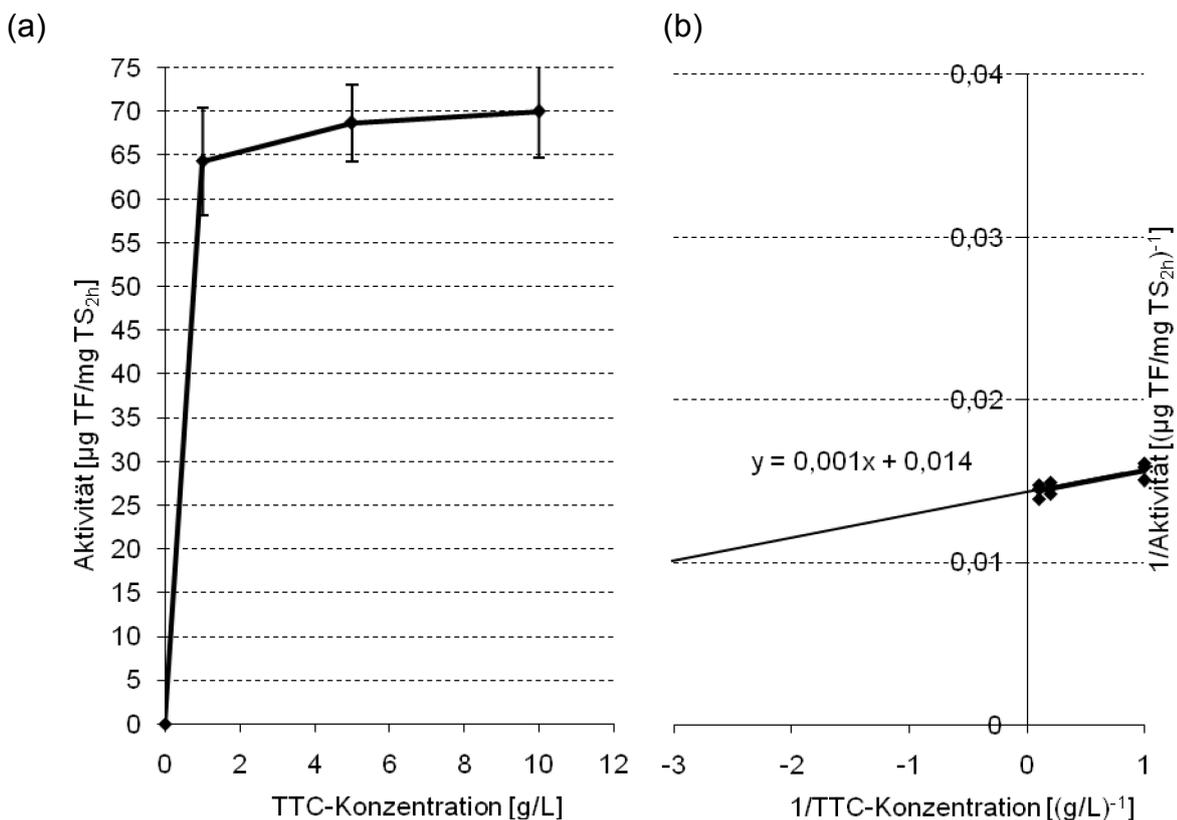


Abb. 6.9: Abhängigkeit der Aktivität von der TTC-Konzentration, bestimmt in Phase 2 bei $32,6 \text{ }^\circ\text{C}$ (a) grafische Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung (Mittelwerte aus drei Messungen), (b) Linearisierung nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung der Konstante K_m

Zu erkennen ist, dass im Bereich von 1 bis 10 g TTC/L die Aktivität des Biofilms mit zunehmender TTC-Konzentration ansteigt (Abb. 6.9a). Die grafische Darstellung und

Auswertung der Ergebnisse nach Lineweaver-Burk (Abb. 6.9b) ergab eine Gerade, für die nach der Methode der linearen Regression die Funktionsgleichung und daraus die Michaeliskonstante (K_m) errechnet wurde.

Der K_m -Wert betrug 0,097 g/L und wies damit eine hohe Affinität (der reziproke K_m -Wert) des Enzyms zum Substrat auf, welche die Tendenz der Dehydrogenasen zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes beschreibt. Schon bei niedrigen Konzentrationen des Tetrazoliumsalses kann die halbmaximale Aktivität erreicht werden.

Der Dehydrogenasentest wurde bei 24,7 °C für dieselben TTC-Konzentrationen wiederholt (Abb. 6.10).

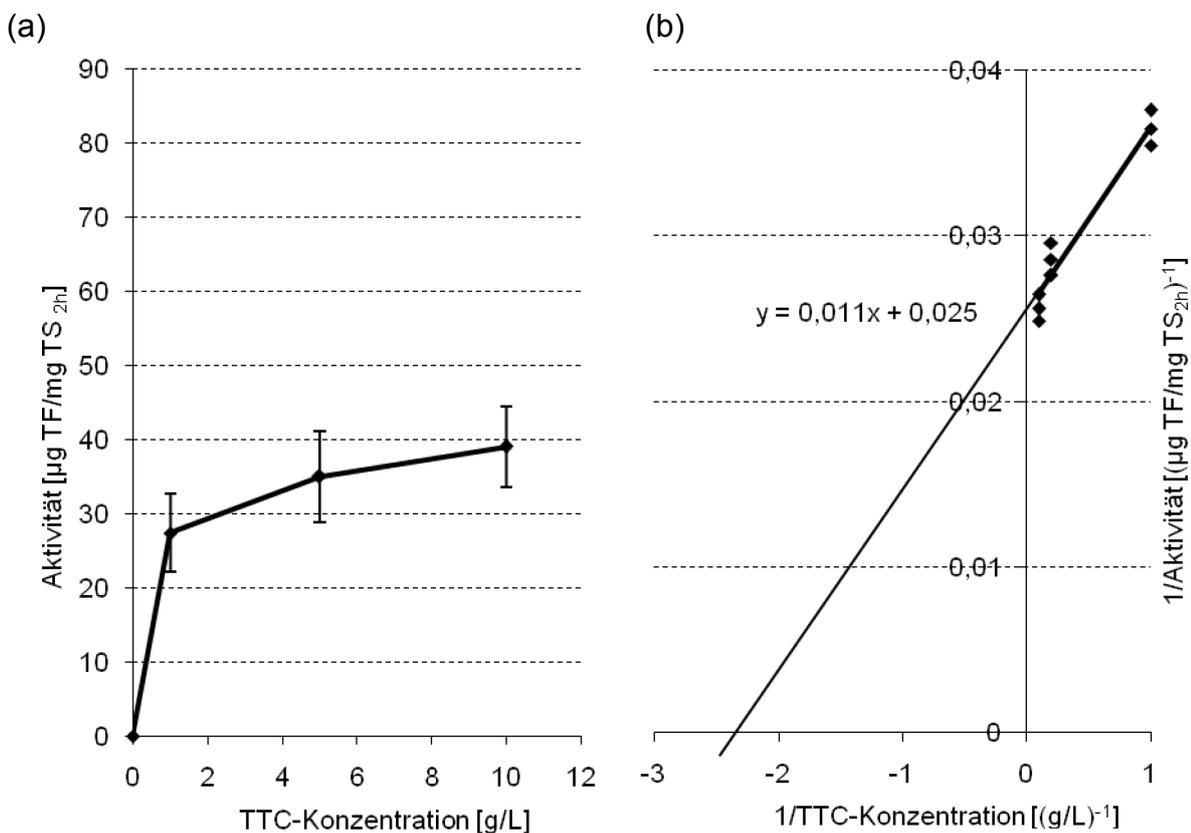


Abb. 6.10: Abhängigkeit der Aktivität von der TTC-Konzentration, bestimmt in Phase 1 bei 24,7 °C (a) grafische Darstellung der Michaelis-Menten-Gleichung (Mittelwerte aus drei Messungen), (b) Linearisierung nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung der Konstante K_m

Es ist festzustellen, dass der K_m -Wert mit der herabgesetzten Temperatur auf 0,441 g/L ansteigt, während die Affinität des Enzyms sinkt.

6.2.7. Inkubationszeit

Um die optimale Dauer der Inkubation abzuschätzen, wurde die Menge des produzierten Formazans nach 1, 2 und 3 Stunden gemessen. Es sollte festgestellt werden, ob die durch Biofilme mit geringem Bewuchs produzierte Formazanmenge nachweisbar ist. Die Messung wurde bei einer Temperatur von 24,7 °C durchgeführt; hier wurde die niedrigste Reaktionsgeschwindigkeit in dem untersuchten Temperaturbereich erwartet. Die Inkubation erfolgte in synthetischem Abwasser (siehe Kap. 5.1.2). In Abbildung 6.11 wird die Formazanproduktion in Abhängigkeit von der Inkubationszeit grafisch (Mittelwert \pm Standardabweichung) dargestellt.

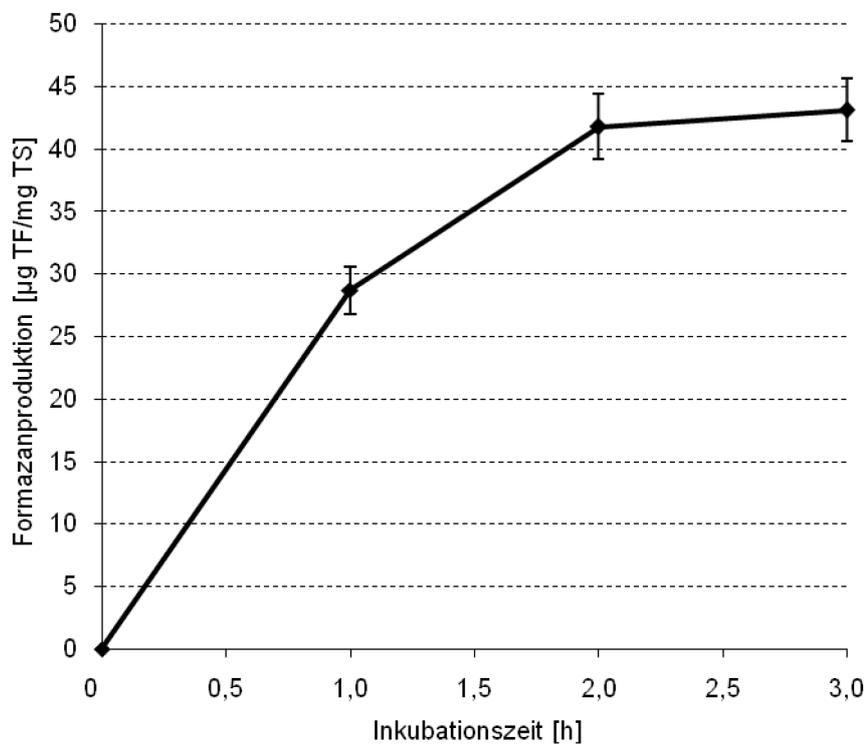


Abb. 6.11: Einfluss der Inkubationszeit auf die Formazanproduktion (Phase 1, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus zwei Messungen)

Es ist festzustellen, dass die Formazanproduktion im untersuchten Zeitraum asymptotisch verläuft, wobei die Annäherung der Kurve an den maximalen Aktivitätswert ab der zweiten Inkubationsstunde erfolgt.

6.2.8. Stabilität des Formazans

Um die Stabilität des roten Formazans im Ethanol beurteilen zu können, wurden zwei Formazanlösungen bei Raumtemperatur gelagert. Die Extinktionen wurden nach 24 und nach 48 Stunden gemessen (Tab. 6.6).

Tab. 6.6: Untersuchung der Stabilität des Formazans im Ethanol

Lagerungsdauer [h]	Extinktion (484 nm)	Abnahme der Extinktion [%]*
Probe 1		
Referenzwert	0,41	-
24	0,41	0
48	0,41	0
Probe 2		
Referenzwert	0,80	-
24	0,80	0
48	0,80	0

* im Verhältnis zum Extinktionswert kurz nach der Extraktion

Die Rotfärbung war nach der angegebenen Zeit stabil.

6.2.9. Extinktionskoeffizient

Um den molaren Extinktionskoeffizienten zu berechnen, wurden die Extinktionswerte der frisch hergestellten Standardlösungen bei 484 nm gegen Ethanol gemessen.

In Tabelle 6.7 sind die verwendeten Konzentrationen des Triphenylformazans sowie die gemessenen Extinktionswerte zusammengestellt, mit denen der molare Extinktionskoeffizient ϵ_{484} von $1,20 \cdot 10^4$ L/mol-cm berechnet wurde.

Tab. 6.7: Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Konzentration des Triphenylformazans

Konzentration des Triphenylformazans		Extinktion (484 nm)
[$\mu\text{g/mL}$]	[mol/L]	
1	$0,33 \cdot 10^{-5}$	0,04
5	$1,66 \cdot 10^{-5}$	0,20
10	$3,33 \cdot 10^{-5}$	0,41
20	$6,66 \cdot 10^{-5}$	0,79
30	$9,99 \cdot 10^{-5}$	1,17

6.2.10. Vorbereitung der Kontrollproben

Um festzustellen, welches von den in der Literatur genannten Verfahren das geeignetste zur Inaktivierung der Biofilmpollen ist, wurden zwei Versuche durchgeführt, in dem die Aktivitäten von zwei unterschiedlich deaktivierten Proben (mit Formalin und 2%igem Formaldehyd) mit der Aktivität von intaktem Biofilm (Phase 2, siehe Tab. 5.3) verglichen wurden (Abb. 6.12).

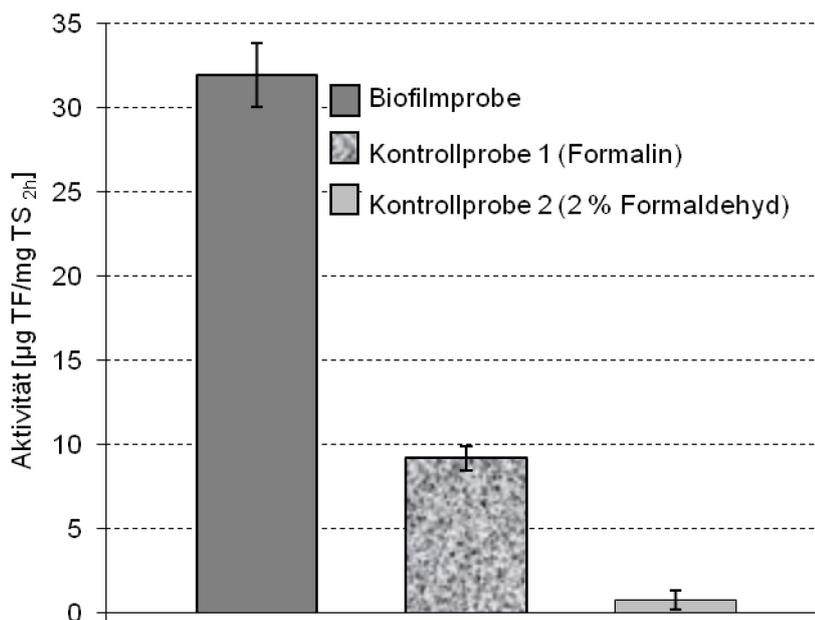


Abb. 6.12: Vergleich der Wirksamkeit von Formalin und Formaldehyd bei der Inaktivierung des Biofilms (Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus zwei Messungen)

Die Aktivität der intakten Probe betrug $32 \pm 1,9 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$. Formalin deaktivierte die Biofilmprobe um 71 %, so dass die Aktivität $9,2 \pm 0,7 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ (Mittelwert \pm Standardabweichung) betrug, während Formaldehyd eine über 97%ige Reduktion der Aktivität bewirkte.

Zur Klärung, wie sich die Extinktion der Kontrollproben mit der Masse des Biofilms ändert, wurden die unterschiedlich bewachsenen Biofilmpollen vor der Durchführung der Aktivitätsmessung 30 Minuten in 2%igem Formaldehyd inkubiert. Die gemessenen Extinktionen sind in Abbildung 6.13 dargestellt.

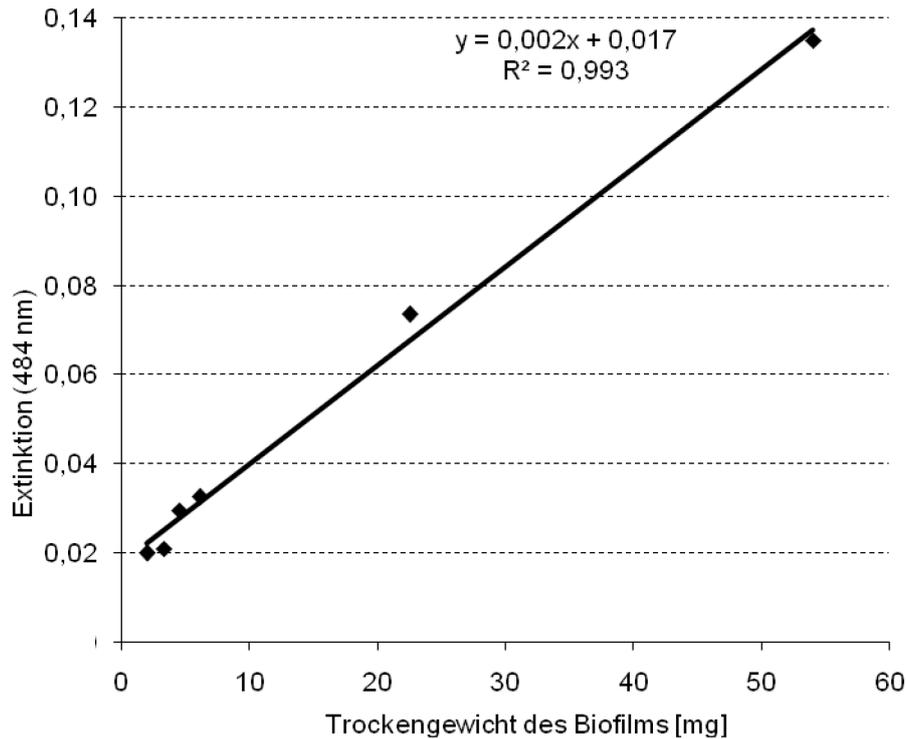


Abb. 6.13: Abhängigkeit der Extinktion der Kontrollprobe vom Gewicht des untersuchten Biofilms

Es ist zu erkennen, dass die Extinktionen proportional zum Trockengewicht des Biofilms waren.

6.3. Vergleich der konventionellen und der modifizierten Methode

Um das Ausmaß des Einflusses der Abtrennung und Suspendierung des Biofilms zu quantifizieren, wurden Biofilmproben (Phase 2, siehe Tab. 5.3) mit annähernd gleichem Bewuchs von der ersten Scheibe des Scheibentauchkörpers entnommen und die Aktivität mittels konventioneller (siehe Kap. 5.4.1) und modifizierter Methode (siehe Kap. 5.4.2) bestimmt.

Die Randbedingungen wurden bei beiden Methoden gleich gehalten, so dass bestimmte Aktivitäten miteinander verglichen werden konnten (Abb. 6.14).

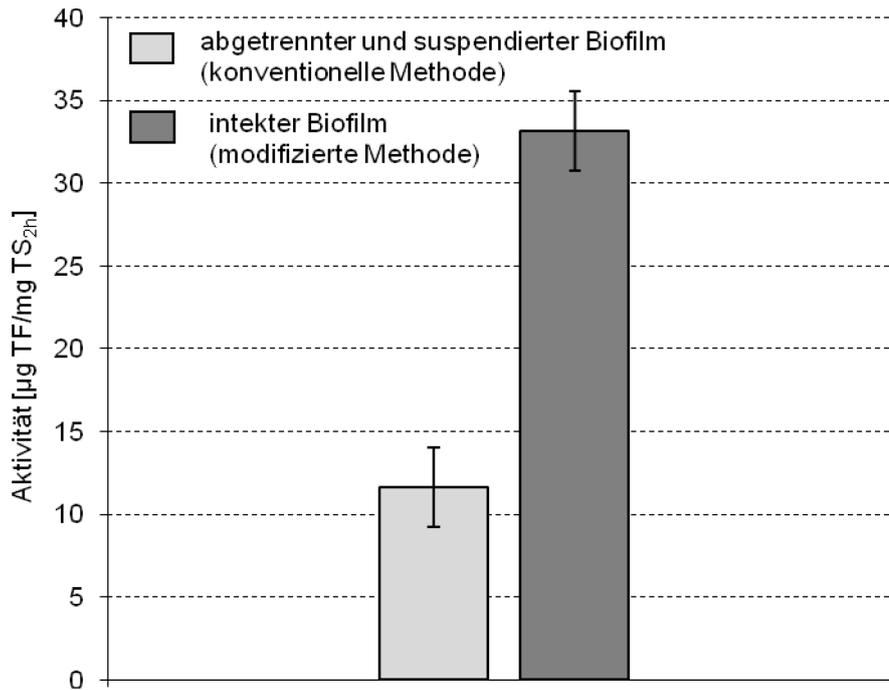


Abb. 6.14: Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität mittels der konventionellen und der modifizierten Methode (Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus drei Messungen)

Aus Abbildung 6.14 lässt sich ein deutlicher Unterschied zwischen den gewonnenen Ergebnissen feststellen. Der abgetrennte und suspendierte Biofilm (konventionelle Methode) wies eine Dehydrogenasenaktivität von $11,7 \pm 2,4 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ auf, während die Aktivität des intakten Biofilms (modifizierte Methode) $33,1 \pm 2,4 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ betrug (Tab. 6.8).

Tab. 6.8: Die mittels konventionellen und modifizierten Methode bestimmten Dehydrogenasenaktivitäten

Methode	Aktivität [$\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$]	
	Bereich	Mittelwert \pm SD
modifizierte	30,9 – 35,1	$33,1 \pm 2,4$
konventionelle	9,4 – 13,6	$11,7 \pm 2,4$

6.4. Überprüfung der modifizierten Methode

Zur Überprüfung des Dehydrogenasentests wurden die Biofilmproben mit verschiedenen Bewuchsstärken während des Betriebs des Scheibentauchkörpers (Phase 1, siehe Tab. 5.3) von der ersten Scheibe entnommen und anschließend einer Sauerstoffverbrauchsmessung in synthetischem Abwasser (siehe Kap. 5.1.2) unterzogen (siehe Kap. 5.6).

Das Ergebnis jeder Sauerstoffverbrauchsmessung stellte eine Respirationkurve dar. Über die Bestimmung des Messkurvenanstiegs erfolgte die Ermittlung der Atmungsgeschwindigkeit (Abb. 6.15).

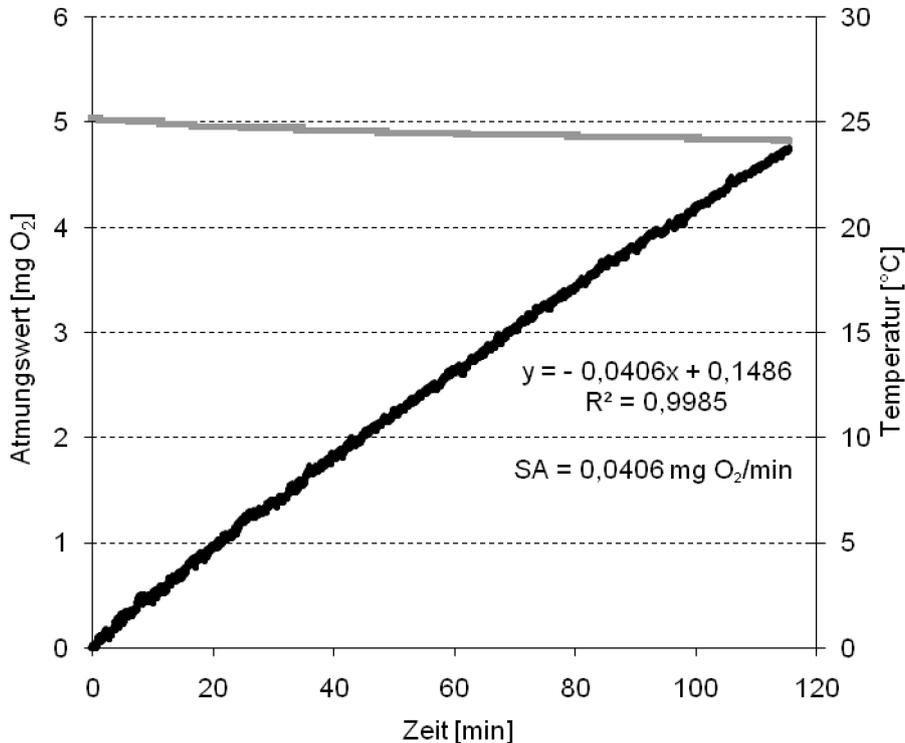


Abb. 6.15: Auswertungsbeispiel einer repräsentativen Messkurve: (—) Atmungswert (mg O₂), (—) Temperatur (°C)

Da die Atmungsgeschwindigkeiten von der Biofilmmenge abhängen, konnten, durch eine Bezugnahme der Werte auf die Trockenmasse des Biofilms, alle Messungen miteinander verglichen werden. Die so erhaltenen Atmungsaktivitäten des Biofilms wurden in mg O₂/g TS·h ausgedrückt.

In Abbildung 6.16 sind die ermittelten Werte zusammen mit den entsprechenden Ergebnissen des Dehydrogenasentests dargestellt. Obwohl die Messtemperaturen bei der Parameter unterschiedlich waren¹⁹, ist zu erkennen, dass zwischen beiden Verläufen eine gute Übereinstimmung besteht. Veränderungen der Atmungsaktivität ergaben sich parallel zu den Änderungen der Dehydrogenasenaktivität.

¹⁹ Dehydrogenasenaktivität: Phase 2, Atmungsaktivität: Phase 1 (siehe Kap. 5.1.3)

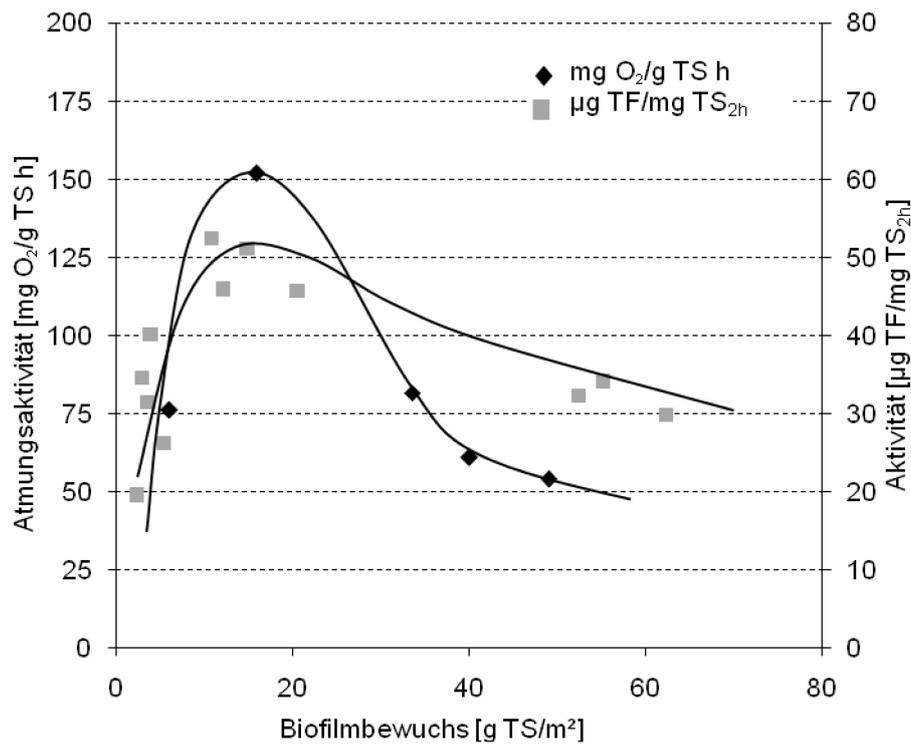


Abb. 6.16: (■) Dehydrogenasenaktivität (Phase 2) und (◆) Atmungsaktivität (Phase 1) gemessen für Biofilmproben mit verschiedenem Bewuchs (g TS/m²)

6.5. Anwendung der modifizierten Methode

6.5.1. Bestimmung der Aktivitätsänderung mit zunehmender Biofilmmenge

Um aufzuzeigen wie sich die Aktivität mit zunehmender Biofilmmenge ändert, wurden während des Betriebs (Phase 1, siehe Tab. 5.3) Biofilmproben mit unterschiedlicher Bewuchsstärke von der ersten Scheibe des Scheibentauchkörpers entnommen und die Dehydrogenasenaktivität bestimmt. Die Menge des Formazans wurde auf die Fläche, von der der Biofilm entnommen wurde, bezogen. Durch Interpolation der erhaltenen Werte konnte eine Abhängigkeit der Dehydrogenasenaktivität vom Biofilmbewuchs bestimmt werden (Abb. 6.17).

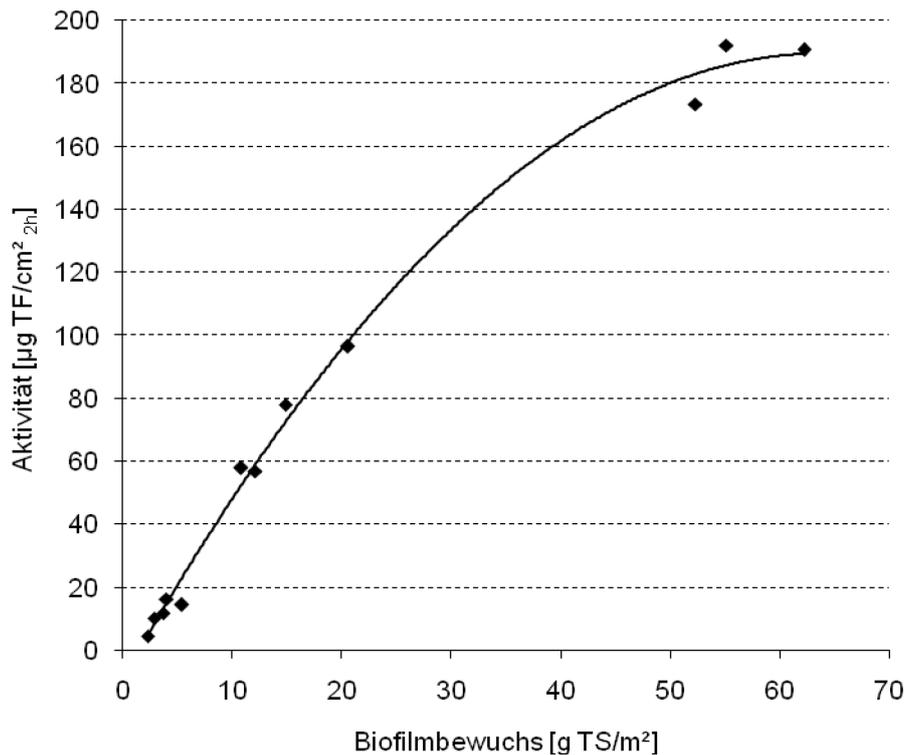


Abb. 6.17: Flächenbezogene Dehydrogenasenaktivität ($\mu\text{g TF}/\text{cm}^2_{2\text{h}}$) bei unterschiedlichem Biofilmbewuchs (Phase 1, siehe Tab. 5.3)

In Abbildung 6.17 ist die Änderung der flächenbezogenen Aktivität mit steigendem Biofilmbewuchs aufgetragen. Es ist zu erkennen, dass die Aktivität des Biofilms nicht proportional zu dessen Biomassegehalt pro Aufwuchsfläche ist. Die Aktivität nahm bis zum Erreichen einer maximalen Aktivität zu, um dann zu stagnieren.

6.5.2. Bestimmung der Aktivität bei wechselnder Temperatur und Substratkonzentration

Biofilmproben mit ähnlicher Bewuchsstärke wurden während des Betriebs in Phase 1 und Phase 2 (siehe Tab. 5.3) von der ersten Scheibe des Scheibentauchkörpers entnommen und mit verschiedenen Substratkonzentrationen bei $24,7\text{ }^\circ\text{C}$ und $32,6\text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert (Tab. 6.9 und Tab. 6.10).

Tab. 6.9: Hergestellte Verdünnungen des synthetischen Abwassers

Abwasserkomponente	Konzentration [mg/L]			
	P1	P2	P3	P4
Melasse	125	375	625	875
NH_4Cl	96	287	478	669
K_2HPO_4	19	56	93	130

Tab. 6.10: Merkmale der verwendeten Abwasserverdünnungen

Parameter	Einheit	P1	P2	P3	P4
CSB	mg/L	133	330	555	748
BSB ₅	mg/L	113	281	472	634
NH ₄ -N	mg/L	37,1	95,5	151,3	221,2
NO ₃ -N	mg/L	1,7	2,4	3,1	3,6
PO ₄ -P	mg/L	14,1	30,2	54,0	69,0
TDS	mg/L	414	653	885	1120
pH		7,8	7,8	7,8	7,7

Die Menge des produzierten Formazans wurde gemessen und auf die Biomasse bezogen.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse erfolgte nach der Formel von Lineweaver-Burk, indem die Reziprokwerte der Aktivität gegen die Reziprokwerte der Substratkonzentration aufgetragen wurden (Abb. 6.18).

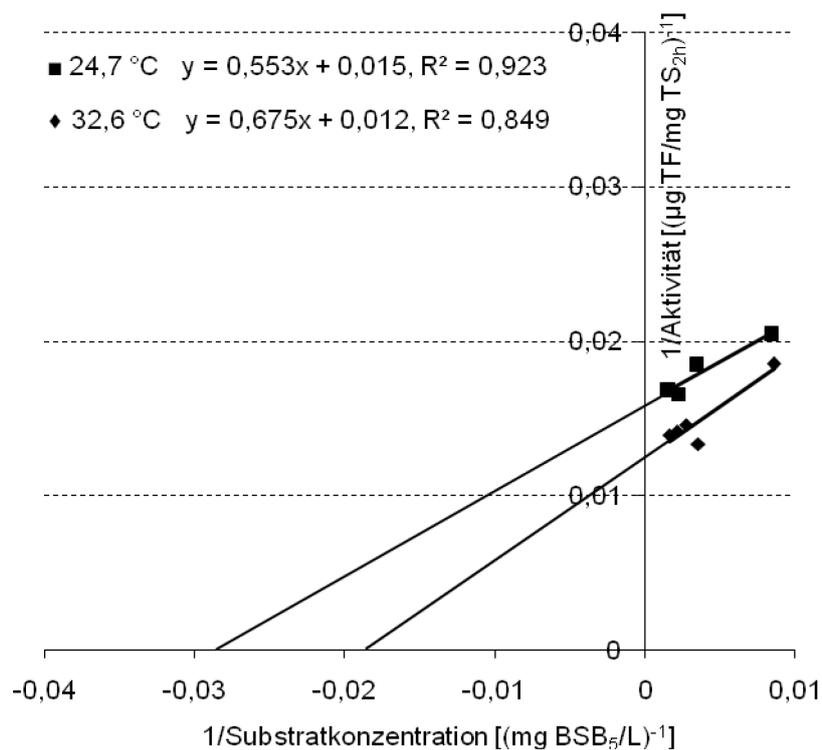


Abb. 6.18: Linearisierung nach Lineweaver-Burk zur Bestimmung der Konstanten K_m und $TTC-DHA_{max}$ (Phase 1 und Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus drei Messungen)

Die Darstellung der Ergebnisse nach Lineweaver-Burk ergab jeweils eine Gerade, für die nach der Methode der linearen Regression die Funktionsgleichung und daraus die Michaeliskonstante (K_m) und die maximale Aktivität ($\text{TTC-DHA}_{\text{max}}$) errechnet wurden.

Tab. 6.11: $\text{TTC-DHA}_{\text{max}}$ - und K_m -Werte in Abhängigkeit von der Abwassertemperatur

Abwassertemperatur [°C]	$\text{TTC-DHA}_{\text{max}}$ [$\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$]	K_m [mg BSB_5/L]
24,7	62,9	34,8
32,6	80,6	54,5

Mit Hilfe der ermittelten Werte (Tab. 6.11) konnte für beide Temperaturen eine angenäherte Michaelis-Menten-Kurve erstellt werden (Abb. 6.19).

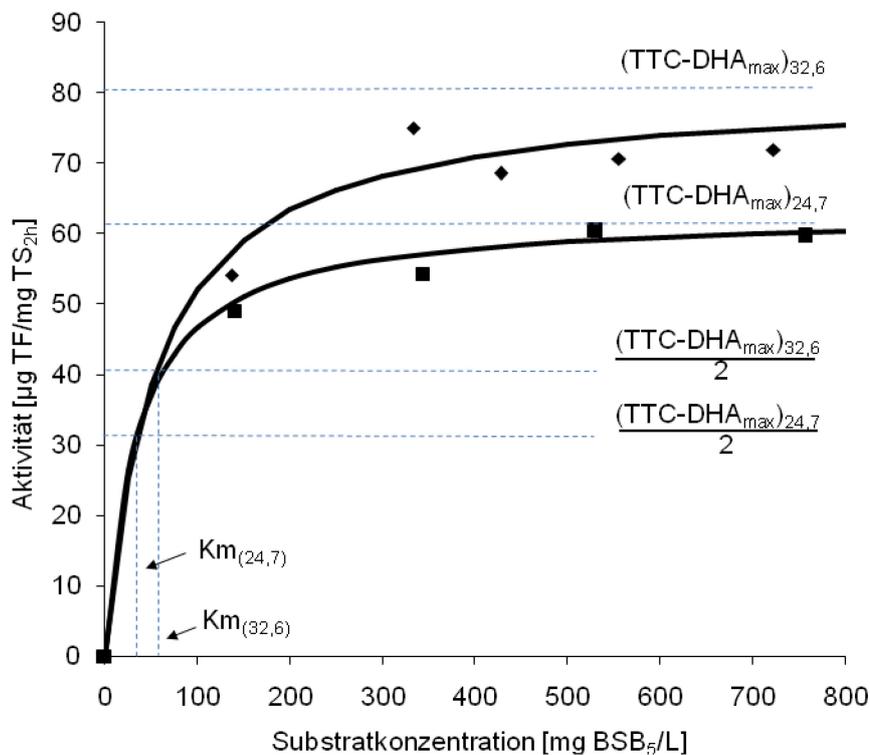


Abb. 6.19: Darstellung der Dehydrogenasenaktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration: Abwassertemperatur (■) MW = $24,7^\circ\text{C}$, (◆) MW = $32,6^\circ\text{C}$

Die bei $24,7^\circ\text{C}$ bestimmte maximale Aktivität betrug $62,9 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$. Bei $32,6^\circ\text{C}$ konnten, durch die gegebene mikrobielle Gemeinschaft, ca. $18 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ mehr produziert werden.

6.5.3. Verteilung der Dehydrogenasenaktivität

Biofilm der Scheiben 1, 3, 6, 7 und 12 der Scheibentauchkörperanlage wurde in Phase 2 (siehe Tab. 5.3) entnommen und mit Abwasser aus dem entsprechenden Bereich der Anlage inkubiert. Die produzierte Formazanmenge wurde auf die untersuchte Fläche des Biofilms bezogen und die Aktivität in $\mu\text{g TF}/\text{cm}^2_{2\text{h}}$ ausgedrückt. Durch Interpolation der erhaltenen Werte wurde die Verteilung der Aktivität im Scheibentauchkörper ermittelt (Abb. 6.20 und Tab. 6.12).

Tab. 6.12: Dehydrogenasenaktivität im Scheibentauchkörper

Scheibe	Aktivität [$\mu\text{g TF}/\text{cm}^2_{2\text{h}}$] Mittelwert \pm SD
1	173,0 \pm 7,5
3	146,7 \pm 9,5
6	50,5 \pm 4,2
7	36,5 \pm 2,3
12	11,9 \pm 3,0

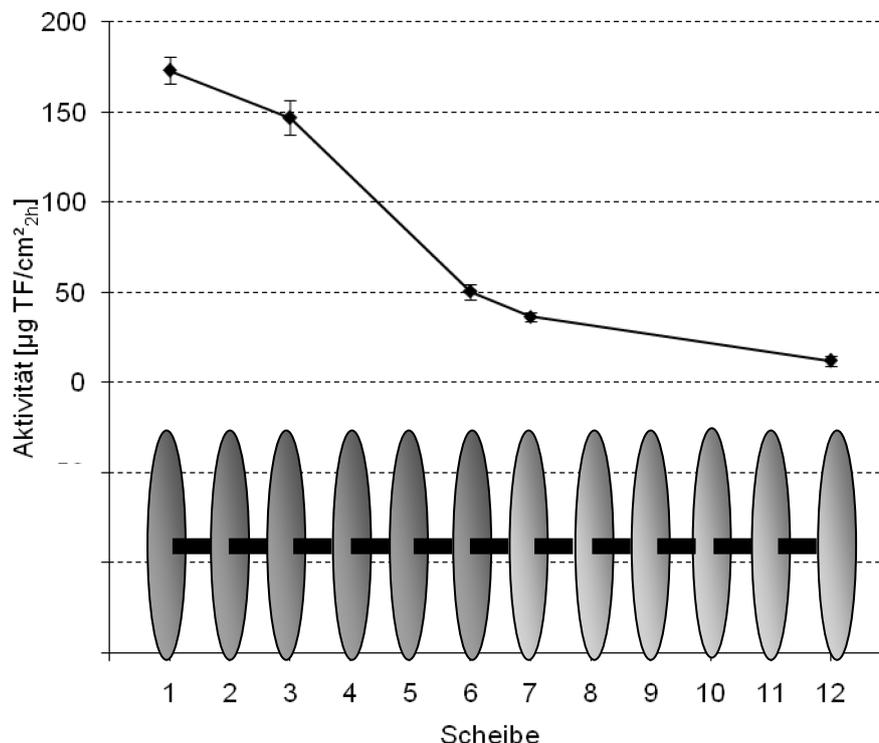


Abb. 6.20: Verteilung der flächenbezogenen Dehydrogenasenaktivität in der Scheibentauchkörperanlage (Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus zwei Messungen)

In Abbildung 6.20 sind die Werte der flächenbezogenen Dehydrogenasenaktivität des Biofilms ($\mu\text{g TF}/\text{cm}^2_{2\text{h}}$) auf den verschiedenen Scheiben der Scheibentauchkörperanlage dargestellt.

Die höchste Biofilmaktivität wurde auf der Oberfläche der ersten Scheibe bestimmt. Sie betrug $173,0 \pm 7,5 \mu\text{g TF}/\text{cm}^2_{2\text{h}}$ und nahm auf den folgenden Scheiben bis zu einem Wert von $11,9 \pm 3,0 \mu\text{g TF}/\text{cm}^2_{2\text{h}}$ auf der letzten Scheibe der Anlage ab.

6.6. Verteilung der Nukleinsäuren

Biofilm von den Scheiben 1, 3, 6 und 12 wurde in Phase 2 (siehe Tab. 5.3) entnommen und die Konzentrationen an DNA, tRNA und rRNA mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) gemessen (siehe Kap. 5.5). Zusätzlich wurde der flächenbezogene Bewuchs des Biofilms auf den entsprechenden Scheiben bestimmt, um die DNA und RNA-Werte auf die Fläche der Scheiben beziehen zu können. Durch Interpolation der erhaltenen Werte wurde die Verteilung der Nukleinsäuren im Scheibentauchkörper ermittelt.

6.6.1. Profil der DNA-Konzentration

Mit einem Wert von $968 \text{ mg}/\text{m}^2$ bildete sich auf der ersten Scheibe der Anlage die höchste DNA-Konzentration aus. Auf den folgenden Scheiben kam es zu einer Abnahme der DNA-Konzentration bis zu einem Wert von $358 \text{ mg}/\text{m}^2$ auf der letzten Scheibe (Tab. 6.13).

Tab. 6.13: DNA-Konzentrationen im Scheibentauchkörper (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Scheibe	DNA [mg/g TS] Mittelwert \pm SD	DNA [mg/m ²] Mittelwert \pm SD
1	29,5 \pm 6,2	968 \pm 203
3	30,9 \pm 3,3	874 \pm 93
6	29,2 \pm 2,0	677 \pm 46
12	22,2 \pm 3,3	358 \pm 52

In Abbildung 6.21 sind die DNA-Konzentrationen auf den Scheiben der Scheibentauchkörperanlage dargestellt. Die Ergebnisse wurden in mg/m^2 ausgedrückt.

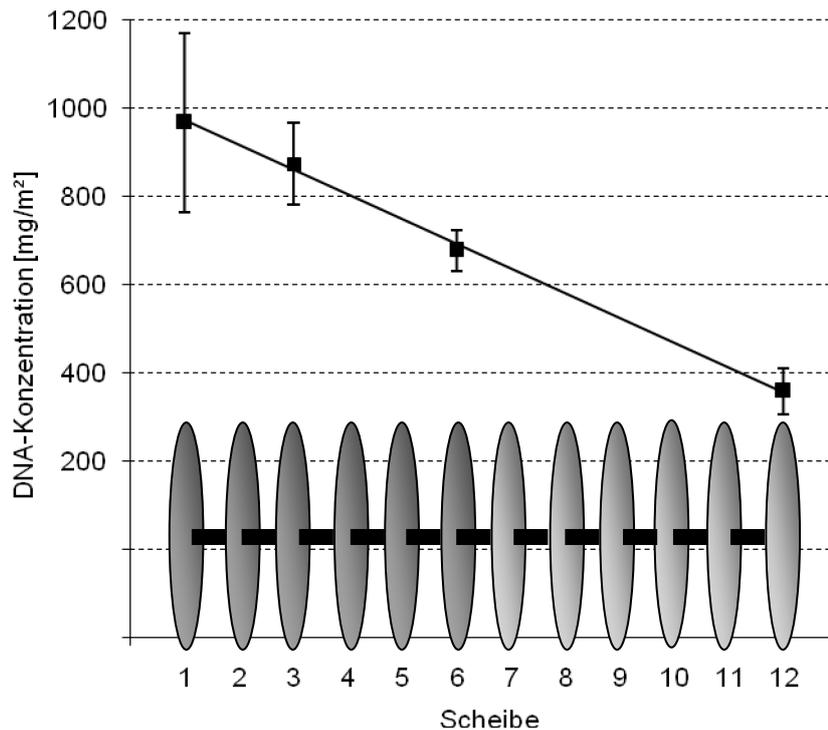


Abb. 6.21: Verteilung der DNA-Konzentrationen in der Scheibentauchkörperanlage bezogen auf die Scheibenfläche (Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus drei Messungen)

6.6.2. Profil der RNA-Konzentration

Bezogen auf die Trockenmasse des Biofilms wurde die höchste RNA-Konzentration auf der Oberfläche der dritten Scheibe bestimmt. Sie betrug $40,0 \pm 4,0$ mg/g TS und war damit mehr als drei Mal höher als der niedrigste Wert mit $11,8 \pm 5,3$ mg/g TS auf der letzten Scheibe. Ab der dritten Scheibe fand eine Abnahme der RNA-Konzentration statt (Tab. 6.14 und Abb. 6.22).

Tab. 6.14: RNA-Konzentrationen im Scheibentauchkörper (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Scheibe	RNA [mg/g TS] Mittelwert \pm SD	RNA [mg/m²] Mittelwert \pm SD
1	$32,8 \pm 4,4$	1076 ± 144
3	$40,0 \pm 4,0$	1132 ± 114
6	$27,1 \pm 3,7$	628 ± 85
12	$11,8 \pm 5,3$	189 ± 53

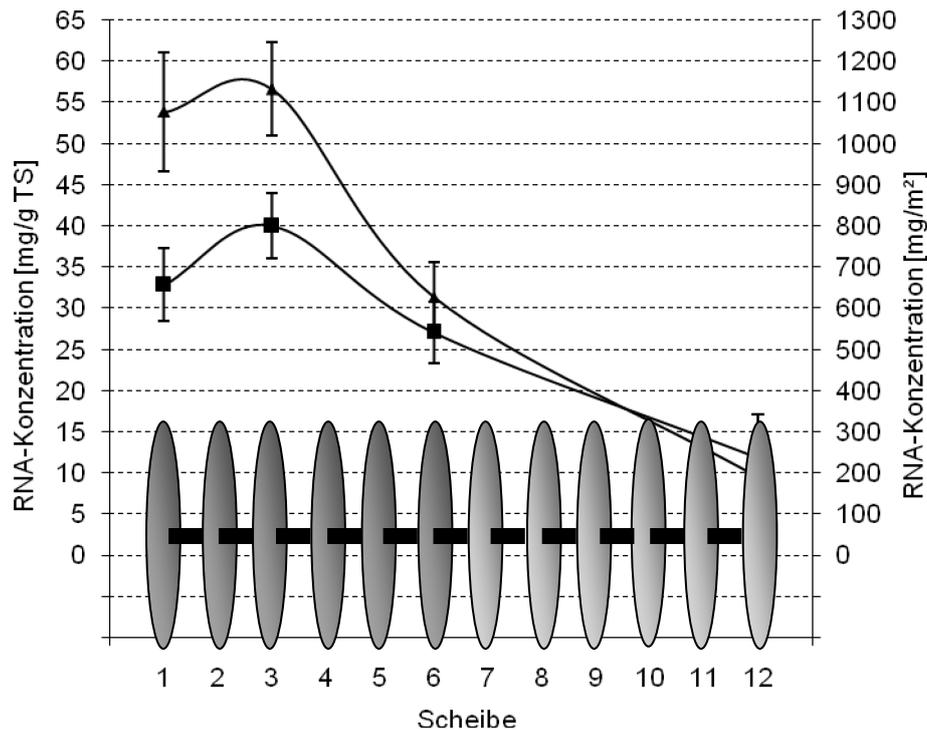


Abb. 6.22: Verteilung der RNA-Konzentrationen in der Scheibentauchkörperanlage: (■) mg/g TS, (▲) mg/m² (Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus drei Messungen)

Auf Grund der Abnahme des Biofilmbewuchses entlang der Scheibentauchkörperachse werden die Unterschiede zwischen den einzelnen Scheiben durch die auf die Scheibenoberfläche bezogenen RNA-Konzentrationen deutlicher. Die Werte betragen auf den ersten Scheiben 1076 mg/m² und 1132 mg/m² und sanken auf den nächsten Scheiben bis auf einen Wert von 189 mg/m² auf der letzten Scheibe ab.

6.6.3. Profil des RNA/DNA-Verhältnisses

In Tabelle 6.15 ist das ermittelte RNA/DNA-Verhältnis auf einzelnen Scheiben des Scheibentauchkörpers dargestellt.

Tab. 6.15: Das RNA/DNA-Verhältnis in der Scheibentauchkörperanlage (Mittelwert ± Standardabweichung)

Scheibe	RNA/DNA [-] Mittelwert ± SD
1	1,2 ± 0,2
3	1,3 ± 0,2
6	0,9 ± 0,4
12	0,5 ± 0,1

Die Verteilung der RNA/DNA als Parameter für die relative mikrobielle Aktivität wurde zusammen mit dem Verlauf der DNA- und RNA-Kurven in Abbildung 6.23 dargestellt.

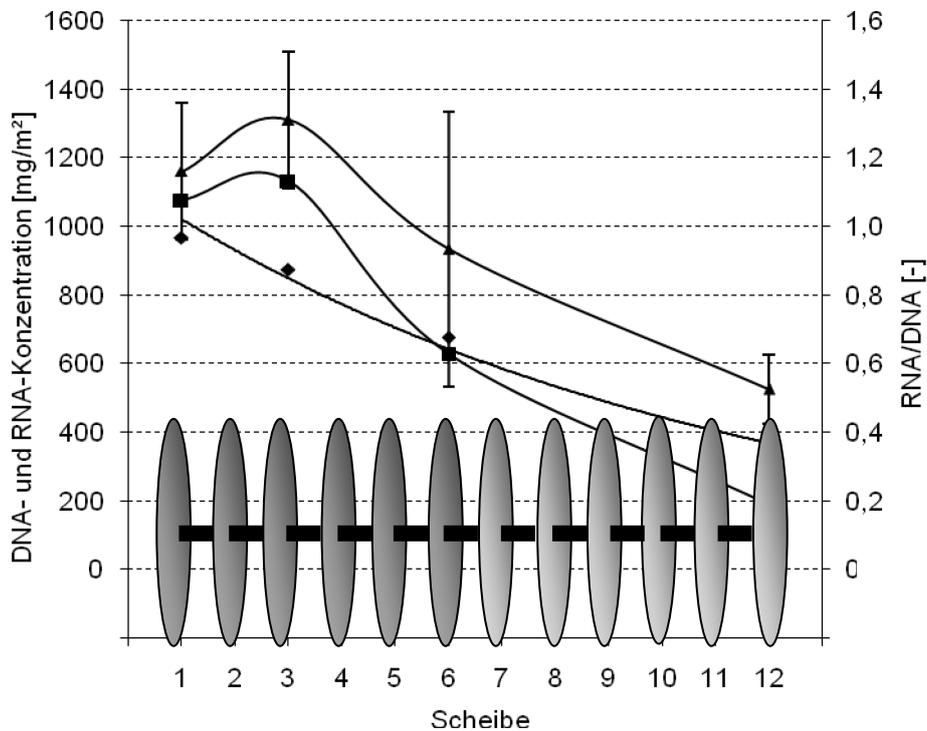


Abb. 6.23: Verteilung (◆) der DNA-, (■) RNA-Konzentrationen und (▲) des RNA/DNA-Verhältnisses in der Scheibentauchkörperanlage (Phase 2, siehe Tab. 5.3, Mittelwerte aus mindestens drei Messungen)

In Abbildung 6.23 ist zu erkennen, dass fast in der gesamten ersten Kaskade (Scheiben 1 - 5) die RNA-Werte höher als die DNA-Werte waren. Dies führte zu einem hohen RNA/DNA-Verhältnis von bis zu $1,3 \pm 0,2$. Im Gegensatz dazu waren die in der zweiten Kaskade gemessenen RNA-Konzentrationen geringer als die DNA-Konzentrationen, was sich in einem RNA/DNA-Verhältnis von < 1 ausdrückt. Das niedrigste RNA/DNA-Verhältnis wurde mit $0,5 \pm 0,1$ auf der letzten Scheibe der Anlage gefunden.

7. Diskussion

7.1. Reinigungsleistung der Anlage

7.1.1. BSB₅-Elimination

Eine BSB₅-Elimination von über 93 % (Phase 1) und 95 % (Phase 2) wurde während des gesamten Probennahmezeitraums erreicht (siehe Kap. 6.1.1 und Abb. 6.1).

Die beobachteten BSB₅-Umsatzraten und die prozentualen BSB₅-Abbauleistungen der Anlage in Phase 1 (siehe Tab. 5.3) decken sich sehr gut mit den Ergebnissen von BLANK et al. (2008) (Tab. 7.1).

Tab. 7.1: Betriebsbedingungen und -ergebnisse der Versuchsanlagen

Parameter	Einheit	synthetisches Abwasser	
		diese Arbeit	K5*
Scheibendurchmesser	cm	25	25
Scheibenbelastung	g BSB ₅ /m ² -d	8,1	8,1
Rotationsgeschwindigkeit	rpm	4	4
Temperatur	°C	24,7	23,9
HRT	h	5	5
BSB ₅ -Umsatzrate	g BSB ₅ /m ² -d	7,5	7,7
mittlere BSB ₅ -Abbauleistung	%	93	97

* für weitere Angaben siehe BLANK et al. (2008)

7.1.2. Stickstoffbilanz

Das mittlere Verhältnis zwischen N_{ges}-Zulauf- und Abauffracht (Summe aus NH₄-N und NO₃-N) betrug 0,66. 34 % der im Zulauf gemessenen N-Fracht konnte nicht mehr im Ablauf der Anlage nachgewiesen werden.

Ein Teil der Stickstoffverbindungen wird in die Biomasse eingebaut. Da der Ertragskoeffizient Biomasse/Substrat $Y_{B/S}$ nach ATV-DVWK-A 281 im Falle fehlender Messergebnisse mit 0,75 kg TS pro kg eliminiertem BSB₅ angenommen werden kann, wurde, anhand des abgebauten BSB₅ ($\Delta\text{BSB}_5 = 11,70 \text{ g/d}$), die produzierte Biomasse berechnet (8,77 g TS/d). Weiterhin, unter der Annahme, dass der assimilierte Stickstoff

12 % des Biomassezuwachses darstellt (HENZE et al., 1995), konnte die N-Assimilation mit 1,05 g/d bei der Stickstoffbilanzierung berücksichtigt werden (Abb. 7.1).

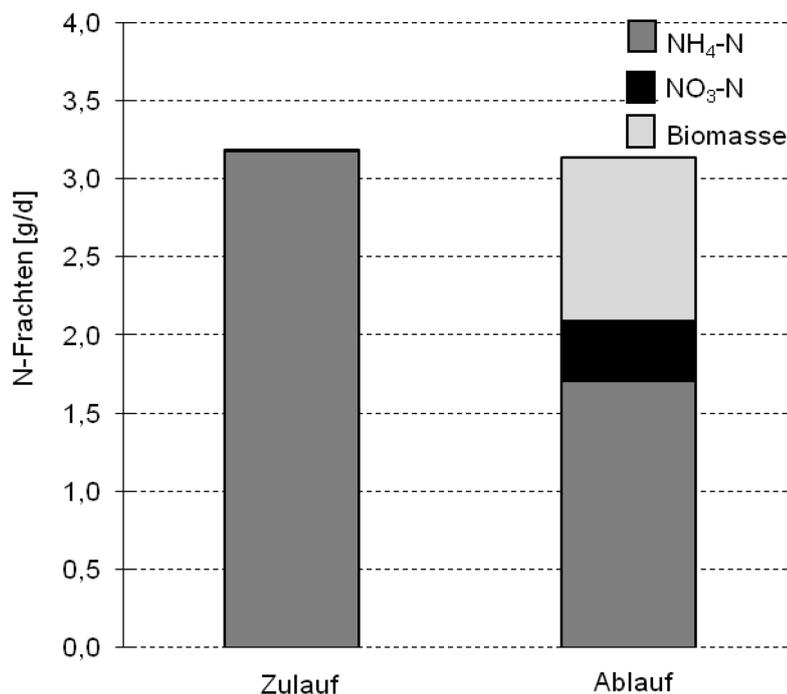


Abb. 7.1: Stickstoffbilanz: Zulauf- und Abauffracht sowie Assimilation in die Biomasse (Phase 2: Scheibenbelastung 8,1 g BSB₅/m² d, Temperatur 32,6 °C)

Das mittlere Verhältnis zwischen Zulauf- und Abauffracht plus N-Inkorporation erhöhte sich damit auf 0,98. Nach Berücksichtigung der N-Assimilation verbleibt ein N-Bilanzverlust für die Versuchsanlage von 1,5 %, was auf Messfehler und Denitrifikation zurückgeführt werden kann.

Rechnerisch wurden lediglich 18,4 % der NH₄-Zulauffracht nitrifiziert. Es ist aber zu erwähnen, dass die für den Zweck dieser Arbeit eingesetzte Scheibentauchkörperanlage nicht dafür ausgelegt wurde, eine hohe Nitrifikation zu erzielen.

7.2. Methodenentwicklung zur Bestimmung der Biofilmaktivität

Auf dem Gebiet der Abwasserreinigung wurde die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität hauptsächlich für Fadenbakterien und Belebtschlämme eingesetzt. Im Hinblick auf die Schwierigkeiten mit der Probenentnahme in Biofilmsystemen, wurden Biofilme hauptsächlich vom Trägermaterial abgetrennt, suspendiert und weiter wie ein Belebtschlamm dem Dehydrogenasentest unterzogen. Die so bestimmte Aktivität er-

fasst jedoch nicht die Stoffwechselaktivität des intakten Biofilms und spiegelt nicht die *in situ* Aktivität der Mikroorganismen in der Anlage wider.

Die Aktivitätsbestimmung auf dem Trägermaterial, ohne vorhergehende Abtrennung des Biofilms, hat sich als präziser erwiesen, wurde jedoch noch nicht für Scheibentauchkörperanlagen angewendet.

Die Entwicklung einer analytischen Prozedur zur Bestimmung der Aktivität des Biofilms in Scheibentauchkörpern war daher ein grundlegender Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Folglich wurden in Kapitel 6.2 die experimentellen Bedingungen analysiert, Einflüsse verschiedener Parameter auf die Formazanproduktion bzw. Aktivität untersucht und daraus abgeleitete optimale experimentelle Bedingungen vorgestellt. Die analysierten Einflussgrößen umfassten u.a. die Probenlagerung, die Sauerstoffkonzentration, Inkubationszeit und -temperatur, den pH-Wert, das eingesetzte organische Substrat sowie die TTC-Konzentration, Extraktionslösung, Wellenlänge der Absorptionsmessung und Vorbereitung der Kontrollproben. Es konnte daraus geschlossen werden, dass einige Faktoren das Ergebnis der Dehydrogenasenaktivitätsbestimmung wesentlich beeinflussen.

Außerdem wurde eine optimierte Prozedur entwickelt, deren Parameter an den Biofilm in Scheibentauchkörpern angepasst sind. Die analytische Vorgehensweise, welche die diskutierten Größen berücksichtigt, ist Kapitel 5.4.2 zu entnehmen.

Es ist jedoch zu beachten, dass die im Kapitel 6.2 dargestellten Untersuchungen nicht als eine statistische Analyse, sondern vielmehr als eine qualitative Bestimmung der Einflüsse jedes Parameters auf das Ergebnis des Dehydrogenasentests zu sehen sind. Die hier dargestellten Größen gelten im Grunde nur für das verwendete System, wobei die beobachteten Abhängigkeiten allgemein gültig sind. Die Übertragbarkeit der Methode auf andere Biofilmsysteme ist durch detaillierte Untersuchungen im Einzelfall zu prüfen. Die Parameter müssen vor dem Test entweder ausgehend von der jeweiligen Fragestellung festgelegt (Inkubationstemperatur, pH-Wert, Substratkonzentration und Art der Kontrollprobe) oder im Hinblick auf die verschiedenen Einflussfaktoren für

das verwendete System untersucht werden (u.a. Inkubationszeit, TTC-Konzentration, Extraktionsmittel und Wellenlänge der Absorptionsmessung).

7.2.1. Probenlagerung

Die mit dem Biofilm aus dem Scheibentauchkörper durchgeführten Versuche zeigten, dass die Probenlagerung vor dem Dehydrogenasentest eine Verminderung der Biofilmaktivität bewirkt (siehe Kap. 6.2.1). Es wurde ein 12%iger Aktivitätsverlust nach einer einstündigen Probenlagerung festgestellt. Laut SAATHOFF (1998) liegen Abweichungen bis zu $\pm 10\%$ noch im Toleranzbereich, da der Dehydrogenasentest ein biologisches Verfahren ist, bei dem die Genauigkeit und Reproduzierbarkeit nicht mit chemischen Analysen vergleichbar sein können. Nach eintägiger Lagerung des Biofilms ist jedoch eine Aktivitätsreduktion von 40 % zu erwarten (siehe Abb. 6.3).

BURTON & LANZA (1986) stellten eine Aktivitätsabnahme von ca. 50 % nach einer zwanzigstündigen Lagerung von Sedimentproben fest. Von GRIEBE et al. (1997) wurde ebenfalls ein signifikanter Verlust beobachtet. Sie untersuchten den Einfluss der Probenaufbewahrung auf die Dehydrogenasenaktivität von Belebtschlamm, wobei die Proben bei 20 °C belüftet, bei 20 °C gerührt oder bei 4 °C gekühlt wurden. Unabhängig von der Lagerungsmethode sank die Aktivität während der ersten 60 Minuten schon um ca. 30 %. Es ist zu beachten, dass beispielsweise mit der Sauerstoffzufuhr, die zu einem schnelleren Verbrauch der gespeicherten Nährstoffe führte, eine deutlich höhere Reduktion der Aktivität beim Belebtschlamm verursacht wurde. Fehlende Nährstoffe bewirkten wiederum ein früheres Absterben der Bakterien.

Die Probenlagerung verändert den physiologischen Zustand der Bakterien und hat dadurch einen signifikanten Einfluss auf die Produktion des Formazans. Die Zeitspanne zwischen der Probenahme und der Analyse ist möglichst kurz zu halten. Idealerweise sollten die Proben an den Entnahmestellen inkubiert werden (GRIEBE et al., 1997).

7.2.2. Sauerstoffanwesenheit

Die Stellungnahme verschiedener Autoren zum Sauerstoffeinfluss während der Aktivitätsmessung ist unterschiedlich. FAHMY & WALSH (1952) stellten fest, dass das TTC als Wasserstoffakzeptor nicht vom Sauerstoff beeinflusst wird. Weder BUCKSTEEG & THIELE (1959) noch LE BIHAN & LESSARD (2000) und QING et al. (2006) berührten das Thema des Sauerstoffeinflusses auf die Formazanproduktion. Das Deutsche Einheitsverfahren zur Bestimmung der Toxizität von Abwässern und Abwasserinhaltsstoffen nach der Dehydrogenasenaktivität mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (DEV L3, 1993) berücksichtigt den Sauerstoffeinfluss ebenfalls nicht. In vielen Veröffentlichungen wird wiederum auf die Bedeutung des Sauerstoffausschlusses hingewiesen (KLAPWIJK et al., 1974; RYSSOV-NIELSEN, 1975; BURTON & LANZA, 1986 und YIN et al., 2005). KLAPWIJK et al. (1974) stellten eine deutlich größere Formazanproduktion im anaeroben Medium fest. Zum gleichen Ergebnis kam auch ALTMAN (1972), der den Einfluss des Sauerstoffs auf die Dehydrogenasenaktivität in einer Rattenleber untersucht hatte. Die Aktivität der unter anaeroben Bedingungen inkubierten Probe war deutlich höher als die Aktivität, die in der Anwesenheit von Sauerstoff gemessen wurde. Die Sauerstoffelimination erfolgte durch Verdrängung durch Stickstoff oder Zugabe von Natriumsulfit, wobei letzteres Redoxpotentialveränderungen des Inkubationsmediums verursachen kann (LOPEZ et al., 1986 und BURTON & LANZA, 1986).

TTC hat ein hohes Redoxpotential (+460 mV) sowie eine niedrige Elektronenaffinität und tritt daher mit dem Sauerstoff während der Dehydrogenasenaktivitätsbestimmung in eine Konkurrenz um die Elektronen ein (LOPEZ et al., 1986 und YIN et al., 2005). Da der im Medium vorhandene Sauerstoff als erster verbraucht wird und der Verbrauch des TTC unter maximaler Reaktionsgeschwindigkeit verzögert wird, ist die am Ende der Inkubationszeit produzierte Menge des Formazans bzw. die daraus berechnete Aktivität niedriger als die tatsächliche. Die mit dem Biofilm durchgeführten Versuche zeigten, dass die Formazanproduktionsrate von 0,69 auf 3,04 $\mu\text{g TF/mg TS}\cdot\text{h}$ stieg als die Anaerobiose erreicht wurde (siehe Kap. 6.2.2, Abb. 6.4). Den analogen Verlauf der Formazanproduktion stellten RICH et al. (2001) bei der Untersuchung der aerob respirierenden Mitochondrien von Erbsenblättern dar. Die auf die Proteinkonzentration bezogene Bildungsrate stieg nach dem Erreichen anaerober Bedingungen von 0,4 nmol Formazan/min auf 22 nmol Formazan/min an.

Die Produktion des Formazans wird vom gelösten Sauerstoff stark negativ beeinflusst (Abb. 6.5). Trotz der verschiedenen Ansichten in der Literatur zum Sauerstoffeinfluss, sollte die Messung der Dehydrogenasenaktivität in einem sauerstofffreien Medium erfolgen. Der gelöste Sauerstoff muss vor der Messung aus dem Medium verdrängt werden, was durch die Zufuhr von Stickstoff erreicht werden kann. Ein Eindringen von Luftsauerstoff während der Messung ist zu verhindern. Zufriedenstellende Ergebnisse wurden hier durch volle und dicht verschlossene Reagenzgläser erzielt.

7.2.3. Inkubationstemperatur

Die Aktivität der Dehydrogenasen wird stark von Temperaturveränderungen beeinflusst (LEMMER et al., 1996 und BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK, 2005). In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen nahm die Aktivität des Biofilms von 54,2 $\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ bei 24,7 °C auf 75,0 $\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ bei 32,6 °C zu (siehe Kap. 6.2.3, Abb. 6.6). Der Q_{10} -Wert, der Faktor, um den sich die Aktivität erhöht bei der Steigerung der Temperatur um 10 Grad Celsius, betrug 1,8.

STENELAIRE et al. (2001) untersuchten den Einfluss der Temperatur auf die Dehydrogenasenaktivität. Um die optimale Inkubationstemperatur von Pilzsporen zu bestimmen, wurde die Aktivitätsmessung bei 20, 25, 30, 40, 50, 60 und 70 °C durchgeführt. Die Erhöhung der Temperatur von 25 °C auf 50 °C ergab eine 12,5-fache Aktivitätssteigerung. Letztere galt als optimale Temperatur und wurde für weitere Versuche verwendet. Ein weiteres Beispiel berichten KLAPWIJK et al. (1974). Sie stellten eine lineare Abhängigkeit ($R^2 = 0,982$) zwischen den bei 20 °C und 37 °C bestimmten Aktivitäten fest und arbeiteten im Hinblick auf die höhere Formazanproduktion für die weiteren Untersuchungen des Belebtschlammes bei einer Temperatur von 37 °C. BENSALD et al. (2000) betrieben einen Chemostat-Bioreaktor bei $25 \pm 0,5$ °C, maßen aber die Aktivität der Schlammproben bei 37 °C. Ganz ähnlich gingen LE BIHAN & LESSARD (2000) vor, indem sie einen Biofilter im industriellen Maßstab mit Abwasser aus dem Ablauf des Vorklärbeckens beschickten. Die durchschnittliche Temperatur des Abwassers betrug 12 °C, während die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität bei 30 °C erfolgte.

Im Gegensatz zu den oben erwähnten Prozeduren, die hinsichtlich der Enzymaktivitätsbestimmung unter optimaler Temperatur stattfanden, untersuchten POSCH et al. (1997) den physiologischen Zustand planktonischer Bakterien aus einem Bergsee bei der *in situ* Temperatur (2 °C). Auch ROMANÍ & SABATER (2001) führten die Dehydrogenasenaktivitätsmessungen *in situ* in einem Fluss bei jahreszeitlich verschiedenen Temperaturen durch.

Eine Erhöhung der Temperatur im physiologischen Bereich bewirkt eine Beschleunigung von enzymatischen Reaktionen und führt dadurch im Fall des Dehydrogenasentests zu einer größeren Formazanproduktion. Aufgrund der Zielsetzung der Arbeit ist eine solche analytische Optimierung jedoch zu vermeiden. Die unter höheren Temperaturen gemessenen Aktivitätswerte lassen keine Aussage über die tatsächliche Rate der Stoffumsätze, die in den *in situ* Bedingungen ablaufen (ALEF, 1991 und LEMMER et al., 1996). In dieser Arbeit entsprach die Inkubationstemperatur der Proben den Wachstumsbedingungen des Biofilms.

7.2.4. pH-Wert

In dem in dieser Arbeit untersuchten Bereich nahm die Aktivität der Dehydrogenasen von $45,4 \pm 2,8$ bei einem pH-Wert von 6,2 auf $92,3 \pm 5,0$ $\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ bei pH = 8,0 zu (siehe Kap. 6.2.4, Abb. 6.7).

Jedes Enzym hat sein spezielles pH-Optimum, bei dem es die höchste Aktivität hat. Laut LOPEZ et al. (1986) liegt das pH-Optimum für die Dehydrogenase bei pH 9,0. GAJDŮŠEK et al. (1974) erreichten wiederum das Aktivitätsmaximum bei pH 10,0 (Abb. 7.2).

Obwohl eine höhere Formazanproduktion bei pH-Werten von 8,0 - 10,0 zu erwarten ist, sollte eine solche analytische Optimierung aus mehreren Gründen vermieden werden. Erstens ist eine abiotische Entstehung des Triphenylformazans bei einem höheren pH-Wert möglich (LENHARD, 1968). Reduzierende Zucker (u.a. Glukose) können unter alkalischen Bedingungen das TTC zu Formazan reduzieren (RYSOV-NIELSEN, 1975). Zweitens befinden sich die Bakterien in Abwasserreinigungssystemen in einem Milieu mit pH 7,0 bis 8,0. Der Dehydrogenasentest ist ein biologischer Test, der *in situ*

Bedingungen widerspiegeln sollte. Daher ist ein neutrales Medium am geeignetsten für die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität (BLENKINSOPP & LOCK, 1990 und BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK, 2005).

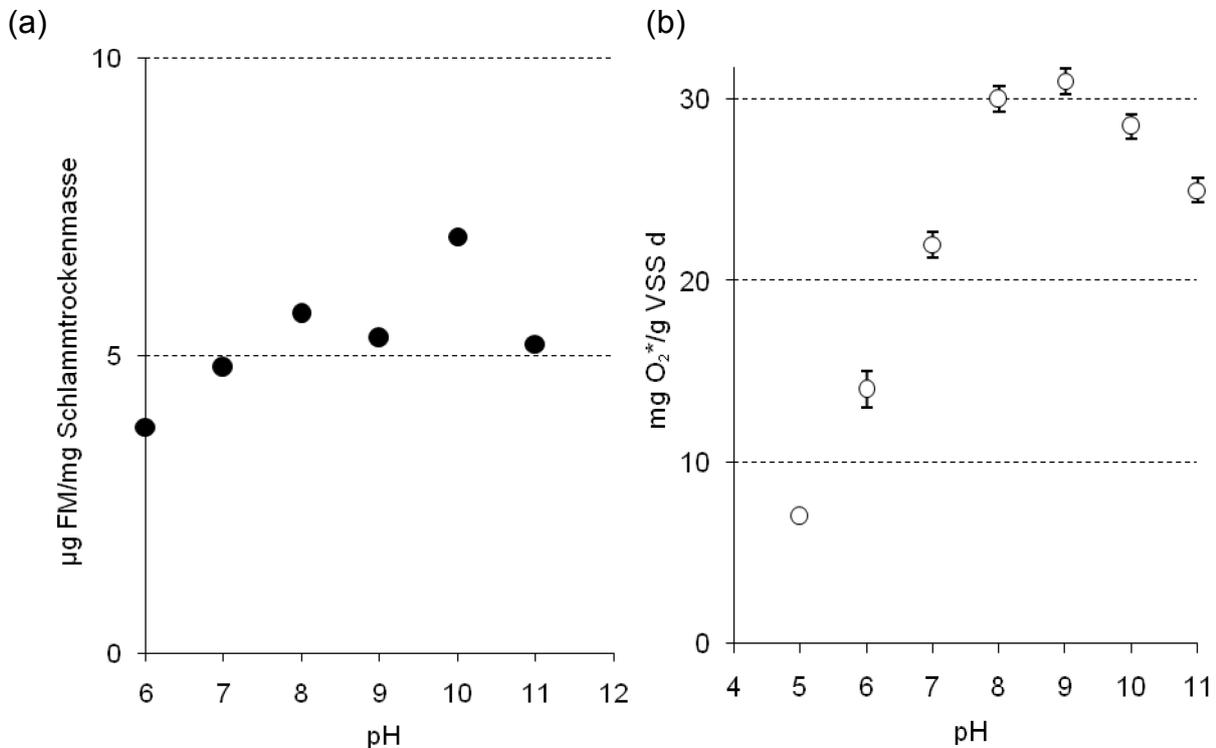


Abb. 7.2: Dehydrogenasenaktivität in Abhängigkeit vom pH-Wert (a) nach GAJDŮŠEK et al. (1974), (b) nach LOPEZ et al. (1986)

Dies wurde auch durch die Prozeduren verschiedener Autoren, die die Aktivität bei den zirkumneutralen pH-Werten bestimmten, bekräftigt (Tab. 7.2).

Tab. 7.2: Beispiele zu pH-Werten bei der Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität

pH-Wert	Substrat	Puffer	Tetrazoliumsalz	Literaturquelle
8,0	keines	n. b.	MTT	STENELAIRE et al. (2001)
7,6	Abwasser	0,1 M HCl o. 0,1 M NaOH	INT	LOPEZ et al. (1985)
7,6	Glukoselösung	Tris-HCl	TTC	QING et al. (2006)
7,5	keines	0,06 M Kaliumphosphat	XTT	BENSAID et al. (2000)
7,5	keines	1 % Phosphat	TTC	RYSSOV-NIELSEN (1975)
7,0	keines	10 % HCl o. 10 % NaOH	TTC	GAJDŮŠEK et al. (1974)
7,0	keines	1,0 M Tris	INT	COLE et al. (2004)

Alle Versuche in dieser Arbeit wurden bei einem pH-Wert von ca. 7,6 durchgeführt.

7.2.5. Organisches Substrat

Sowohl GAJDŮŠEK et al. (1974) als auch GRIEBE et al. (1997) bestimmten die Aktivität des Belebtschlammes ohne Zufuhr von Nährstoffen während der Inkubation. LOPEZ et al. (1986) wendeten den INT-Dehydrogenasentest zur Kontrolle des Belebtschlammprozesses an und setzten wiederum während der Aktivitätsmessung das Abwasser, an das der Belebtschlamm adaptiert war, als Substrat ein. Auch ROMANÍ & SABATER (2001), die die Aktivität eines Flussbiofilms untersuchten, inkubierten die Proben im Flusswasser, um die *in situ* Bedingungen zu simulieren. Demgegenüber bestimmten QING et al. (2006) die Aktivität eines Biofilms aus einem mit Textilabwasser beschickten Aktivkohlefilter, allerdings mit 0,1 M Glukoselösung als Elektronendonator. KLAPWIJK et al. (1974) führten die Aktivitätsmessung eines Belebtschlammes mit verschiedenen Substraten wie Natriumacetat, Calciumlaktat, Glukose und „gemischtem Substrat“ (organische Komponenten wie Harnstoff, Gelatine, lösliche Stärke, Magermilchpulver und Toilettenpapier) durch.

In dieser Arbeit wurden zwei Substrate eingesetzt und die in ihrer Gegenwart gemessene Aktivität verglichen. Es stellte sich heraus, dass der mit der Glukoselösung inkubierte Biofilm eine niedrigere Aktivität aufwies ($31,8 \pm 2,1 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$). Die mit synthetischem Abwasser bestimmte Aktivität betrug $51,4 \pm 2,4 \mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$ (siehe Kap. 6.2.5, Abb. 6.8).

Der Einsatz eines organischen Substrats als Elektronendonator bei der Messung der Dehydrogenasenaktivität auf dem Abwassergebiet hängt generell von der jeweiligen Fragestellung ab. Bei der qualitativen Ermittlung der biochemischen Abbaubarkeit können verschiedene Prüfsubstanzen als Substrat angewendet werden. Bei der Bewertung der mikrobiellen Aktivität wird in Abwesenheit des organischen Substrats die endogene Aktivität der Biomasse gemessen, welche nicht mit der Aktivität in Belebungsbecken oder Biofilmreaktoren verglichen werden kann (KLAPWIJK et al., 1974). Eine zusätzliche Kohlenstoffquelle erhöht die Aktivität der Dehydrogenasen, kann aber gleichzeitig eine bestimmte Mikroorganismengruppe anregen (ALEF, 1991 und BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK, 2005), so dass die spezifische anstatt der realen Aktivität gemessen wird. Bei einer hohen Laktatkonzentration wird in Wirklichkeit die Laktatdehydrogenasenaktivität und nicht die gesamte Dehydrogenasenaktivität bestimmt.

Für die Substrate wie Albumin, Cellulose oder Palmitinsäure-Triglycerid (Tripalmitin) müssen die extrazellulären hydrolytischen Enzyme vorliegen bevor sie oxidiert werden können (RYSSOV-NIELSEN, 1975). Oft wurden Glukose oder ein Hefe-Extrakt als Elektronendonator eingesetzt. Der Zusatz einer beliebigen Prüfsubstanz als Substrat ermöglicht die Messung einer „potenziellen“ Aktivität (ALEF, 1991). Um die *in situ* oder laut ALEF (1991) „aktuelle“ Aktivität zu messen, sollte das zugegebene Substrat ein Substrat sein, in dessen Gegenwart die Mikroorganismen wachsen und an das sie adaptiert sind. Der Grund für diese Voraussetzung wird besonders klar, wenn man berücksichtigt, dass die Belebtschlammbecken und Biofilmanlagen mit Abwässern beschickt werden, von denen einzelne Inhaltstoffe zur Entwicklung von Monokulturen und Anpassungsreaktionen führen können (BUCKSTEEG & THIELE, 1959).

Demzufolge wurde zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität des Biofilms in dieser Arbeit ebenso wie zur kontinuierlichen Versorgung der Versuchsanlage ein synthetisches Abwasser (siehe Kap. 5.1.2) eingesetzt.

7.2.6. Konzentration des Tetrazoliumsalzes

Gemäß der Michaelis-Menten-Theorie wird die Reaktionsgeschwindigkeit der Formazanproduktion durch die TTC-Konzentration beeinflusst. Die erforderliche Sättigung eines Enzyms, welche eine maximale Reaktionsgeschwindigkeit gewährleistet, verlangt eine entsprechend hohe Konzentration. Eine zu hohe Konzentration des Tetrazoliumsalzes kann wiederum selbstregulierend in den enzymatischen Ablauf eingreifen (allosterische Hemmung) oder aufgrund der intrazellulären Akkumulation der Formazankristalle eine toxische Wirkung auf die Mikroorganismen hervorrufen (BLENKINSOPP & LOCK, 1990 und McCLUSKEY et al., 2005).

Abhängig von der Prozedur zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität beträgt die eingesetzte Konzentration des TTC 1 g/L (RYSSOV-NIELSEN, 1975), 5 g/L (BUCKSTEEG & THIELE, 1959; DEVL3, 1993 und QING et al., 2006) oder 10 g/L (LENHARD, 1968).

Da die Tetrazoliumsalzkonzentration laut STENTELAIRE et al. (2001) kein limitierender Faktor für die Dehydrogenasenaktivitätsbestimmung sein soll, muss sie bei der Messung mehr als dem zehnfachen K_m -Wert ($10 K_m$) entsprechen. In dieser Arbeit betrug

dieser Wert $10 K_m = 0,97 \text{ g/L}$ für eine Inkubationstemperatur von $32,6 \text{ }^\circ\text{C}$. Daher konnte eine TTC-Konzentration von 1 g/L für die weiteren Untersuchungen angenommen werden (siehe Kap. 6.2.6, Abb. 6.9). Die Michaeliskonstante K_m ist jedoch eine Kombination der temperaturabhängigen Geschwindigkeitskonstanten (k_1 , k_{-1} , k_2) und ist somit selbst temperaturabhängig. Es wurde deshalb untersucht, wie sich die optimale TTC-Konzentration mit der Temperatur ändert und ob die bei $32,6 \text{ }^\circ\text{C}$ als optimal bezeichnete Konzentration bei niedrigeren Temperaturen nicht limitierend auf die Reaktionsgeschwindigkeit wirkt. Der zehnfache K_m -Wert ($10 K_m$) bei $24,7 \text{ }^\circ\text{C}$ betrug $4,41 \text{ g/L}$ und es wurde keine Hemmung der Aktivität im untersuchten TTC-Konzentrationsbereich von $0,747 \text{ mM}$ ($1 - 10 \text{ g/L}$) festgestellt (siehe Abb. 6.10). LENHARD (1968) konnte sogar bei bis zu $4,5 \text{ mM}$ dosiertem TTC keine Hemmung des Belebtschlamm beobachtet. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurde eine TTC-Konzentration von 5 g/L gewählt und bei allen Temperaturen eingesetzt. So konnten die gleichen Bedingungen eingestellt und die verschiedenen Aktivitäten miteinander verglichen werden.

Ganz ähnlich gingen STENELAIRE et al. (2001) bei der Optimierung der MTT-Konzentration²⁰ für die Bestimmung der Aktivität von Pilzsporen vor. Die Suspensionen, die 10^9 bis $3 \cdot 10^9$ Sporen/mL enthielten, wurden bei $25 \text{ }^\circ\text{C}$ mit verschiedenen MTT-Konzentrationen (0 bis $0,5 \text{ g/L}$) inkubiert. Der ermittelte zehnfache K_m -Wert betrug 7 g/L MTT und wurde in den weiteren Messungen der Aktivität eingesetzt.

7.2.7. Inkubationszeit

Die Inkubationszeit der Proben bei der Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität beträgt, abhängig von der Prozedur, wenige Minuten bis zu einigen Stunden. LOPEZ et al. (1986) empfahlen eine zwanzigminütige Inkubation des Belebtschlamm, welche von LIU & TAY (2001) bei der Bestimmung der Aktivität des Biofilms aus einem Ringscheibenreaktor ebenso eingehalten wurde. QING et al. (2006) wiederum inkubierten die Biofilmproben aus einem Aktivkohlefilter 24 Stunden. Die durchschnittliche Inkubati-

²⁰ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid

onszeit beträgt 1 bis 3 Stunden (BUCKSTEEG & THIELE, 1959; BURTON & LANZA, 1986; LE BIHAN & LESSARD, 2000 und COLE et al., 2004).

In der Regel kann mit einer höheren mikrobiellen Besiedlungsdichte und einer damit höheren Enzymkonzentration die notwendige Inkubationszeit verkürzt werden (OBST, 1999). LE BIHAN (2007) reduzierte die Inkubationszeit von 5 Stunden für Mikroorganismen aus einem Biodesodorierungsprozess auf 1 Stunde für den Biofilm aus einem Biofilter zur biologischen Abwasserreinigung. Unter schlechten Wachstumsbedingungen oder niedrigen Inkubationstemperaturen sollte dagegen die Inkubationszeit der Proben gesteigert werden, bis die nachweisbare Menge an Formazan produziert wird (BLENKINSOPP & LOCK, 1990). Demzufolge ist eine dem Dehydrogenasentest vorhergehende Festlegung der optimalen Inkubationszeit erforderlich.

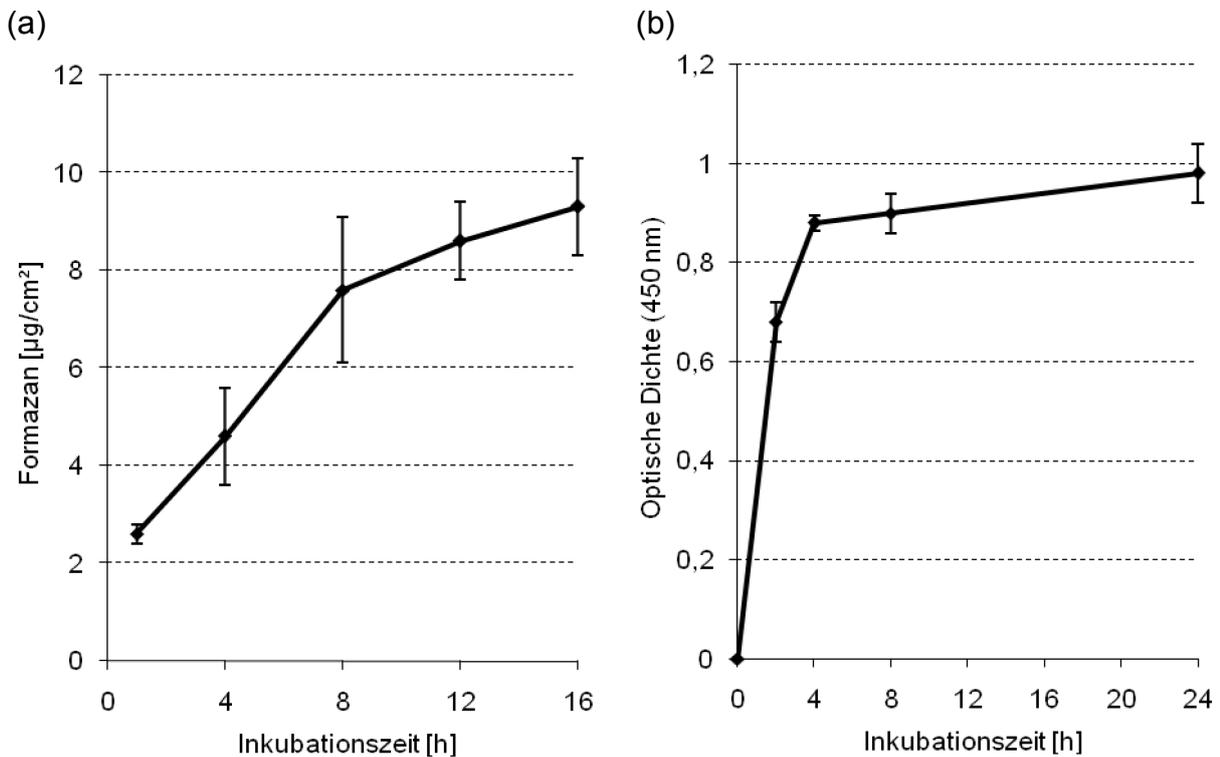


Abb. 7.3: Einfluss der Inkubationszeit auf die Dehydrogenasenaktivität (a) eines Flussbiofilms (BLENKINSOPP & LOCK, 1990) und (b) eines Belebtschlammes (GRIEBE et al., 1997)

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Zeitraum verlief die Formazanproduktion asymptotisch (siehe Kap. 6.2.7, Abb. 6.11).

Ein asymptotischer Kurvenverlauf wurde auch von anderen Autoren beobachtet. BLENKINSOPP & LOCK (1990) untersuchten den Einfluss der Inkubationsdauer von 1 bis

16 Stunden auf die Aktivität eines Biofilms und stellten einen asymptotischen Verlauf der INT-Formazanproduktion²¹ fest. Zu den gleichen Ergebnissen kamen GRIEBE et al. (1997), die das CTC²² zur Ermittlung der mikrobiellen Aktivität eines Belebtschlammes verwendeten und die Menge des produzierten Formazans nach 2, 4, 8 und 24 Stunden bestimmten (Abb. 7.3).

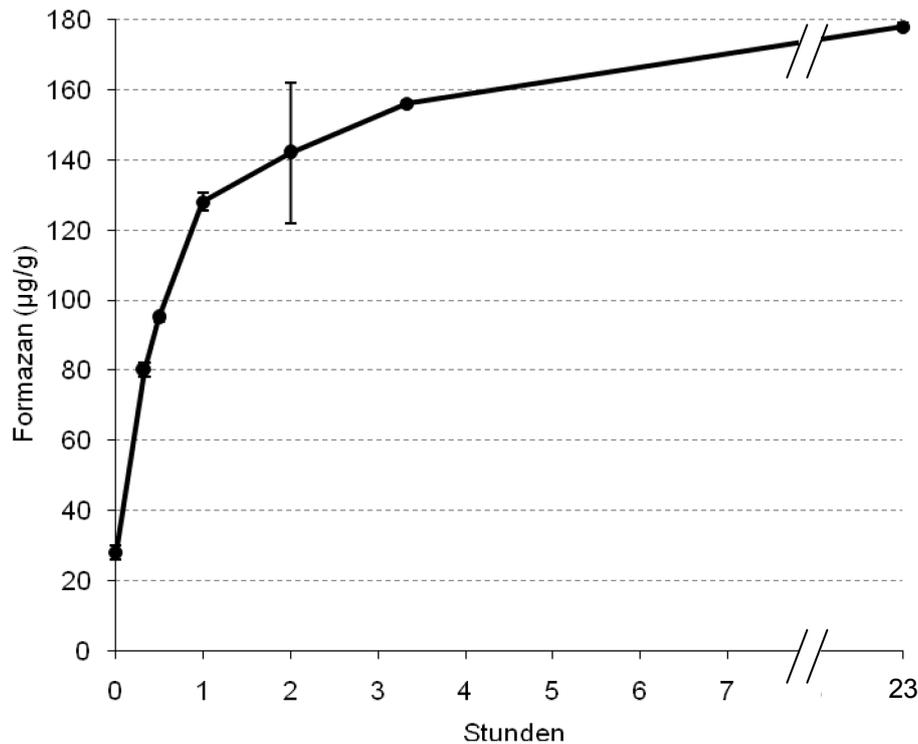


Abb. 7.4: Verhältnis der Formazanproduktion zur Inkubationszeit in Sedimenten aus dem Lavon See (BURTON & LANZA, 1986)

Es ist zu berücksichtigen, dass sowohl BLENKINSOPP & LOCK (1990) als auch GRIEBE et al. (1997) andere Tetrazoliumsalze und Biomassemengen einsetzten. Außerdem wurden die Proben bei niedrigeren (10 und 20 °C) Temperaturen inkubiert. Die angeführten Abhängigkeiten sind also nur für die von ihnen beschriebenen Systeme zutreffend. Die ermittelten Ergebnisse zeigen jedoch das Ausmaß des Einflusses und den Verlauf der Kurve bei längeren Reaktionszeiten. Die Formazanbildung bei Reaktionszeiten von weniger als 4 Stunden wurde eingehend von BURTON & LANZA (1986) untersucht (Abb. 7.4).

²¹ 2-(*p*-Iodophenyl)-3-(*p*-nitrophenyl)-5-phenyltetrazoliumchlorid

²² 5-Cyano-2,3-di-4-tolyltetrazoliumchlorid

In Abbildung 7.4 ist ein nahezu linearer Verlauf der Kurve innerhalb der ersten Stunde zu erkennen. Da die Annäherung der Kurve an den maximalen Aktivitätswert schon in der zweiten Stunde erfolgt, wurde die einstündige Inkubation für weitere Versuche von den Autoren übernommen.

BLINKINSOPP & LOCK (1990) nahmen die achtstündige Inkubation als optimal an und setzten sie in weiteren Versuchen ein. Die gemessene Aktivität wurde dann in μg Formazan, das durch ein cm^2 Biofilm pro Stunde produziert wird ($\mu\text{g INT-F/cm}^2\cdot\text{h}$), ausgedrückt. Die Formazanproduktionskurve verlief jedoch innerhalb der ersten 8 Stunden nicht linear. GRIEBE et al. (1997) inkubierten die Proben zwei Stunden. Da keine Messung der Formazanproduktion nach weniger als einer Stunde erfolgte (Abb. 7.4) und damit eigentlich kein linearer Verlauf in den ersten zwei Stunden angenommen werden konnte, drückten sie das Ergebnis in g Formazan, das durch ein mg Biofilm während 2h produziert wird (g/mg TS), aus.

Laut BURTON & LANZA (1986) sollte die Inkubationsdauer in einem akzeptablen Minimum gehalten werden, wobei Extinktionswerte des entstandenen Formazans unter 0,2 vermieden werden sollten (RYSSOV-NIELSEN, 1975). Während einer langen Inkubation sind die zerstörten Zellen eine leicht zugängliche Kohlenstoff- und Stickstoffquelle für die lebenden Zellen. Das in diesem Fall mögliche Zellwachstum kann die Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft beeinflussen, wobei die Wahrscheinlichkeit für zahlreiche Veränderungen der Aktivität mit der Zeit steigt (MAIER et al., 2000 und BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK, 2005).

Die in diese Arbeit beschriebenen Versuche zur Abschätzung der optimalen Dauer der Inkubation wurden mit geringeren Biofilmmengen durchgeführt um festzustellen, ob die produzierte Formazanmenge nachweisbar ist. Eine einstündige Inkubation ergab kleine Extinktionswerte. Dementsprechend wurde die Inkubation von 2 Stunden als optimal für die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität im Biofilm angesehen und wurde in allen Versuchen eingehalten, so dass die gemessenen Aktivitäten miteinander verglichen werden können. Das extrahierte Formazan mit Extinktionswerten über 1,0 wurde entsprechend mit Ethanol verdünnt. Die Aktivität wurde in μg Formazan, das durch ein mg Biofilm während 2 Stunden gebildet wurde, ausgedrückt ($\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$).

7.2.8. Extraktion

Für jede Extraktionsaufgabe sollte ein geeignetes Extraktionsmittel verwendet werden. Dies kann mithilfe von Nachschlagewerken oder mittels Versuchen erfolgen.

In der Literatur wurden verschiedene organische Extraktionsmittel des innerhalb der Zellen akkumulierten 1,3,5-Triphenylformazans beschrieben. Die am häufigsten eingesetzten Extraktionsmittel sind u.a. Ethanol (RYSOV-NIELSEN, 1975; BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK, 2005 und DEV L3, 1993), Methanol (KLAPWIJK et al., 1974 und BURTON & LANZA, 1986), Propanol (BURTON & LANZA, 1986), n-Butanol (KLAPWIJK et al., 1974 und PN-82/C-04616.08, 1983), Toluol (QING et al., 2006), Aceton (ALEF, 1991) und Tetrachloroethylen-Aceton (2:3) (BURTON & LANZA, 1986).

Obwohl BURTON & LANZA (1986), die die Extraktionseffizienz von Propanol, Ethanol, Tetrachloroethylen-Aceton (2:3) und Methanol verglichen, das Ethanol erst an dritter Stelle hinsichtlich der Extraktionsleistung nannten, wurde in dieser Arbeit, ausgehend vom Deutschen Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV L3, 1993), Ethanol als Extraktionsmittel verwendet. Um eine bessere Extraktionsleistung zu erhalten, wurde allerdings die Konzentration von 70 auf 99 % erhöht. Der Extraktionsprozess wurde zusätzlich um die Ultraschall-desintegration erweitert, was die Polysaccharidmatrix zerstörte und somit einen einfacheren Zugang für das Extraktionsmittel ermöglichte. Nach der Durchführung der Extraktionsprozedur und der zusätzlichen Überprüfung der Zellpellets auf den Rückstand des nachweisbaren Formazans wurde Ethanol als gut verwendbar definiert. Diese Feststellung steht im Gegensatz zu KLAPWIJK et al. (1974), die die Formazanextraktion mit Ethanol durchführten und dies als misslungen bezeichneten. Die Zellen des von ihnen untersuchten Belebtschlammes blieben gefärbt, was in diesem Fall durch eine zu geringe Ethanolkonzentration im Verhältnis zur eingesetzten Biomasse verursacht werden konnte.

Die Dauer der Formazanextraktion variiert in der Literatur von 15 Minuten (RYSOV-NIELSEN, 1975) bis 2 Stunden (ALEF, 1991), was von der Extraktionslösung, der Biomassemenge und der Temperatur abhängig ist. Eine Erhöhung der Temperatur steigert die Extraktionsleistung und verkürzt damit die erforderliche Extraktionszeit.

Es wurde festgestellt, dass bei Proben mit geringerem Bewuchs oder mit niedriger mikrobieller Aktivität das rote Formazan schon mit 10 - 20 mL 99%igem Ethanol bei 35 °C innerhalb von 15 Minuten (gefolgt von der Ultraschall-desintegration) extrahiert werden konnte. Andernfalls musste nach der Zentrifugierung die überstehende formazanhaltige Lösung abgegossen, Ethanol nochmals zugegeben und die Extraktion (teilweise nur durch kräftiges Schütteln) bis zur vollständigen Entfärbung der Biomasse wiederholt werden. Die Menge des zur Extraktion eingesetzten Ethanols wurde dann bei der Berechnung der Dehydrogenasenaktivität berücksichtigt.

Die Messung der Stabilität des Formazans im Ethanol (siehe Kap. 6.2.8, Tab. 6.6) zeigte stabile Rotfärbung im untersuchten Zeitraum. Demzufolge können die extrahierten Formazanproben bis zu 48 Stunden ohne wesentlichen Einfluss auf die Extinktionswerte aufbewahrt werden. Zu einem ähnlichen Schluss kamen auch STENTELAIRE et al. (2001), die die Stabilität des MTT-Formazans im Propan-2-ol untersucht hatten und feststellten, dass die blaurote Färbung über Nacht (930 Minuten) stabil blieb.

7.2.9. Extinktionskoeffizient

Anhand der verwendeten Konzentrationen des Triphenylformazans und ihren Extinktionswerten wurde in dieser Arbeit ein molarer Extinktionskoeffizient ϵ_{484} von $1,20 \cdot 10^4$ L/mol·cm berechnet (siehe Kap. 6.2.9). Er unterscheidet sich von den in der Literatur angegebenen Werten (Tab. 7.3), was sich daraus ergibt, dass der Extinktionskoeffizient einer Verbindung von der Lösungsmittelbeschaffenheit, pH, Temperatur und Wellenlänge der Absorptionsmessung abhängt (DENNEY, 1982).

Tab. 7.3: Unterschiedliche Extinktionskoeffizienten des 1,3,5-Triphenylformazans

ϵ [L/mol·cm]	Wellenlänge der Absorptionsmessung [nm]	Lösungsmittel	Literaturquelle
$1,60 \cdot 10^4$ *	480	Ethanol 70 %	DEV L3 (1993)
$1,43 \cdot 10^4$	485	DMF**	ALTMAN (1972)
$1,41 \cdot 10^4$	485	Ethanol 70 %	BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK (2005)
$1,20 \cdot 10^4$	484	Ethanol 99 %	diese Arbeit

* Berechnet aus der angegebenen Formel zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität

** N,N-Dimethylformamid

7.2.10. Vorbereitung der Kontrollproben

Da das TTC chemisch reduziert werden kann, dienen die Kontrollproben bei der Messung der Formazanproduktion zum Ausschluss von Störeinflüssen auf die experimentellen Ergebnisse (BRZEZIŃSKA & WŁODARCZYK, 2005). Die auf diese Weise bestimmte Hintergrundabsorption der Probe, also der Anteil der Absorption, der nicht durch die lebenden Mikroorganismen verursacht ist, wurde anschließend von der Absorption der aktiven Biofilmprobe subtrahiert.

Sowohl BUCKSTEEG & THIELE (1959) als auch RYSSOV-NIELSEN (1975) inkubierten parallel Schlammproben ohne und mit TTC-Zusatz. Die Proben ohne TTC fungierten als Kontrolle bei der photometrischen Bestimmung des Formazans. BENSaid et al. (2000) verwendeten dagegen eine zellfreie Probe als Kontrolle. KLAPWIJK et al. (1974) inkubierten wiederum zwei Proben: eine Kontrolle für kurze Zeit ($t = 5 - 10$ min) und eine Probe für $t + 30$ Minuten. Die Differenz der zwei ermittelten Aktivitätswerte ergab die Formazanproduktion während der 30 Minuten.

Es ist zu beachten, dass keines der oben genannten Verfahren die chemische Reduktion des TTC nachwies, die eigentlich mit der nicht aktiven Biomasse untersucht werden sollte. Aus der Literatur sind verschiedene Prozeduren der Inaktivierung von Proben bekannt. LOPEZ et al. (1986) führten die gesamte Prozedur des Dehydrogenasentests mit autoklavierten Belebtschlammproben durch. ROMANÍ & SABATER (2001) inkubierten die Proben vor der Messung der Aktivität 30 Minuten in Formalin, GRIEBE et al. (1997) und BLENKINSOPP & LOCK (1990) hingegen in 2%igem Formaldehyd.

In dieser Arbeit wurde die Inaktivierungswirkung des Formalins und 2%igen Formaldehyd verglichen (siehe Kap. 6.2.10). Die Versuchsergebnisse zeigten, dass Formaldehyd eine effektivere Inaktivierungswirkung aufweist (siehe Abb. 6.12). Die Mikroorganismen waren unfähig das TTC zu reduzieren, daher sollte Formaldehyd zur Aufbereitung der Kontrollproben verwendet werden. Der gemessene Extinktionswert (Kontrollprobe 2) blieb nach zweistündiger Inkubation unverändert und betrug 0,07, was eine Folge der abiotischen Reduktion des TTC oder der trotz Zentrifugierung in der Suspension gebliebenen Zellteilchen sein könnte.

Es hat sich außerdem herausgestellt, dass die Extinktionen der Kontrollproben proportional zum Trockengewicht des Biofilms sind (siehe Abb. 6.13), was eine jeweils erneute Vorbereitung der Kontrollproben und Bestimmung der Hintergrundsabsorption erspart.

Die photometrisch bestimmte Absorption der Kontrollprobe wurde anschließend als Blindwert vom Wert der aktiven Biofilmprobe subtrahiert.

7.2.11. Berechnung der Dehydrogenasenaktivität

Die Endformel zur Berechnung der Dehydrogenasenaktivität nach Berücksichtigung der Extinktionskoeffizienten und Inkubationszeit lautet (Gl. 7.1 und Gl. 7.2):

$$TTC - DHA = \frac{25,18 \cdot E_{484} \cdot \nu}{TS} \quad [\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}] \quad (7.1)$$

oder

$$TTC - DHA = \frac{0,0013 \cdot E_{484} \cdot \nu}{TS} \quad [\text{mg O}_2^*/\text{mg TS}_{2\text{h}}] \quad (7.2)$$

7.3. Vergleich der konventionellen und der modifizierten Methode

Der Biofilm wurde zu einem Teil auf den Aufwuchsplättchen ohne die vorhergehende Abtrennung des Biofilms inkubiert (siehe Kap. 5.4.2), zum anderen Teil, wie in der Literatur beschrieben, vom Trägermaterial abgetrennt, suspendiert und wie ein Belebtschlamm betrachtet (siehe Kap. 5.4.1). Die Parameter der konventionellen Methode wie u.a. Inkubationszeit und -temperatur wurden allerdings aus der modifizierten Methode übernommen, um die mit beiden Methoden bestimmten Aktivitäten miteinander vergleichen zu können. Es stellte sich heraus, dass die Abtrennung und Suspendierung des Biofilms zu einer signifikanten Abnahme der Dehydrogenasenaktivität führten (siehe Kap. 6.3).

Unterschiede zwischen den Aktivitäten des intakten und des abgelösten Biofilms wurden ebenfalls von QING et al. (2006) im Aktivkohlefilter beobachtet (Abb. 7.5). Sie entnahmen die Biofilmproben aus verschiedenen Reaktorhöhen (0,25; 0,45; 0,65; 0,85 m) und bestimmten die Aktivitäten mit zwei als Konventionelle und Modifizierte bezeichnete Methoden. Bei der konventionellen Messung wurde der Biofilm vor der Inkubation von der Aktivkohle abgetrennt. Dies erfolgte durch ein 10-minütiges Schütteln des Aktivkohlegranulats mit Glasperlen in destilliertem Wasser. Die so entstandene Suspension wurde zentrifugiert und das Pellet für die anschließende Inkubation mit TTC und Substrat verwendet. Bei der modifizierten Methode wurde das mit dem Biofilm bewachsene Aktivkohlegranulat direkt inkubiert. Die Mittelwerte der Dehydrogenasenaktivität, gemessen mit der modifizierten Methode, waren 25 bis 193 Mal höher als die mit der konventionellen Methode erhaltenen Aktivitätswerte.

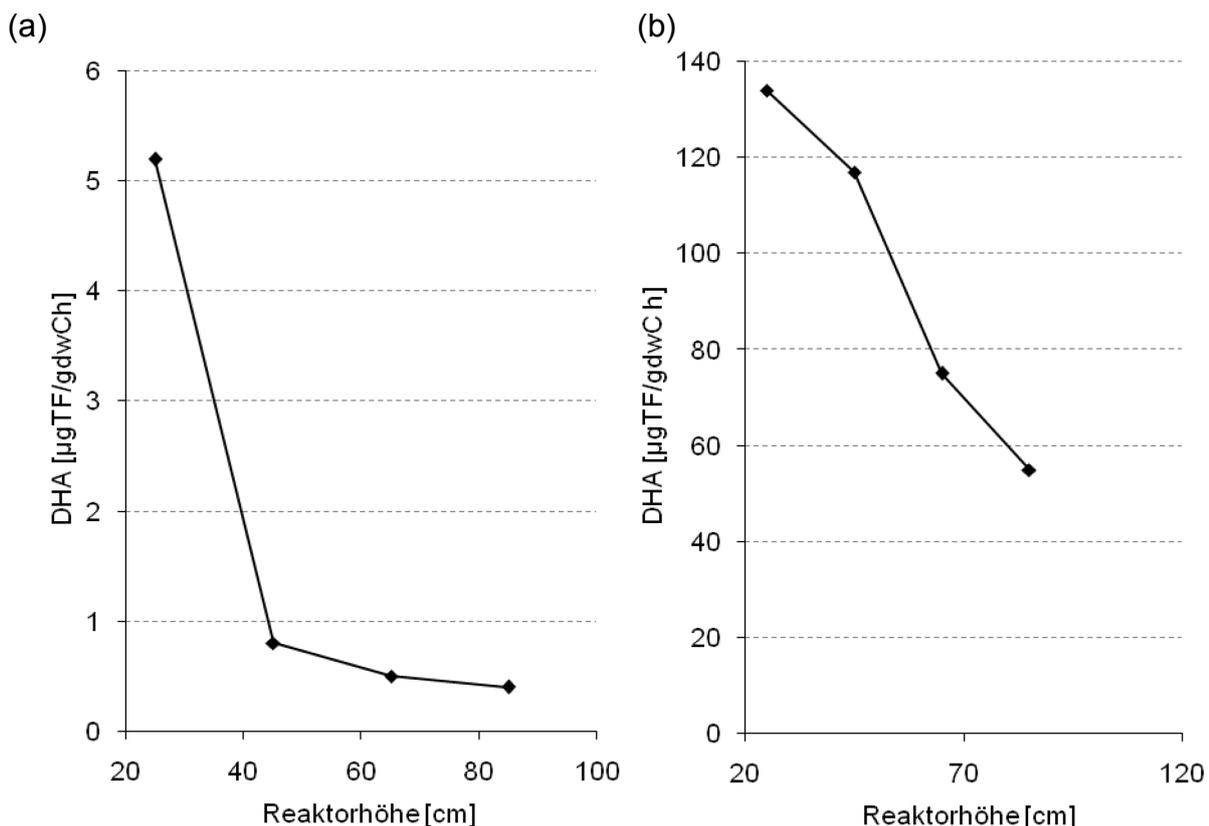


Abb. 7.5: Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität mit verschiedenen Untersuchungsmethoden: (a) der konventionellen und (b) der modifizierten Methode (QING et al., 2006)

Dies deutet darauf hin, dass die Ablösung des Biofilms von der Aufwuchsfläche und seine Suspendierung sehr wichtige Einflussgrößen der mikrobiellen Aktivität des Bio-

films darstellen. Während der Suspendierung des Biofilms wird die Biofilmstruktur zerstört. Es erfolgt vermutlich der Zellaufschluß und die Aktivität geht verloren.

Die Bestimmung der Aktivität eines suspendierten Biofilms erfasst zudem nicht die Aktivität eines Biofilms in der Form, wie er in einem Scheibentauchkörper zu finden ist. Daher ist unumstritten, dass die Bestimmung der Aktivität eines Biofilms auf seiner Aufwuchsfläche erfolgen sollte.

7.4. Überprüfung der modifizierten Methode

In der Literatur wird oft auf die hohe Übereinstimmung zwischen dem Sauerstoffverbrauch und der Dehydrogenasenaktivität hingewiesen. Eine Korrelation mit dem Sauerstoffverbrauch ist daher ein grundlegendes Kriterium für die Aussagekraft des Tests zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität (McCLUSKEY et al., 2005). Aus diesem Grunde wurde in dieser Arbeit die Atmungsaktivität gemessen und mit der Dehydrogenasenaktivität des Biofilms verglichen (siehe Kap. 6.4).

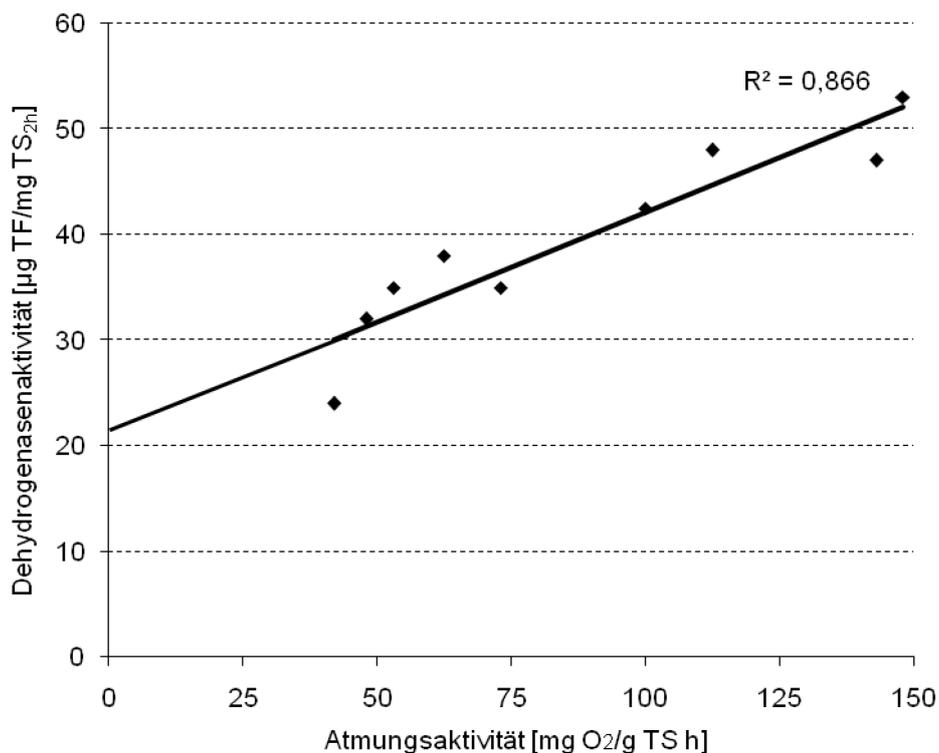


Abb. 7.6: Dehydrogenasenaktivität ($\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$) als Funktion der Atmungsaktivität ($\text{mg O}_2/\text{g TS h}$)

Eine Darstellung der Dehydrogenasenaktivitätswerte als Funktion der Atmungsaktivität lässt eine deutliche Korrelation zwischen den gewonnenen Ergebnissen erkennen (Abb. 7.6).

Außerdem bestätigt sich der Dehydrogenasentest als eine sensitivere Methode zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität, was auch von LOPEZ et al. (1986) beobachtet wurde. Der Korrelationskoeffizient betrug $R^2 = 0,866$ und war daher mit den Werten aus der Literatur vergleichbar.

LOPEZ et al. (1986) untersuchten den Effekt des Schlammalters auf die Korrelation zwischen Dehydrogenasenaktivität (INT-Test) und Sauerstoffverbrauch in chlorbehandelten Proben. Alle gewonnenen Korrelationskoeffizienten überschritten einen Wert von 0,9 ($R^2 = 0,988$; 0,939; 0,906). BENSALD et al. (2000) verglichen die mittels Dehydrogenasenaktivitäts- (XTT-Test²³) und Sauerstoffverbrauchsmessung bestimmte Aktivität eines stabilen Belebtschlamm. Das Verhältnis war linear ($R^2 = 0,977$) sowohl für einen langsam als auch einen schnell wachsenden Belebtschlamm. Ein ähnlich hoher Korrelationskoeffizient wurde in der Arbeit von McCLUSKEY et al. (2005) angegeben. Sie verglichen die XTT- und MTS-Formazanproduktion²⁴ mit dem Sauerstoffverbrauch mittels Zellsuspensionen, die unter gleichen Bedingungen inkubiert wurden. Für beide Salze war der Sauerstoffverbrauch direkt proportional zur Dehydrogenasenaktivität mit Korrelationskoeffizienten von 0,973 und 0,985. AWONG et al. (1985) maßen wiederum die Sauerstoffzehrung mit einem Warburg Respirometer und einer Sauerstoffelektrode und stellten eine entsprechend sehr gute ($R^2 = 0,951$) und gute ($R^2 = 0,874$) Korrelation mit dem INT-Dehydrogenasentest fest.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die in dieser Arbeit optimierte Prozedur zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität eine starke Korrelation zur Atmungsaktivität zeigt und sich damit als sehr gut geeignet für die Charakterisierung des Biofilms in Scheibentauchkörpern erweist.

²³ 3'-[1-Phenylaminocarbonyl-3,4-Tetrazolium]bis(4-Methoxy-6-Nitro)-Benzen-Sulfonsäurehydrat

²⁴ 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-Carboxymethoxyphenyl)-2-(4-Sulfophenyl)-2H-Tetrazolium

7.5. Anwendung der modifizierten Methode

7.5.1. Aktivitätsänderung mit zunehmender Biofilmmenge

Ein wichtiger Parameter bei der Untersuchung von Biofilmen ist deren Dicke, bei der die flächenbezogene Aktivität der mikrobiellen Gemeinschaft stagniert. Da die genaue Messung der absoluten Biofilmdicke allerdings sehr aufwändig ist (siehe Kap. 3.2.3), kann alternativ der Biofilmbewuchs bestimmt werden. Er ist als die Biofilmmenge pro Flächeneinheit des Trägermaterials definiert (g/m^2) und wurde als Funktion der Biofilmdicke bezeichnet (OGA et al., 1991 und PEYTON, 1996).

Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen der Aktivitätsänderung zeigten (siehe Kap. 6.5.1, Abb 6.17), dass die Aktivität des Biofilms mit zunehmendem Biofilmbewuchs zunächst anstieg und dann, nach dem Erreichen des maximalen Aktivitätswertes, stagnierte.

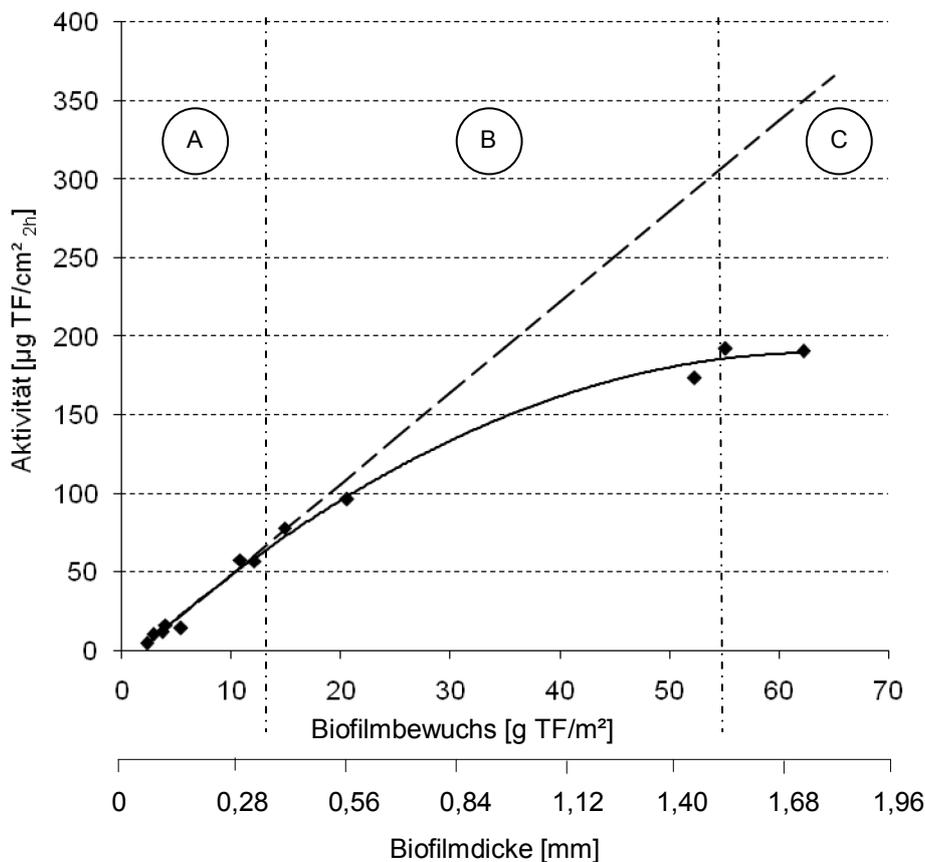


Abb. 7.7: Dehydrogenasenaktivität ($\mu\text{g TF}/\text{cm}^2_{2\text{h}}$) bei unterschiedlichem Biofilmbewuchs bzw. Biofilmdicken (Phase 1, siehe Tab. 5.3) (\blacklozenge) gemessener Verlauf, (---) theoretischer Verlauf

Der Verlauf der aufgeführten Abhängigkeit kann in drei Bereiche unterteilt werden (Abb. 7.7). Im Bereich A (bis ca. 14 g TS/m² bzw. 0,39 mm²⁵) war die Steigung der Aktivitätskurve maximal. Im Bereich B (14 - 55 g TS/m² bzw. 0,39 - 1,53 mm²⁶) nahm die Aktivität mit geringerer Steigung bis zum Erreichen des maximalen Aktivitätswertes weiter zu, um im Bereich C (ab ca. 55 g TS/m² bzw. 1,53 mm) stabil zu bleiben.

LE BIHAN & LESSARD (1998) bestimmten die Dehydrogenasenaktivität in Abhängigkeit vom Trockensubstanzgehalt. Die Biomasse stammte aus dem Rückspülwasser eines Biofilters und wurde zu Testbeginn in einer NaCl Lösung suspendiert und homogenisiert. Sie beobachteten eine Zunahme der Dehydrogenasenaktivität (mg TF/L) mit dem bis zu 2 g oTS/L steigenden Wert des Trockensubstanzgehalts. Zum gleichen Ergebnis kamen TÓTH et al. (1995), die die ETS-Aktivität (µl O₂/L·h) in Zooplankton bestimmten. Der untersuchte Bereich ging bis 0,43 mg oTS/L. LOPEZ et al. (1986) stellten wiederum fest, dass die Aktivität des untersuchten Belebtschlamm (mg O₂*/g oTS·d) über 0,3 g oTS/L umgekehrt proportional zu seiner Konzentration ist. Dieses Phänomen wurde ebenfalls von KLAPWIJK et al. (1974) beobachtet. Mit einer steigenden Schlammkonzentration in der Probe (über ca. 1 g/L) sank demnach der gemessene Sauerstoffverbrauch (mg O₂*/g oTS h). LA MOTTA (1976) zeigte, dass die ATP-Konzentration im Biofilm bis zum Erreichen einer Dicke von 320 µm zunahm und dann annähernd gleich blieb (Abb. 7.8).

Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen LAOPAIBOON et al. (2001), die die BSB₅-Abbauleistungen eines Scheibentauchkörpers nach einer Woche und nach zwei Monaten bestimmten. Die von ihnen erhaltenen Werte waren annähernd gleich und betragen 88,1 ± 3,8 % bzw. 91,5 ± 3,4 % (Mittelwert ± Standardabweichung). Beachtenswert ist, dass der einwöchige Biofilm 0,8 - 1 mm dick war, während der zwei Monate alte Biofilm 2 - 3 mm maß. Dies weist darauf hin, dass der mit der Zeit zunehmende Biofilmbewuchs bzw. die Biofilmdicke, nach dem Erreichen eines Grenzwertes nicht zur Erhöhung der Aktivität des Biofilms und damit der Reinigungsleistung des Systems führt.

²⁵ Die Biofilmdicken wurden bei einer parallel laufenden Anlage bestimmt (siehe BLANK et al., 2008).

²⁶ Es ist zu beachten, dass die Abbildung kein Profil in der Tiefe des Biofilms darstellt.

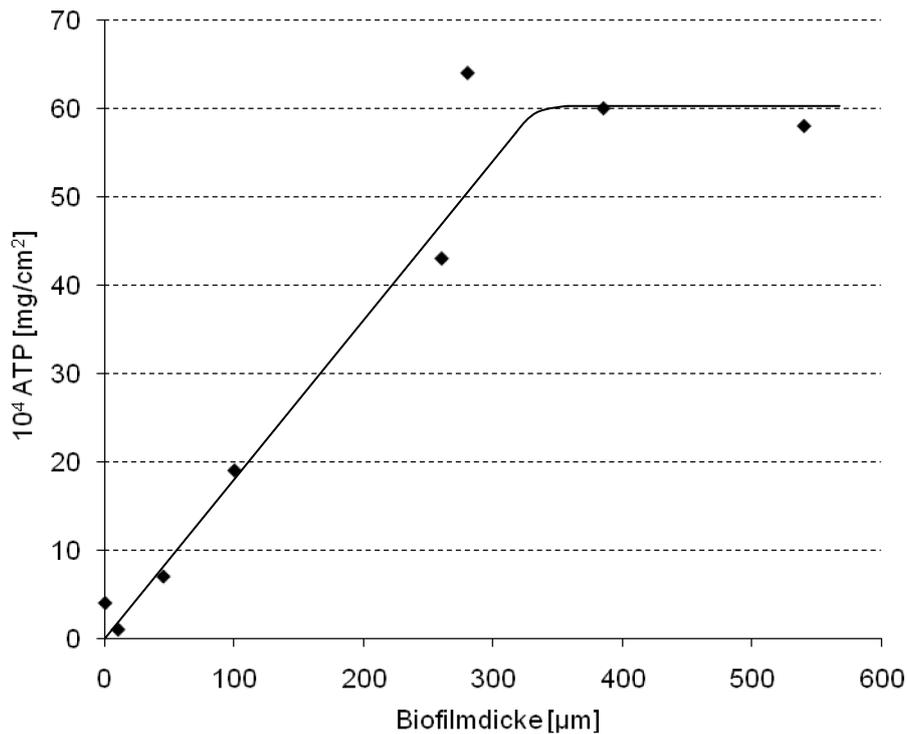


Abb. 7.8: Abhängigkeit der ATP-Konzentration von der Biofilmdicke (LA MOTTA, 1976)

Damit eine enzymatische Reaktion innerhalb der Zelle ablaufen kann, müssen die Nährstoffe in Kontakt mit der Zelle kommen, an der Zelloberfläche sorbiert und in die Zelle aufgenommen werden. Bei suspendierten Bakterienkolonien und bei Biofilmen kommt noch zusätzlich die Diffusion in das Innere der Kolonie oder des Biofilms dazu (HARTMANN, 1992).

Im Bereich A (Abb. 7.7) nahm die flächenbezogene Aktivität zu und die im Biofilm verlaufenden biochemischen Reaktionen waren nicht diffusionslimitiert. Der Nährstoff- und Sauerstofftransport im Biofilm erfolgten in seiner gesamten Tiefe. Im Bereich B stieg die Aktivität zwar mit zunehmender Dicke des Biofilms immer noch an, die Transportprozesse waren allerdings durch Diffusion begrenzt. Wären die Reaktionen im Inneren eines Biofilms nicht von der Diffusion abhängig, würde das Verhältnis zwischen Biofilmbewuchs und dessen Aktivität den in Abbildung 7.7 als theoretisch bezeichneten Verlauf aufweisen.

Da Biofilme eine Dicke von wenigen Mikrometern bis zu einigen Zentimetern erreichen können, wird die Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff im Biofilm zum limitierenden Faktor (HARTMANN, 1992). In der Oberschicht eines dicken Biofilms werden die höch-

sten Substrat- und Sauerstoffmengen (im Fall des Dehydrogenasetests das Tetrazoliumsalz) verbraucht, da die Bakterien dort größtenteils metabolisch aktiv sind. In der Tiefe des Biofilms herrschen wiederum nicht ausreichende Substrat- und Sauerstoffbedingungen und die Aktivität der Mikroorganismen sinkt (Abb. 7.9 und Abb. 7.10).

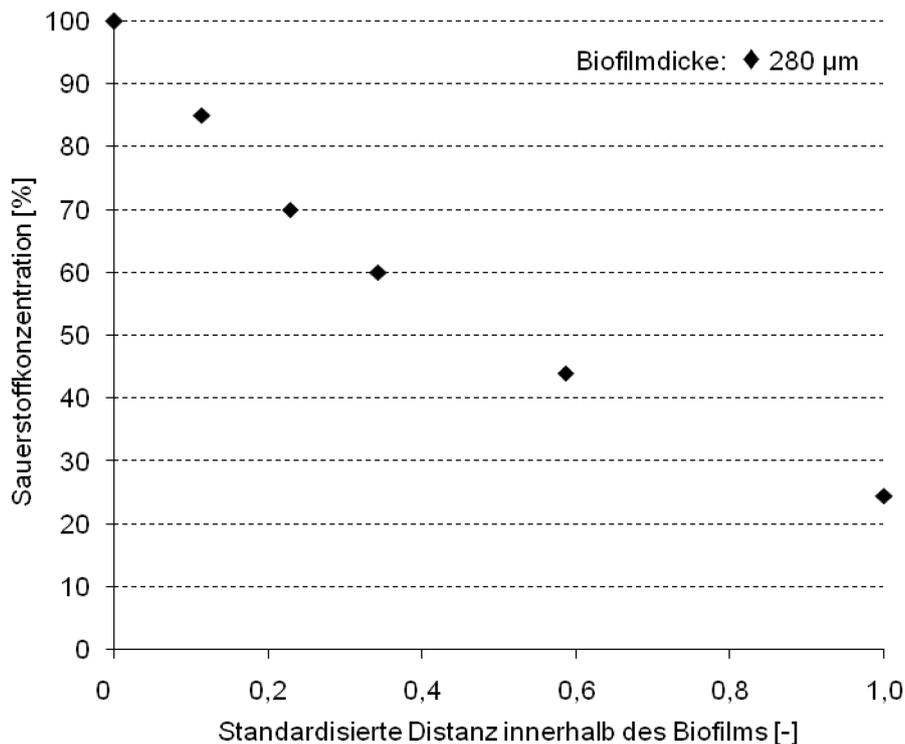


Abb. 7.9: Sauerstoffprofil im Biofilm (nach LASPIDOU & RITTMANN, 2004)

In Abbildung 7.9 ist zu erkennen, dass die Sauerstoffkonzentration mit der Tiefe des Biofilms abnimmt. Nahe der Aufwuchsfläche eines 280 µm dicken Biofilms stellt die Sauerstoffkonzentration nur 20 % des Anfangswertes dar.

Anhand der in Abbildung 7.10 dargestellten Werte lässt sich zeigen, dass die Aktivität der Mikroorganismen in einem dünneren Biofilm (80 - 90 µm) nur um 4 % innerhalb der Biofilmdicke sinkt. In einem dicken Biofilm (> 350 µm) nimmt sie wiederum von 89 % in der oberen Schicht bis 5 % in seinem unteren Teil ab.

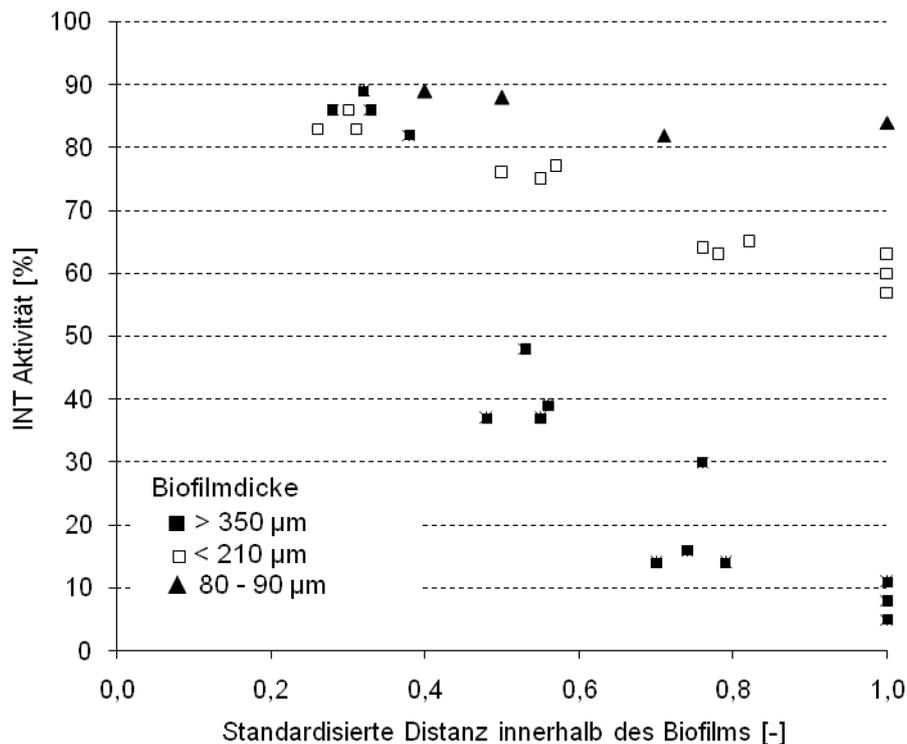


Abb. 7.10: Verteilung der INT Aktivität (ZHANG et al., 1994)

Im Bereich C (Abb. 7.7) wird trotz zunehmender Biofilmdicke keine weitere Erhöhung der flächenbezogenen Aktivität beobachtet. Dies weist darauf hin, dass in einem dickeren Biofilm nur ein Teil der gesamten Population zu der gemessenen Aktivität bzw. die Reinigungsleistung beiträgt (MAIER et al., 2000). In der Nähe der Aufwuchsfläche dominiert die EPS. Sie werden unabhängig vom Wachstum der Bakterien produziert (HORN et al., 2004). Die Bakterien in den unteren Schichten des Biofilms befinden sich teilweise in der Plateau- oder sogar in der Absterbephase (ZHANG et al., 1994). Langanhaltende Mangelsituationen (z. B. an Substrat oder Sauerstoff) können zur Ablösung des Biofilms vom Trägermaterial führen. Eine Limitierung der Biofilmdicke ist deshalb zu empfehlen.

Erhöht man die Temperatur steigen der Bewuchs und die Dicke des Biofilms. Gleichzeitig sinkt seine Dichte (PEYTON, 1996). Die Diffusionsgeschwindigkeit nimmt dadurch zu und die freie Wegstrecke für das Substratmolekül wird zwar verlängert, es steigt jedoch auch die Geschwindigkeit der Reaktionen in der Zelle (HARTMANN, 1992). Laut HARTMANN (1992) wird es ein System in seinem Charakter nicht verändern, daher wird vermutet, dass der Verlauf bei 32,6 °C (Phase 2, siehe Tab. 5.3) sich nicht wesentlich unterscheiden würde.

7.5.2. Einfluss der Substratkonzentration und Temperatur

Die Temperatur, Sauerstoff- und die Substratkonzentration sind neben dem pH-Wert die wichtigsten geschwindigkeitsbestimmenden Kriterien des Reinigungsprozesses (HARTMANN, 1992). Somit ist es wichtig, diese Parameter zu variieren und die Aktivität des Biofilms zu messen.

Es wurden in dieser Arbeit Versuche durchgeführt in denen die Biofilmproben mit verschiedenen Substratkonzentrationen bei 24,7 °C und 32,6 °C inkubiert wurden (siehe Kap. 6.5.2).

Da in diesen Versuchen ein komplexes Nährstoffmedium eingesetzt wurde, ist die Substratkonzentration durch eine praktisch gut messbare Größe zu ersetzen. Hierfür eignet sich der biochemische Sauerstoffbedarf (BSB₅), welcher die abbaubaren organischen Kohlenstoffverbindungen erfasst. Zwar bestimmt der Dehydrogenasentest die Aktivität aller am Abbauprozess beteiligten Mikroorganismen (BLEICH, 1993), jedoch sind in den hochbelasteten Zonen bzw. Scheiben des Scheibentauchkörpers keine Nitrifikanten lebensfähig und NH₄-N kann deshalb nicht als Substrat betrachtet werden (MUDRACK & KUNST, 2003). Die Aktivität der nitrifizierenden Bakterien sollte in den nachfolgenden Kaskaden der Anlage gemessen werden, da dort die höchsten NH₄-N-Umsatzraten zu erwarten sind.

In Abbildung 6.19 ist zu erkennen, dass die Aktivität nicht linear mit der Zunahme des Substratangebotes ansteigt, sondern erwartungsgemäß einem Sättigungswert zustrebt (Michaelis-Menten-Kinetik). Die Asymptote der Kurve stellt die maximale Aktivität des Biofilms dar (TTC-DHA_{max}), die sich nicht durch weitere Erhöhung der Substratkonzentration steigern lässt. Nur ein Anstieg der Enzymkonzentration bzw. Biomassemenge kann den Aktivitätswert noch beeinflussen (siehe Kap. 6.5.1).

Bei einer Erhöhung der Temperatur von 24,7 °C auf 32,6 °C änderte sich die Aktivität um den Faktor $Q_{10} = 1,62$, während die Steigerung der Aktivität 3,6 % pro 1 °C betrug. Der Temperatureinfluss auf den biologischen Abbau eines synthetischen Abwassers in einem einstufigen Scheibentauchkörper wurde ebenso von ISRANI et al. (2002) untersucht. Damit die typischen Bedingungen in den meisten äquatorialen Ländern wider-

gespiegelt werden können, betrug der von ihnen untersuchte Temperaturbereich 20 - 30 °C. Der für diesen Bereich bestimmte Q_{10} -Wert betrug 1,20²⁷. BLANK et al. (2008) bestimmten die maximalen BSB₅-Umsatzraten in Abhängigkeit von der Abwassertemperatur (23,2 - 35,2 °C) in der ersten Kaskade eines Scheibentauchkörpers im labor-technischen Maßstab. Die maximale BSB₅-Umsatzleistung wurde im Temperaturbereich 33,3 - 35,2 °C bestimmt. Bei einer Erhöhung der Temperatur von 24,8 °C auf 31,8 °C ergab sich eine Steigerung der Umsatzleistung von 9 % pro 1 °C bis 28,5 °C und 3,3 % pro 1 °C über 28,5 °C.

Mit steigender Temperatur nimmt die Molekülbewegung zu (Brownsche Molekularbewegung) und eine größere Anzahl von Substrat-Enzym Kollisionen erfolgt. Die Erhöhung der Aktivität ist allerdings nicht unbegrenzt. BLANK et al. (2008) bestimmten den optimalen Temperaturbereich für heterotrophe Bakterien zwischen 30 und 33 °C, während BANERJEE (1997) ein Optimum von 36 °C beschrieb.

Angenommen, dass die optimale Temperatur über 32,6 °C liegt, wurde in dieser Arbeit der Temperatureinfluss durch den Temperaturkoeffizienten θ_T (Van't Hoff-Arrhenius Ansatz) quantifiziert (Gl. 7.3).

$$(TTC - DHA_{\max})_T = (TTC - DHA_{\max})_R \cdot \theta^{T-R} \quad (7.3)$$

Dabei ist:

$(TTC - DHA_{\max})_T$	Aktivität bei T [$\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$];
$(TTC - DHA_{\max})_R$	Aktivität bei R [$\mu\text{g TF/mg TS}_{2\text{h}}$];
T	Temperatur [°C];
R	Referenztemperatur [°C];
θ	Temperaturkoeffizient [-].

Da die Referenztemperatur meistens 15 oder 20 °C beträgt, wurde der in dieser Arbeit berechnete Temperaturkoeffizient auf 20 °C bezogen (Gl. 7.4 und Gl. 7.5):

²⁷ Berechnet aus der angegebene Steigerung der Abbaurate

$$(TTC - DHA_{\max})_{32,6} = (TTC - DHA_{\max})_{20} \cdot \theta^{32,6-20} \quad (7.4)$$

$$(TTC - DHA_{\max})_{24,7} = (TTC - DHA_{\max})_{20} \cdot \theta^{24,7-20} \quad (7.5)$$

und ergab für den gesamten Abwassertemperaturbereich von 24,7 bis 32,6 °C einen θ_{20} -Wert von 1,032. Dieser deckte sich sehr gut mit den Literaturwerten (Tab. 7.4).

Tab. 7.4: θ -Werte für BSB₅-Abbau in Scheibentauchkörpern

Temperaturbereich [°C]	θ [-]	Literaturquelle
10,5 – 20,0	1,008	CHEUNG (1982)
10,0 – 15,0	1,002 – 1,009	FORGIE (1983)
13,0 – 36,0	1,04	BANERJEE (1996)
25,0 – 30,0	1,045	BLANK et al. (2008)
20,0 – 30,0	1,04*	BLANK et al. (2008)
24,7 – 32,6	1,032	diese Arbeit

* Demonstrationsanlage im realen Betrieb

Der Temperatureinfluss auf die Michaeliskonstante ist umstritten. NOVAK (1974) berichtete von einer Zunahme dieses Parameters von 70 mg TOC/L bei 20 °C auf 180 mg TOC/L bei 25 °C, was von BLANK et al. (2008) bestätigt werden konnte. Die bestimmten Michaeliskonstanten ergaben sich zu 26,1 mg BSB₅/L im Bereich von 23,2 °C - 24,8 °C und 38,3 mg BSB₅/L bei 31,5 °C - 32,4 °C. LAWRENCE & MCCARTY (1969) stellten wiederum fest, dass der K_m -Wert mit der Temperaturerhöhung des anaeroben Abbaus von Acetaten abnahm.

Die hier nach Lineweaver-Burk bestimmten K_m -Werte nahmen mit der Temperatur zu und betragen 34,8 mg BSB₅/L bei 24,7 °C und 54,5 mg BSB₅/L bei 32,6 °C. Es ist jedoch zu beachten, dass alle linearen Transformationen der Michaelis-Menten-Beziehung bei der Auswertung ein gewisses Maß an Subjektivität beinhalten. Die Größe der Michaeliskonstante hängt von dem eingesetzten Linearisierungsverfahren ab. Nach der Auswertung der erhaltenen Ergebnisse mit Hilfe des Hanes-Woolf Diagramms ergaben sich K_m -Werte von 38,6 mg BSB₅/L bei 24,7 °C und 33,5 mg BSB₅/L bei 32,6 °C. Es ist erkennbar, dass die so bestimmten Parameter mit der steigenden Temperatur abnahmen.

Durch die Michaeliskonstante wird die Tendenz des Enzyms zur Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes beschrieben und sie stellt demnach ebenfalls einen Indikator für die Abbaubarkeit des Substrats dar. Die hier bestimmten kleinen K_m -Werte weisen eine hohe Affinität des Enzyms zum Substrat auf. In diesem Fall können schon bei niedrigen Nährstoffkonzentrationen alle Enzymmoleküle gesättigt und die halbmaximale Aktivität erreicht werden. Bei ansteigendem Substratangebot ist die Geschwindigkeit des Umsatzes über große Strecken eine Reaktion nullter Ordnung.

7.6. Axiale Verteilung der Biomasse und Aktivität des Biofilms

Eine Ergänzung zu den Ergebnissen des Dehydrogenasentests stellt die axiale Verteilung der Biomasse und deren Aktivität in den einzelnen Kaskaden des Scheibentauchkörpers dar. Deren Quantifizierung erfolgte anhand der Nukleinsäurenkonzentrationen, die mittels der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) identifiziert und quantitativ bestimmt wurden (siehe Kap. 6.6). Dabei wurde der DNA-Gehalt als Parameter für die mikrobielle Biomasse (aktive und inaktive Bakterien) verwendet. Die RNA-Konzentration ergibt sich aus der Summe von tRNA und rRNA und entspricht der metabolischen Aktivität. Das Verhältnis von RNA/DNA wird als relative mikrobielle Aktivität bezeichnet (SCHWARZ, 2004).

7.6.1. Biomasseverteilung

Bezieht man die DNA-Werte auf die Fläche der Scheibe, so ermöglicht dies die Betrachtung des DNA-Wertes als Summenparameter für die mikrobielle Biomasse (aktive und inaktive Bakterien). Wie die Versuchsergebnisse in Abbildung 6.21 zeigen, nahm die Biomassekonzentration entlang des ganzen Scheibentauchkörpers ab. Dies kann auf die abnehmende Substratverfügbarkeit in der Anlage zurückgeführt werden, da die hohe Nährstoffkonzentration im Zulaufbereich eine hohe Biomassebildung auf der ersten Scheibe bewirkte. Im Ablaufbereich der Anlage wiederum wird die Biomassemenge geringer, da die Scheibenbelastung sinkt und die Mikroorganismen auf den letzten Scheiben substratlimitiert wachsen. Ähnliche Schlüsse sind den Arbeiten von PESCOD & NAIR (1972) und BLANK et al. (2008) zu entnehmen.

Die Abnahme der Besiedlungsdichte entlang der Scheibentauchkörperanlage ist ebenfalls mit einer Reduktion der Biofilmdicke verbunden. Vom Zulauf- bis zum Ablaufbereich nahm die Biofilmdicke auf den einzelnen Scheiben des Scheibentauchkörpers ab, was bereits optisch erkannt werden konnte. Der Biofilm in der ersten Kaskade war dicker und gallertartig, der in der zweiten Kaskade hingegen kompakter und viel dünner. Vergleichbare Beobachtungen machten ZAHID & GANCZARCZYK (1994b): ein fünf Tage alter Biofilm auf der ersten Scheibe der ersten Kaskade war 410 µm dick, während der Biofilm auf der ersten Scheibe der dritten Kaskade nur 90 µm maß. PESCOD & NAIR (1972) berichteten von der Änderung der Biofilmdicke entlang einer Scheibentauchkörperanlage von ca. 230 µm auf der ersten bis zu 60 µm auf der letzten Scheibe. Dies ist, wie die Biomassemenge, auf die Substratverfügbarkeit zurückzuführen.

Die Biofilmdicke nimmt mit der Betriebsdauer zu (PEYTON, 1996 und HORN & HEMPEL, 1997). Erhöht man außerdem die organische Belastung oder die Temperatur, steigt sowohl die Biomassekonzentration als auch die Dicke des Biofilms an (PEYTON, 1996 und BLANK et al., 2008). Die in Tabelle 6.13 dargestellten Werte spiegeln daher die Biomassekonzentrationen des Biofilms unter den angegebenen Bedingungen und zum Zeitpunkt der Probenentnahme wider. Jedoch bleibt der Kurvenverlauf (siehe Abb. 6.21) bei allen Bedingungen annähernd gleich.

Da DNA nur in kleinen Mengen (1,1 - 1,6 mg/g TS) in den EPS der Biofilme aus der Abwasserbehandlung vorkommt (RODE, 2004), konnte davon ausgegangen werden, dass die analysierte DNA-Menge ausschließlich aus den Zellen stammt. Weiterhin, unter der Voraussetzung, dass sich der untersuchte Biofilm überwiegend aus Bakterien zusammensetzt, wurde, bei einem mittleren DNA-Gehalt von $3 \cdot 10^{-15}$ g DNA pro Bakterienzelle (DELL'ANNO et al., 1998), die approximative Bakterienzahldichte auf jeder Scheibe bestimmt (Tab. 7.5).

Tab. 7.5: DNA-Konzentration und Zellzahl auf der Scheiben des Scheibentauchkörpers (Mittelwert \pm Standardabweichung)

Scheibe	DNA [mg/g TS] Mittelwert \pm SD	Zellzahl [BZ/mg TS] Mittelwert \pm SD
1	29,5 \pm 6,2	9,83 \pm 2,1 \cdot 10 ⁹
3	30,9 \pm 3,3	10,03 \pm 1,1 \cdot 10 ⁹
6	29,2 \pm 2,0	9,73 \pm 0,7 \cdot 10 ⁹
12	22,2 \pm 3,3	7,40 \pm 1,1 \cdot 10 ⁹

Der erhaltene Zellzahlbereich zwischen $7,40 \pm 1,1 \cdot 10^9$ und $10,03 \pm 1,1 \cdot 10^9$ BZ/mg TS stimmte mit den Beispielwerten für Belebtschlamm von WEDDLE & JENKINS (1971) überein, die um 10^9 BZ/mg TS oszillierten.

Es ist zu beachten, dass die Bestimmung des DNA-Wertes als Summenparameter für die aktive und inaktive mikrobielle Biomasse besonders in Biofilmsystemen mit geringerer Biomassemenge von Vorteil ist. In Scheibentauchkörpern kann die Verteilung der Biomasse in der Anlage grundsätzlich über die Messung des Biomassegehalts pro Aufwuchsfläche (g TS/m²) erfolgen.

7.6.2. Verteilung der Aktivität

Auf Basis der Dehydrogenasenaktivitätswerte und RNA-Konzentrationen im Biofilm aus einzelnen Scheiben, wurde die Verteilung der Aktivität entlang des Scheibentauchkörpers ermittelt. Da sich die Menge des Biofilms entlang der Scheibentauchkörperanlage ändert, wurden die bestimmten Dehydrogenasenaktivitäten auf die Scheibenoberfläche bezogen und in $\mu\text{g TF/cm}^2_{2\text{h}}$ ausgedrückt (siehe Kap. 6.5.3). Die RNA-Werte wurden sowohl auf die Trockenmasse des Biofilms sowie auf die Scheibenoberfläche bezogen (siehe Kap. 6.6.2). Die beiden Aktivitätsparameter wiesen vergleichbare Verläufe auf.

Die flächenbezogene Dehydrogenasenaktivität des Biofilms betrug auf der ersten Scheibe der Anlage $173,0 \pm 7,5 \mu\text{g TF/cm}^2_{2\text{h}}$ und nahm entlang der beiden Kaskaden ab. Somit betrug sie auf der letzten Scheibe der Anlage $11,9 \pm 3,0 \mu\text{g TF/cm}^2_{2\text{h}}$ (siehe Abb. 6.20).

Die RNA-Werte, bezogen auf die organische Trockenmasse des Biofilms, stellen ein Integral über die Aktivität von 1 g des Biofilms dar. So war z. B. 1 g des Biofilms auf der dritten Scheibe ca. drei Mal aktiver als 1 g des Biofilms auf der letzten Scheibe der Anlage. Tatsächlich waren die Unterschiede viel größer, da auf der dritten Scheibe vergleichsweise mehr Biomasse als auf der letzten vorhanden war. Die auf die Scheibenoberfläche bezogene mikrobielle Aktivität nahm vom Zulauf her zunächst zu, um im Bereich der dritten Scheibe ein Maximum ($1132 \pm 114 \text{ mg/m}^2$) zu erreichen und dann auf einen Wert von $189 \pm 53 \text{ mg/m}^2$ auf der letzten Scheibe abzusinken. Somit war die Aktivität auf der dritten Scheibe mehr als sechs Mal höher als im Ablaufbereich der Anlage (siehe Abb. 6.22).

Die anhand der RNA-Konzentrationen ermittelte Verteilung der Aktivität entlang des Scheibentauchkörpers zeigt einen ähnlichen Verlauf wie die in der Arbeit von BREITHAUPT (1997) beschriebene Verteilung. Dieser berechnete aus der Abbaugeschwindigkeit von Essigsäure die Konzentration der aktiven Biomasse auf den einzelnen Scheiben und stellte deren Verteilung als Funktion der Reaktorlänge dar. Im Scheibentauchkörper mit 29 Scheiben und einer Gesamtlänge von 92 cm stieg die Menge der aktiven Mikroorganismen vom Zulauf bis zum Bereich der elften Scheibe (nach 27 cm), sank danach bis zu einem Wert von 1 g oTS/Scheibe im zweiten Drittel der Anlage ab und stagnierte auf diesem Niveau bis zum Ablauf. Folglich konnte auf der letzten Scheibe der Anlage lediglich ein Viertel aktive Biomasse gefunden werden als auf der elften Scheibe, wo ein Maximum erreicht wurde. Laut BREITHAUPT (1997) ist die höhere Aktivität auf der dritten Scheibe im Vergleich zur ersten Scheibe mit einem höheren Anteil anorganischer Trockensubstanz ($\text{GR}^{28}/\text{TS} > 80 \%$) im Biofilm des vorderen Anlagenbereiches zu erklären. In der vorliegenden Arbeit variierte zwar das GR/TS-Verhältnis zwischen 9,6 und 14,3 %, war aber immer auf der ersten und dritten Scheibe annähernd gleich.

Beachtenswert ist, dass die Reduktion der Aktivität entlang der Scheibentauchkörperachse nicht nur auf die abnehmende Anzahl an Mikroorganismen, sondern auch auf

²⁸ Glührückstand

die sinkende Substratkonzentration zurückzuführen ist. Hohe Nährstoffkonzentrationen im vorderen Bereich der Anlage bewirken eine hohe Aktivität der Mikroorganismen (siehe Kap. 7.5.2). Auf den hinteren Scheiben herrschen wiederum die C-substratlimitierten Bedingungen, die durch den Abbau von über 70 % des CSB in der ersten Kaskade erreicht werden. Als Substrat verbleibt zwar Ammonium, jedoch wurden rechnerisch nur 18,4 % der $\text{NH}_4\text{-N}$ -Zulaufkonzentration nitrifiziert (siehe Kap. 7.1.2). Die niedrigen CSB-Werte und die schwache Nitrifikation führen zu geringeren Aktivitäten des Biofilms im Ablauf des Scheibentauchkörpers.

Es ist zu beachten, dass die auf Basis der RNA-Konzentration gemessenen Aktivitäten als Durchschnittswerte anzuschauen sind, da die aktive Biomasse im Biofilm mit der Tiefe abnimmt (siehe Kap. 6.5.1). Da zudem die Dicke des Biofilms mit der Zeit zunimmt, spiegeln die Werte der Aktivitäten den Zustand des Biofilms unter den angegebenen Bedingungen und zum Zeitpunkt der Probenentnahme wider. Das erhaltene Aktivitätsprofil in der Anlage (siehe Abb. 6.20 und Abb. 6.22) bleibt jedoch konstant, sofern sich die Parameter wie Verweilzeit, Zulaufkonzentration und der pH-Wert des Zulaufes nicht ändern (BREITHAUPT, 1997).

Wie die dargestellten Versuchsergebnisse zeigen (siehe Abb. 6.23), besteht eine gute Übereinstimmung der RNA/DNA-Kurve mit dem Verlauf der RNA-Werte. Außerdem ist laut DELL'ANNO et al. (1998) das RNA/DNA-Verhältnis ein guter Bioindikator für die relative Bioaktivität. Daher kann das RNA/DNA-Verhältnis als ein Parameter für die mikrobielle Aktivität verwendet werden.

8. Zusammenfassung und Schlussfolgerungen

Ungeachtet dessen, dass die Reinigungsleistung eines Abwasserreinigungssystems direkt von der Aktivität der vorhandenen Biomasse abhängt, wurde die Aktivität des Biofilms in Scheibentauchkörpern bisher nicht näher betrachtet. Derzeit fehlt außerdem eine zuverlässige und präzise Methode, die eine Bewertung der Aktivität des im Scheibentauchkörper vorhandenen Biofilms ermöglicht.

Da die Dehydrogenasen Schlüsselenzyme des Stoffwechsels von aeroben, fakultativ aeroben und anaeroben Bakterien sind, ist der Dehydrogenasentest geeignet für die Analyse des Biofilms - einer Gemeinschaft unterschiedlicher Mikroorganismenarten. Die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität basiert auf dem Einsatz von Tetrazoliumsalzen, die als artifizielle Elektronenendakzeptoren dienen und die durch Dehydrogenasen abgespaltenen Wasserstoffatome übernehmen. So werden die fast farblosen Tetrazoliumsalze zum rötlichen, unlöslichen Formazanprodukt reduziert, welches photometrisch gemessen werden kann. Die Menge an Formazan ist proportional zu der Intensität mikrobieller Stoffumsetzungen.

Seit über 65 Jahren wird der Dehydrogenasentest in unterschiedlichen Bereichen der Forschung eingesetzt. Auf dem Gebiet der Abwasserreinigung wurde die Methode vor allem für Fadenbakterien und Belebtschlamm, seltener für Biofilme angewendet, die dann hauptsächlich von der Aufwuchsfläche abgelöst, suspendiert und weiter wie ein Belebtschlamm betrachtet wurden. Da dies, wie sich auch in dieser Arbeit herausstellte, zur Verminderung der Aktivität führt, sollte der Dehydrogenasentest die Stoffwechselaktivität des intakten Biofilms erfassen.

Die Aktivitätsbestimmung ohne vorhergehende Entfernung der Biomasse vom Trägermaterial wurde bislang nur für Biofilme auf Glasperlen, Aktivkohlegranulat und Sandproben eingesetzt, wo die Biomassemenge viel geringer als im Scheibentauchkörper ist. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher die Einflüsse verschiedener Parameter auf die Dehydrogenasenaktivität des Biofilms analysiert (siehe Kap. 6.2 und Kap. 7.2) und die analytische Prozedur des Dehydrogenasentests an den Biofilm in Scheibentauchkörpern angepasst (siehe Kap. 5.4.2).

Die optimierte Prozedur zur Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität zeigt eine starke Korrelation zum Sauerstoffverbrauch (siehe Kap. 6.4 und Kap. 7.4), was ein wesentliches Kriterium für die Aussagekraft des Tests zur Ermittlung der mikrobiellen Aktivität ist. Des Weiteren konnte die Reproduzierbarkeit des Tests bei den verschiedenen Versuchsreihen belegt werden.

Um die Brauchbarkeit der entwickelten Methode aufzuzeigen, wurde die Änderung der Aktivität mit der zunehmenden Biofilmmenge dargestellt (siehe Kap. 6.5.1 und Kap. 7.5.1). Systeme mit immobilisierter Biomasse arbeiten häufig mit Biofilmdicken von 0,5 bis 2 mm. Die Biofilmdicken in Scheibentauchkörperanlagen erreichen sogar 4,5 mm (CORTEZ et al., 2008). Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigten jedoch, dass ab einer bestimmten Biofilmdicke bzw. ab einem bestimmten Biofilmbewuchs, eine weitere Steigerung dieses Parameters nicht zu einer Zunahme der Gesamtaktivität der Biomasse führt. Die Bakterien in den unteren Schichten des dickeren Biofilms werden nur begrenzt oder gar nicht mit Nährstoffen oder Sauerstoff versorgt und sind dadurch nur unwesentlich oder gar nicht an den Umsetzungsprozessen (Kohlenstoffabbau, Nitrifikation, Denitrifikation) beteiligt. Außerdem befinden sie sich in der Plateau- oder sogar der Absterbephase, was zur Abschälung ganzer Biofilmbereiche führen kann. Diese können gleiche oder größere Dimensionen als die Biofilmdicke haben und eine Reduktion der aktiven Biofilmmenge oder eine Änderung der lokalen Hydrodynamik hervorrufen. Eine Limitierung der Biofilmdicke ist deshalb wünschenswert. Eine Möglichkeit stellt hier die Steigerung der Rotationsgeschwindigkeit dar. LIU & TAY (2001) untersuchten den Einfluss der Rotationsgeschwindigkeit auf den Biofilm in einem Ringscheibenreaktor und stellten fest, dass höhere Geschwindigkeitswerte zur Bildung eines dünneren aber dichteren Biofilms führen. Mit abnehmender Dicke stieg die gemessene Aktivität des Biofilms, eine Erhöhung der Rotationsgeschwindigkeit ist allerdings mit einem signifikanten Anstieg der Betriebskosten verbunden. Es sollten daher andere Maßnahmen zur Limitierung der Biofilmdicke bzw. Menge der Biomasse in weiteren Untersuchungen ergriffen werden (z. B. Abstandhalter zum Abscheiden des Biofilms).

Weiterhin wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob eine Änderung der verfahrenstechnischen Parameter als Schwankungen der Dehydrogenasenaktivität erkannt werden können. Mit Hilfe von $TTC-DHA_{max}$ - und K_m -Werte, die aus der linearen Trans-

formation der Michaelis-Menten-Beziehung errechnet wurden, konnte der Einfluss der Substratkonzentration und der Temperatur nachgewiesen werden. Es wurde beobachtet, dass die Steigerung beider Parameter eine Erhöhung der Aktivität bis zum Erreichen des maximalen Aktivitätswerts bewirkt (siehe Kap. 6.5.2 und Kap. 7.5.2). Ab einer bestimmten Substratkonzentration sind die Enzyme gesättigt und es kann kein zusätzliches Substrat mehr umgesetzt bzw. die Aktivität nicht weiter erhöht werden. Die Temperatur, bei welcher die maximale Aktivität nachgewiesen werden kann, stellt die optimale Temperatur eines Enzyms dar. Eine weitere Erhöhung führt zur Abnahme der Enzymleistung. Wie sich herausstellte, lässt sich mit Hilfe von Dehydrogenasentests bzw. TTC-DHA_{max}- und K_m-Werten eine enzymatische Reaktion quantifizieren. Ein Vergleich der in dieser Arbeit bestimmten Aktivitätswerte mit den bisherigen Ergebnissen aus der Literatur ist im Hinblick auf die Unterschiede der eingesetzten analytischen Vorgehensweisen allerdings schwierig.

Anhand des Dehydrogenasentests und der ergänzenden Untersuchungen mittels HPLC wurde eine longitudinale Verteilung der Biomasse und Aktivität des Biofilms in Scheibentauchkörpern ermittelt (siehe Kap. 6.5.3, Kap. 6.6 und Kap. 7.6). Dabei diente die DNA-Konzentration als Parameter für die mikrobielle Biomasse und der RNA-Gehalt entsprach der metabolischen Aktivität. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die Biomasse als auch die Aktivität des Biofilms entlang der Scheibentauchkörperachse abnahmen, was auf die abnehmende Substratverfügbarkeit zurückzuführen ist.

9. Empfehlungen für die Anwendung der Methode

Mit der modifizierten Prozedur des Dehydrogenasentests wurde eine gute Grundlage für die Bestimmung der Aktivität in Scheibentauchkörpern geschaffen. Die Vorteile dieser Messung sind: (i) der Geräteaufwand ist auf die Ausrüstung eines durchschnittlich eingerichteten Labors abgestimmt, (ii) die Anwendungsmöglichkeit liegt in einem breiten Temperaturbereich, (iii) eine Untersuchung des intakten Biofilms ohne die Störung der intra- und extrazellulären Prozesse.

Die Zahl der chemisch synthetischen Stoffe, die ins Abwasser gelangen, nimmt weltweit zu (HARTMANN, 1992). Das Verhalten dieser Substanzen in biologischen Systemen ist deshalb zu prüfen. Mit der modifizierten Prozedur des Dehydrogenasentests kann kostengünstig und mit geringem Zeit- und Arbeitsaufwand die Abbaubarkeit und Toxizität verschiedener Substanzen bestimmt werden. Diese können direkt mit dem Biofilm aus der Anlage, wo sie eingeleitet werden sollen, gemessen werden.

Zur Beurteilung der Wirksamkeit einer Scheibentauchkörperanlage werden verschiedene Parameter herangezogen. CSB und BSB sind sicherlich unverzichtbar, sie geben jedoch keinen tieferen Einblick in die biologischen Vorgänge. Dies dürfte bei einem ungestört laufenden Anlagenbetrieb zunächst ohne Bedeutung sein. Jedoch ist bei auftretenden Störungen ihre Aufklärung nur möglich, wenn biologische Parameter gemessen werden könnten (BLEICH, 1993).

Der Dehydrogenasentest ist ein geeignetes Werkzeug für die Überwachung von Abwasser- bzw. Scheibentauchkörperanlagen, mit dem innerhalb kurzer Zeit eine Aussage über den momentanen Zustand des Biofilms gemacht und das Vorliegen störender Einflüsse erkannt werden kann.

Eine Einbeziehung der Biofilmaktivität in die Überwachung von Scheibentauchkörpern verlangt jedoch ein langfristig angelegtes Untersuchungsprogramm in den jeweiligen Anlagen. Die Proben sollten über einen längeren Untersuchungszeitraum entnommen werden, um die normale Schwankungsbreite der Aktivität zu quantifizieren und für jede Anlage ein repräsentatives Bezugssystem zu definieren. Untersuchungen an definierten Segmenten auf den Scheiben, in Form von demontierbaren Trägern, sind anzura-

ten. Dabei sind sowohl die Biomassemenge als auch die zeitveränderlichen Zulauf-, Umwelt- und Betriebsbedingungen zu berücksichtigen. Auf Grundlage dieser Daten bzw. anhand von signifikanten Veränderungen der Aktivität sollten sich somit vorliegende Störungen umgehend erkennen lassen.

Literaturverzeichnis

- ALEF, K. (1991): Methodenhandbuch Bodenmikrobiologie: Aktivitäten, Biomasse, Differenzierung. Ecomed-Verlag, Landsbergech.
- ALTMAN, F.P. (1972): An introduction to the use of tetrazolium salts in quantitative enzyme cytochemistry. Koch-Light Laboratories Ltd. Colnbrook, Bucks., England.
- AMANN, R., LEMMER, H., WAGNER, M. (1998): Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiology Ecology*, 25: 205-215.
- ANDREOTTOLA, G., BALDASSARRE, L., COLLIVIGNARELLI, C., PEDRAZZANI, R., PRINCIPI, P., SORLINI, C., ZIGLIO, G. (2002): A comparison among different methods for evaluating the biomass activity in activated sludge systems: preliminary results. *Water Science and Technology*, 46(1-2): 413-417.
- ARAYA, R., TANI, K., TAKAGI, T., YAMAGUCHI, N., NASU, M. (2003): Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 43: 111-119.
- ATLAS, R.M., BARTHA, R. (1981): *Microbial ecology: fundamentals and applications*. Addison-Wesley Publishing Company.
- ATV (1997): *Biologische und weitergehende Abwasserreinigung. ATV-Handbuch*. Verlag Ernst & Sohn, Berlin.
- ATV-A 135 (1989): Grundsätze für die Bemessung von Tropfkörpern und Tauchtropfkörpern mit Anschlusswerten über 500 EW.
- ATV-DVWK-A 131 (2000): Bemessung von einstufigen Belebungsanlagen. Regelwerk ATV-DVWK, GFA. Bad Hoenf.
- ATV-DVWK-A 281 (2001): Bemessung von Tropfkörpern und Rotationstauchkörpern. Verlag DWA, Bad Hoenf.
- ATV-DVWK IG-5.6 (2004): *Aerobe Biofilmverfahren in der Industrieabwasserreinigung - Definitionen, Verfahrenstechniken, Einsatzgebiete, Bemessungshinweise*. Arbeitsbericht. Verlag DWA, Bad Hoenf.
- AWONG, J., BITTON, G., KOOPMAN, B. (1985): ATP, oxygen uptake rate and INT-dehydrogenase activity of actinomycete foams. *Water Research*, 19(7): 917-921.
- BANERJEE, G. (1997): Treatment of phenolic wastewater in RBC reactor. *Water Research*, 31(4): 705-714.
- BARRENA, R., VÁZQUEZ, F., SÁNCHEZ, A. (2008): Dehydrogenase activity as a method for monitoring the composting process. *Bioresource Technology*, 99(4): 905-908.
- BENSAID, A., THIERIE, J., PENNINGCKX, M. (2000): The use of the tetrazolium salt XTT for the estimation of biological activity of activated sludge cultivated under steady-state and transient regimes. *Journal of Microbiological Methods*, 40(3): 255-263.

- BITTON, G. (1994): *Wastewater Microbiology*. Wiley-Liss, New York.
- BLANK, A., HOFFMANN, E., HAHN, H.H. (2008): Untersuchung, Modellierung und Demonstration der Leistungsfähigkeit und Flexibilität von Scheibentauchkörpern. Abschlussbericht des Teilprojektes A 4.1.1 des Verbundprojektes „Exportorientierte Forschung und Entwicklung auf dem Gebiet der Wasserver- und -entsorgung“, Teil II „Abwasserbehandlung und Wasserwiederverwendung“, Kernprojekt A „Abwasserbehandlung“; Förderkennzeichen FKZ: 02 WA 0541.
- BLEICH, U. (1993): Vergleichende Untersuchungen über Biomasse- und Aktivitätsparameter sowie die Eigenschaften bakterieller Exopolymere in industriellen und kommunalen biologischen Kläranlagen. Fortschrittberichte VDI Reihe 15 Nr. 103. VDI-Verlag GmbH, Düsseldorf.
- BLENKINSOPP, S.A., LOCK, M.A. (1990): The measurement of electron transport system activity in river biofilms. *Water Research*, 24(4): 441-445.
- BOLTON, J., TUMMALA, A., KAPADIA, C., DANDAMUDI, M., BELOVICH, J.M. (2006): Procedure to quantify biofilm activity on carriers used in wastewater treatment systems. *Journal of Environmental Engineering*, 132(11): 1422-1430.
- BÖHM, B., WILDERER, P.A. (1997): Leistungsfähigkeit moderner Biofilm-Verfahren - eine kritische Bewertung. In: 26. Abwassertechnisches Seminar Biofilm-Technologie zur Reinigung kommunaler Abwässer: Mode oder Moderne? Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft Technische Universität München.
- BREITHAUPT, T. (1997): Rotationsscheibenreaktor für die aerobe, anoxische und anaerobe Abwasserreinigung: praktische Einsatzmöglichkeiten und mathematische Modellierung. Fortschrittberichte VDI Reihe 15 Nr. 179. VDI-Verlag GmbH, Düsseldorf.
- BRZEZIŃSKA, M., WŁODARCZYK, T. (2005): Enzymy wewnątrzkomórkowych przemian redoks (oksydoreduktazy). *Acta Agrophysica, Rozprawy i Monografie*, 3:11-26.
- BUCKSTEEG, W., THIELE, H. (1959): Die Beurteilung von Abwasser und Schlamm mittels TTC (2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid). *Das Gas- und Wasserfach/Abwasser*, 100: 916-920.
- BURTON, G.A., LANZA, G.R. (1986): Variables affecting two electron transport system assays. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(5): 931-937.
- CHEUNG, P.S. (1982): Biologishce Stickstoffelimination mit Tauchkörpern. *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft*, Band 73. Oldenbourg-Verlag, München.
- 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. *Water Science and Technology*, 43(6): 185-192.
- CLARET, C., FONTVIELLE, D. (1996): Characteristics of biofilm assemblages in two contrasted hydrodynamic and trophic contexts. *Microbial Ecology*, 34: 49-57.
- COLE, A.C., SEMMENS, M.J., LAPARA, T.M. (2004): Stratification of activity and bacterial community structure in biofilms grown on membranes transferring oxygen. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(4): 1982-1989.

- COLPAN, M. (1983): Entwicklung und Optimierung eines Trennverfahrens für hochmolekulare Nukleinsäuren mit Hilfe der Hochdruck-Flüssigkeitschromatographie (HPLC). Dissertation. Technische Hochschule Darmstadt.
- COPPELLA, S.J., ACHESON, C.M., DHURJATI, P. (1987): Isolation of high-molecular-weight nucleic acids for copy number analysis using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 402: 189-199.
- CORTEZ, S., TEIXEIRA, P., OLIVEIRA, R., MOTA, M. (2008): Rotating biological contactors: a review on main factors affecting performance. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 7: 155-172.
- D'ANTONIO, G., MENDIA, L., PIROZZI, F., POLESE, A. (1997): Rotating biological contactor solid contact system for the treatment of wastewater from small communities. *Water Science and Technology*, 35(6): 109-118.
- DELL'ANNO, A., FABIANO, M., DUINEVELD, G.C.A., KOK, A., DANOVARO, R. (1998): Nucleic acid (DNA, RNA) quantification and RNA/DNA ratio determination in marine sediments: comparison of spectrophotometric, fluorometric, and High-Performance Liquid Chromatography methods and estimation of detrital DNA. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9): 3238-3245.
- DENNEY, R.C. (1982): *A dictionary of spectroscopy*. Wiley, New York.
- DEV L3 (1993): Bestimmung der Toxizität von Abwässern und Abwasserinhaltsstoffen nach der Dehydrogenasenaktivität mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN 38412-3 (2008): Norm-Entwurf: Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität (TTC-Test), Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung - Testverfahren mit Wasserorganismen (Gruppe L). Beuth Verlag, Berlin.
- DIN 4045 (2003): *Abwassertechnik Grundbegriffe*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 1085 (2000): *Abwassertechnik Grundbegriffe*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 12255 (2002): *Kläranlagen - Teil 7, Biofilmreaktoren*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 12879 (2000): *Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse*. Beuth Verlag, Berlin.
- DIN EN 12880 (2000): *Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts*. Beuth Verlag, Berlin.
- DOMAN, J. (1929): Results of experimental contact filter with partially submerged rotating plates. *Sewage Works Journal*, 1: 555-560.
- EGLI, K., BOSSHARD, F., WERLEN, C., LAIS, P., SIEGRIST, H., ZEHNDER, A.J.B., VAN DER MEER, J.R. (2003): Microbial composition and structure of rotating biological contactor biofilm treating ammonium-rich wastewater without organic carbon. *Microbial Ecology*, 45: 419-432.
- FAHMY, A.R., WALSH, E.O'F. (1952): The quantitative determination on dehydrogenase activity in cell suspensions. *Biochemical Journal*, 51: 55-56.

- FLEMMING, H.-C. (1991): Biofilme und Wassertechnologie, Teil I: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen. Das Gas- und Wasserfach/Abwasser, 132: 197-207.
- FLEMMING, H.-C. (1994): Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen. Kommissionsverlag R. Oldenbourg, München.
- FLEMMING, H.-C. (2007): Schriftliche Mitteilung: Vorlesung „Biofilme“. Biofilm Centre, Universität Duisburg-Essen.
- FLEMMING, H.-C., GRIEBE, T., SZEWZYK, U. (2000): Biofilms. Investigative methods and applications. Technomic Publishing Company, Lancaster, Pennsylvania.
- FLEMMING, H.-C., WINGENDER, J. (2001): Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien. Biologie in unserer Zeit, 3: 169-179.
- FORGIE, D.J.L. (1983): Effects of low temperature on rotating biological contactor treatment efficiency. EWPCA-IAWPRC-Seminar "Rotating biological discs". Fellbach.
- FREITAS DOS SANTOS, L.M., LIVINGSTON, A.G. (1995): Membrane-attached biofilms for VOC wastewater treatment I: novel in situ biofilm thickness measurement technique. Biotechnology and Bioengineering, 47: 82-89.
- GALLERT, C., WINTER, J. (1999): Bacterial metabolism in wastewater treatment systems. Biotechnology, Volume 11a: Environmental Processes I Wastewater treatment. Rehm, H.-J., Reed, G., Pühler A., Stadler, P. (eds.) Volume ed. J. Winter Wiley-VCH Weinheim, Chapter 2: 17-53.
- GAJDŮŠEK, J., KUPEC, J., ŠVANCER, J. (1974): Beitrag zur Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität von Schlämmen mit dem Formazantest bei der biologischen Reinigung von Gerberabwässern, kombiniert mit städtischen Abwässern. Acta hydrochimica et hydrobiologica, 2(6): 521-531.
- GELLER, A., BRAUCH, H.-J., WERNER, P., BERBERICH, G. (1991): Handbuch Mikrobiologische Bodenreinigung. Landesanstalt für Umweltschutz Baden-Württemberg, Karlsruhe.
- GIKAS, P., LIVINGSTON, A.G. (1993): Use of ATP to characterize biomass viability in freely suspended and immobilized cell bioreactors. Biotechnology and Bioengineering, 42: 1337-1351.
- GINESTET, P., AUDIC, J.-M., URBAIN, V., BLOCK, J.-C. (1998): Estimation of nitrifying bacterial activities by measuring oxygen uptake in the presence of the metabolic inhibitors allylthiourea and azide. Applied and Environmental Microbiology, 64(6): 2266-2267.
- GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, S., LIPPERT-HEREDIA, E., HERNÁNDEZ-ESPARZA, M., DORIA-SERRANO, C. (2000): Reactor kinetics for submerged aerobic biofilms. Bioprocess and Biosystems Engineering, 23(1): 57-61.
- GÖNEC, E., HARREMOES, P. (1985): Nitrification in rotating disc systems. Water Research, 19(1): 119-127.
- GRIEBE, T., SCHAULE, G., WUERTZ, S. (1997): Determination of microbial respiratory and redox activity in activated sludge. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 19: 118-122.

- GRIFFIN, P., FINDLAY, G.E. (2000): Process and engineering improvements to rotating biological contactor design. *Water Science and Technology*, 41(1): 137-144.
- HANWOONG, L., CHOI, E., YUN, Z., PARK, Y.K. (2008): Microbial structure and community of RBC biofilm removing nitrate and phosphorus from domestic wastewater. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 18(8): 1459-1469.
- HARTMANN, H. (1960): Entwicklung und Betrieb von Tauchtropfkörperanlagen. *Das Gas- und Wasserfach*, 12: 281-285.
- HARTMANN, L. (1992): *Biologische Abwasserreinigung*. Springer Verlag, Berlin Heidelberg (u.a.).
- HENZE, M., HARRENMOES, P., LA COUR JANSEN, J., ARVIN, E. (1995): *Wastewater Treatment*. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
- HONGWEI, Y., ZHANPENG, J., SHAOQI, S., TANG, W.Z. (2002): INT-dehydrogenase activity test for assessing anaerobic biodegradability of organic compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 53: 416-421.
- HORN, H., HEMPEL, D.C. (1997): Growth and decay in an auto-/heterotrophic biofilm. *Water Research*, 31(9): 2243-2252.
- HORN, H., STAUDT, C., NEU, T., LEON-OHL, A., BÖRMANN, M., HEMPEL, D.C. (2004): Untersuchungsmethoden für Biofilmsysteme. *Chemie Ingenieur Technik*, 76(3): 333-337.
- HURT, R.A., QIU, X., WU, L., ROH, Y., PALUMBO, A.V., TIEDJE, J.M., ZHOU, J. (2001): Simultaneous recovery of RNA and DNA from soils and sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(10): 4495-4503.
- ISRANI, S.H., KOLI, S., PATWARDHAN, A.W., MELO, J.S. (2002): Phenol degradation in rotating biological contactors. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 77: 1050-1057.
- JEFFREY, W.H., PAUL, J.H. (1986): Activity measurements of planktonic microbial and microfouling communities in a eutrophic estuary. *Applied and Environmental Microbiology*, 51(1): 157-162.
- JONTOFSOHN, M. (2002): *Untersuchung der Mikroflora im Sediment von Nonylphenol-belasteten aquatischen Mikrokosmen*. Dissertation. Ludwig-Maximilian-Universität München.
- KAPPLER, A. (2002): *Untersuchungen zum mikrobiellen Abbau von chlorierten Aromaten in einem Suspensions-Membranreaktor*. Dissertation. Universität Bremen.
- KEMPA, E.S. (2001): *Oczyszczanie ścieków na obrotowych złożach tarczowych z samorzutnym napowietrzaniem*. *EkoTechnika*, 3(19): 22-26.
- KIM, C., KOOPMAN, B., BITTON, G. (1994): INT-dehydrogenase activity test for assessing chlorine and hydrogen peroxide inhibition of filamentous pure cultures and activated sludge. *Water Research*, 28(5): 1117-1121.
- KINLI, H. (1999): Effect of disc rotating velocity on the nitrification performance of RBC system and biofilm kinetics. *Environmental Technology*, 20: 37-43.

- KINNER, N.E., BALKWILL, D.L., BISHOP, P.L. (1983): Light and electron microscopic studies of microorganisms growing in rotating biological contactor biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*, 45(5): 1659-1669.
- KLAPWIJK, A., DRENT, J., STEENVOORDEN, J.H.A.M. (1974): A modified procedure for the TTC-dehydrogenase test in activated-sludge. *Water Research*, 8(2): 121-125.
- KUBIN, K. (2004): Einfluss unterschiedlicher Verfahrenskonzepte auf Substratabbau und Nährstoffverwertung in Membranbelebungsanlagen zur kommunalen Abwasserreinigung. Dissertation. Technische Universität Berlin.
- KUBSAD, V., GUPTA, S.K., CHAUDHARI, S. (2005): Treatment of petrochemical wastewater by rotating biological contactor. *Environmental Technology*, 26: 1317-1326.
- KUHN, R., JERCHEL, D. (1941): Reduktion von Tetrazoliumsalzen durch Bakterien, gärende Hefe und keimende Samen. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 74(6): 949-952.
- LA MOTTA, J.E. (1976): Kinetics of Growth and Substrate Uptake in a Biological Film System. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(2): 286-293.
- LAOPAIBOON, L., HALL, S.J., SMITH, R.N. (2002): The effect of a quaternary ammonium biocide on the performance and characteristics of laboratory-scale rotating biological contactors. *Journal of Applied Microbiology*, 93: 1051-1058.
- LASPIDOU, C., RITTMANN, B.E. (2004): Evaluating trends in biofilm density using the UMCCA model. *Water Research*, 38(14-15): 3362-3372.
- LAWRENCE, A.W., MCCARTY, P.L. (1969): Kinetics of methane fermentation in anaerobic treatment. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 41(R1).
- LAZAROVA, V., MANEM, J. (1995): Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research*, 29(10): 2227-2245.
- LAZAROVA, V., MANEM, J. (2000): Innovative biofilm treatment technologies for water and wastewater treatment. In *Biofilm II: Process analysis and applications*. Wiley-Liss Press, New York.
- LAZAROVA, V., PIERZO, V., FONTVIELLE, D., MANEM, J. (1994): Integrated approach for biofilm characterization and biomass activity control. *Water Science and Technology*, 29(7): 345-354.
- LE BIHAN, Y. (2007): Schriftliche Mitteilung.
- LE BIHAN, Y., LESSARD, P. (1998): Influence of operational variables on enzymatic tests applied to monitor the microbial biomass of a biofilter. *Water Science and Technology*, 37(4-5): 199-202.
- LE BIHAN, Y., LESSARD, P. (2000): Monitoring biofilter clogging: biochemical characteristics of the biomass. *Water Research*, 34(17): 4284-4294.
- LEMMER, H., GRIEBE, T., FLEMMING, H.-C. (1996): *Ökologie der Abwasserorganismen*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

- LENHARD, G. (1968): A standardized procedure for the determination of dehydrogenase activity in samples from anaerobic treatment systems. *Water Research*, 2(2): 161-167.
- LINDEMANN, J. (2002): Stickstoffeliminierung in Rotationsscheiben-Biofilmreaktoren. Fortschrittberichte VDI Reihe 3 Nr. 758. VDI-Verlag GmbH, Düsseldorf.
- LIU, Y., TAY, J.-H. (2001): Metabolic response of biofilm to shear stress in fixed-film culture. *Journal of Applied Microbiology*, 90: 337-342.
- LOPEZ, J.M., KOOPMAN, B., BITTON, G. (1986): INT-dehydrogenase test for activated sludge process control. *Biotechnology and Bioengineering*, 28: 1080-1085.
- LØKKEGAARD BJERRE, H., HVITVED-JACOBSEN, T., SCHLEGEL, S., TEICHGRÄBER, B. (1998): Biological activity of biofilm and sediment in the Emscher river, Germany. *Water Science and Technology*, 37(1): 9-16.
- LU, C., LIN, M.R., LI, H.C., LEE, L.Y. (1997): Temperature effects on the performance of an anaerobic rotating biological contactor. *Environmental Technology*, 18: 711-720.
- MACIEL, N.M. (2004): Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) in vertikal durchströmten Pflanzenkläranlagen. Dissertation. Technische Universität Berlin.
- MAIER, R.M., PEPPER, J.L., GERBA, C.P. (2000): *Environmental microbiology*. Academic Press, San Diego London (u.a.).
- MARTÍN-CERECEDA, M., PEREZ-ZU, B., SERRANO, S., GUINEA, A. (2002a): An integrated approach to analyse biofilms of a full scale wastewater treatment plant. *Water Science and Technology*, 46(1-2): 199-206.
- MARTÍN-CERECEDA, M., ZAMORA, J., PEREZ-ZU, B., GUINEA, A. (2002b): Ciliate communities of rotating biological contactor biofilms: a multivariate approach. *Systematic and Applied Microbiology*, 25: 301-313.
- MBA, D., BANNISTER, R.H., FINDLAY, G.E. (1999): Mechanical redesign of the rotating biological contactor. *Water Research*, 33(18): 3679-3688.
- MCCCLUSKEY, C., QUINN J.P., MCGRATH, J.W. (2005): An evaluation of three new-generation tetrazolium salts for the measurement of respiratory activity in activated sludge microorganisms. *Microbial Ecology*, 49: 379-387.
- MENG, Q.E., GANCZARCZYK, J. (2004): Full scale comparison of heterotrophic and nitrifying RBC biofilms. *Environmental Technology*, 25: 165-171.
- MORAN, M.A., TORSVIK, V.L., TORSVIK, T., HODSON, R.E. (1993): Direct extraction and purification of rRNA for ecological studies. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3): 915-918.
- MORGENROTH, E., WILDERER, P.A. (2000): Influence of detachment mechanisms on competition in biofilms. *Water Research*, 34(2): 417-426.
- MUDRACK, K., KUNST, S. (1994): *Biologie der Abwasserreinigung*. Fischer Verlag, Stuttgart.
- MUDRACK, K., KUNST, S. (2003): *Biologie der Abwasserreinigung*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg Berlin.

- MUTTRAY, A.F., MOHN, W.W. (1998): RNA/DNA ratio as an indicator of metabolic activity in resin acid-degrading bacteria. *Water Science and Technology*, 37(4-5): 89-93.
- NAJAFPOUR, G.D., ZINATIZADEH, A.A.L., LEE, L.K. (2006): Performance of a three-stage aerobic RBC reactor in food canning wastewater treatment. *Biochemical Engineering Journal*, 30: 297-302.
- NEU, K.E. (1994): Upgrading of rotating biological contactor (RBC) systems to achieve higher effluent quality, including biological nutrient enrichment and reduction techniques. *Water Science and Technology*, 29(12): 197-206.
- NISHIDOME, K., KUSUDA, T., WATANABE, Y., YAMAUCHI, M., MIHARA, M. (1994): Determination of oxygen transfer rate to a rotating biological contactor by microelectrode measurement. *Water Science and Technology*, 29(10-11): 471-477.
- NOVAK, J.T. (1974): Temperature-substrate interactions in biological treatment. *Journal of Water Pollution Control Federation*, 46(8): 1984-1994.
- NOWAK, O., SCHWEIGHOFER, P., NIKOLAVCIC, B. (1998): Aspekte zweistufiger Verfahren und von Biofilmverfahren. Institut für Wassergüte und Abfallwirtschaft der TU-Wien. *Wiener Mitteilungen*, 145: 411-466.
- OBST, U. (1995): *Enzymatische Tests für die Wasseranalytik*. R. Oldenbourg Verlag, München.
- OBST, U. (1999): *Biochemische Beurteilung der Wasserqualität am Beispiel mikrobiologischer Parameter*. Habilitationsschrift. Universität Karlsruhe.
- OBST, U., SCHMITZ, W. (1983): Biochemische Methoden zur Untersuchung von Stoffwechselaktivitäten in Sediment und Schlamm. *Vom Wasser*, 61: 187-198.
- OGA, T., SUTHERSAN, S., GANCZARCYK, J.J. (1991): Some properties of aerobic biofilms. *Environmental Technology*, 12(5): 431-440.
- PACKARD, T.T., GARFIELD, P.C., MARTINEZ, R. (1983): Respiration and respiratory enzyme activity in aerobic and anaerobic cultures of the marine denitrifying bacterium, *Pseudomonas perfectomarinus*. *Deep-Sea Research*, 30: 227-243.
- PANO, A., REYNOLDS, J.H., MIDDLEBROOKS, E.J. (1980): The kinetics of rotating biological contactor treating domestic sewage. Vol. 1: 449-467. First National Symposium Rotating Biological Contactor Technology, Champion, Pennsylvania.
- PARAMONOVA, E., DE JONG, E.D., KROM, B.P., VAN DER MEI, H.C., BUSSCHER, H.J., SHARMA, P.K. (2007): Low-load compression testing: a novel way of measuring biofilm thickness. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(21): 7023-7028.
- PAUL, E.A., CLARK, F.E. (1996): *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press Inc., San Diego London (u.a.).
- PESCOD, M.B., NAIR, J.V. (1972): Biological disc filtration for tropical waste treatment - experimental studies. *Water Research*, 6(12): 1509-1523.
- PEYTON, B.M. (1996): Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density. *Water Research*, 30(1): 29-36.

- PN-82/C-04616.08 (1983): Woda i ścieki - Badania specjalne osadów - Oznaczenie aktywności dehydrogenaz w osadzie czynnym metodą spektrofotometryczną z TTC.
- POSCH, T., PERNTHALER, J., ALFREIDER, A., PSENNER, R. (1997): Cell-specific respiratory activity of aquatic bacteria studied with the tetrazolium reduction method, cyto-clear slides, and image analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3): 867-873.
- PYNAERT, K., SMETS, B.F., WYFFELS, S., BEHEYDT, D., SICILIANO, S.D., VERSTRAETE, W. (2003): Characterization of an autotrophic nitrogen-removing biofilm from a highly loaded lab-scale rotating biological contactor. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(6): 3626-3635.
- QING, T., JIHUA, C., HUA, Z., YUNAN, X. (2006): Study on the modified tetrazolium chloride - dehydrogenase activity (TTC-DHA) method in determination of bioactivity in the up-flow aerated bio-activated carbon filter. *African Journal of Biotechnology*, 5(2): 181-188.
- RADWAN, K.H., RAMANUJAM, T.K. (1997): Influence of COD/NH₃-N ratio on organic removal and nitrification using a modified RBC. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 16(2): 77-81.
- REICHARDT, W. (1978): Einführung in die Methoden der Gewässermikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
- RHEINHEIMER, G., HEGEMANN, W., RAFF, J., SEKOULOV, I. (1988): Stickstoffkreislauf im Wasser. Stickstoffumsetzungen in natürlichen Gewässern in der Abwasserreinigung und Wasserversorgung. R. Oldenbourg Verlag, München Wien.
- RICH, P.R., MISCHIS, L.A., PURTON, S., WISKICH, J.T. (2001): The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiology Letters*, 202: 181-187.
- RITTMANN, B.E., TRINET, F., AMAR, D., CHANG, H.T. (1992): Measurement of the activity of a biofilm: effects of surface loading and detachment on a three-phase liquid-fluidized-bed reactor. *Water Science and Technology*, 26(3-4): 585-594.
- RODE, A. (2004): Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen. Dissertation. Universität Duisburg-Essen.
- ROEHM, N.W., RODGERS, G.H., HATFIELD, S.M., GLASEBROOK, A.L. (1991): An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilising the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods*, 142(2): 257-265.
- ROMANÍ, A.M., SABATER, S. (2001): Structure and activity of rock and sand biofilms in a mediterranean stream. *Ecology*, 82(11): 3232-3245.
- ROSLEV, P., KING, G.M. (1993): Application of tetrazolium salt with a water-soluble formazan as indicator of viability in respiring bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(9): 2891-2896.
- RÖSKE, I., UHLMANN, D. (2005): Biologie der Wasser- und Abwasserbehandlung. Verlag Eugen Ulmer, Stuttgart.
- RYSSOV-NIELSEN, H. (1975): Measurement of the inhibition of respiration in activated sludge by a modified determination of the TTC-dehydrogenase activity. *Water Research*, 9(12): 1179-1185.

- SAATHOFF, H. (1998): Die Bestimmung der Schlammaktivität. Analyse mit dem Dr. Lange Küvetten-Test. Anwendungsbericht Ch. No. 64.
- SCHAULE, G., FLEMMING, H.-C. (1994): Mikrobielle Werkstoffzerstörung - Biofilm und Biofouling: Quantifizierung atmungsaktiver Bakterien in Wasser und in Biofilmen mit einem fluoreszierenden Redox-Farbstoff. *Werkstoffe und Korrosion*, 45: 54-57.
- SCHMID-SCHMIEDER, V. (2001): Vergleich der Leistungsfähigkeit von Biofilmverfahren bei Sanierungen bzw. Erweiterungen von kommunalen Kläranlagen. Schriftenreihe des ISWW der Universität Karlsruhe (TH), Bd. 104. Institutverlag-Siedlungswasserwirtschaft, Karlsruhe.
- SCHRIMPF, G. (2002): Gentechnische Methoden: eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- SCHWARZ, M. (2004): Mikrobielle Kolmation von abwasserdurchsickerten Bodenkörpern: Nucleinsäuren zum Nachweis von Biomasse und Bioaktivität. Schriftenreihe des ISWW der Universität Karlsruhe (TH), Bd. 116. Institutverlag-Siedlungswasserwirtschaft, Karlsruhe.
- SCHWARZ, M., FUCHS, S. HAHN, H.H. (2006): Nucleic acids: indicators for dynamic processes of clogging in soil filter systems. *Water Science and Technology*, 54(11-12): 183-189.
- SEKOULOV, I., BRINKE-SEIFERTH, S., BEHRENDT, J. (1997): Technische Grundlagen von Festbettreaktoren. In: 26. Abwassertechnisches Seminar Biofilm-Technologie zur Reinigung kommunaler Abwässer: Mode oder Moderne? Berichte aus Wassergüte- und Abfallwirtschaft. Technische Universität München.
- SILYN-ROBERTS, G., LEWIS, G. (1997): A technique in confocal laser microscopy for establishing biofilm coverage and thickness. *Water Science Technology*, 36(10): 117-124.
- SPRING, S., SCHULZE, R., OVERMANN, J., SCHLEIFER, K.-H. (2000): Identification and characterization of ecologically significant prokaryotes in the sediment of freshwater lakes: molecular and cultivation studies. *FEMS Microbiology Reviews*, 24: 573-590.
- STAUDT, C., HORN, H., HEMPEL, D.C., NEU, T.R. (2004): Volumetric measurements of bacterial cells and extracellular polymeric substance glycoconjugates in biofilms. *Biotechnology and Bioengineering*, 88(5): 585-592.
- STENTELAIRE, C., ANTOINE, N., CABROL, C., FERON, G., DURAND, A. (2001): Development of a rapid and highly sensitive biochemical method for the measurement of fungal spore viability. An alternative to the CFU method. *Enzyme and Microbial Technology*, 29: 560-566.
- TAWFIK, A., TEMMINK, H., ZEEMAN, G., KLAPWIJK, B. (2006): Sewage treatment in rotating biological contactor (RBC) system. *Water, Air, and Soil Pollution*, 175: 275-289.
- TÓTH, L.G., CARRILLO, P., CRUZ-PIZARRO, L. (1995): Respiratory electron transport system (ETS)-activity of the plankton and biofilm in the high-mountain lake La Caldera (Sierra Nevada, Spain). *Archiv für Hydrobiologie*, 135(1): 65-78.
- TREVORS, J.T., MAYFIELD, C.I., INNIS, W.E. (1982): Measurement of electron transport system (ETS) activity in soil. *Microbial Ecology*, 8: 163-168.

- VENKATARAMAN, R., RAMANUJAM, T.K., JAGANNATH, S. (1997): Identification of microorganisms in the biological slime layer of rotating biological contactors. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 17(5): 323-327.
- WEDDLE, C.L., JENKINS, D. (1971): The viability and activity of activated sludge. *Water Research*, 5(8): 621-640.
- YIN, J., TAN, X.J, REN, N.Q., CUI, Y.B., TANG, L. (2005): Evaluation of heavy metal inhibition of activated sludge by TTC and INT-electron transport system activity tests. *Water Science and Technology*, 52(8): 231-239.
- YU, Z., MOHN, W.W. (1999): Killing two birds with one stone: simultaneous extraction of DNA and RNA from activated sludge biomass. *Canadian Journal of Microbiology*, 45: 269-272.
- ZAHID, W., GANCZARCZYK, J. (1994a): Fractal properties of the RBC biofilm structure. *Water Science and Technology*, 29(10-11): 271-279.
- ZAHID, W., GANCZARCZYK, J. (1994b): A technique for a characterisation of RBC biofilm surface. *Water Research*, 28(10): 2229-2231.
- ZHANG, T.C., FU, C., BISHOP, P.L. (1994): Competition in biofilms. *Water Science and Technology*, 29(10-11): 263-270.
- ZILOUEI, H., SOARES, A., MURTO, M., GUIEYSSE, B., MATTIASSON, B. (2006): Influence of temperature on process efficiency and microbial community response during the biological removal of chlorophenols in a packed-bed bioreactor. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 72: 591-599.

Schriftenreihe SWW - Karlsruhe

Bisher aus der Arbeit am Institut erschienen

- [1] KARPE, H.-J.: Zur Wirtschaftlichkeit bei der Planung von Fernwasserversorgungen. Karlsruhe 1969 (Eigenverlag des Verfassers).
- [2] PÖPEL, J.: Schwankungen von Kläranlagenabläufen und ihre Folgen für Grenzwerte und Gewässerschutz. GWF, Schriftenreihe Wasser - Abwasser, 16. Oldenbourg Verlag, München 1971.
- [3] MEIER, P.M.: Möglichkeiten zur technischen und wirtschaftlichen Optimierung von Zweckverbänden. Wasser und Abwasser in Forschung und Praxis, Bd. 4. Erich Schmidt Verlag, Bielefeld 1972.
- [4] ABENDT, R.; AHRENS, W.; CEMBROWICZ, R.G.; HAHN, H.H.; KNOBLAUCH, A.; ORTH, H.: Operations Research und seine Anwendung in der Siedlungswasserwirtschaft I. Wasser und Abwasser in Forschung und Praxis, Bd. 5. Erich Schmidt Verlag, Bielefeld 1972.
- [5] NOLL, K.: Untersuchungen zur Grundwasserentnahme aus den pleistozänen Sedimenten des Rheintalgrabens im Rhein-Neckar-Raum. Karlsruhe 1972 (Eigenverlag des Verfassers).
- [6] NEIS, U.: Experimentelle Bestimmung der Stabilität anorganischer Schwebstoffe in natürlichen Gewässern. Karlsruhe 1974 (Eigenverlag des Verfassers).
- [7] AHRENS, W.: Optimierungsverfahren zur Lösung nichtlinearer Investitionsprobleme - angewandt auf das Problem der Planung regionaler Abwasserentsorgungssysteme. Quantitative Methoden der Unternehmensplanung, Bd. 4. Verlag Meisenheim/Glahn 1975.
- [8] ORTH, H.: Verfahren zur Planung kostenminimaler regionaler Abwasserentsorgungssysteme. Wasser und Abwasser in Forschung und Praxis, Bd. 9. Erich Schmidt Verlag, Bielefeld 1975.
- [9] MOSEBACH, K.G.: Phosphatrücklösung bei der Ausfällung von Simultanschlamm. Wasser und Abwasser in Forschung und Praxis, Bd. 11. Erich Schmidt Verlag, Bielefeld 1975.
- [10] AHRENS, W.; CEMBROWICZ, R.G.; DEHNERT, G.; HEISS, H.-J.; HAHN, H.H.; HENSELEIT, H.J.; ORTH, H.; SENG, H.J.: Operations Research und seine Anwendung in der Siedlungswasserwirtschaft II. Wasser und Abwasser in Forschung und Praxis, Bd. 12. Erich Schmidt Verlag, Bielefeld 1976.
- [11] DEHNERT, G.: Regionale Planung der Standorte für Abwasserbehandlungsanlagen mit Hilfe graphentheoretischer Algorithmen. Abfallwirtschaft in Forschung und Praxis, Bd. 1. Erich Schmidt Verlag, Bielefeld 1976.
- [12] HAHN, H.H. (Hrsg.): Umweltschutz im Bereich des Wasserbaus. Wasser und Abwasser in Forschung und Praxis, Bd. 14. Erich Schmidt Verlag, Bielefeld 1976.
- [13] JØRGENSEN, S.E.: Reinigung häuslicher Abwässer durch Kombination eines chemischen Fällungs- und Ionenaustauschverfahrens. Karlsruhe 1976 (Eigenverlags des Verfassers).

- [14] RUF, J.: Gewässergütesimulation unter Berücksichtigung meteorologischer Einflüsse. Prognostisches Modell Neckar, Bericht 16. Dornier System. Friedrichshafen 1977.
- [15] AHRENS, W.; DEHNERT, G.; DURST, F.; GERBER, J.; HAHN, H.H.; PAESSENS, H.; WEUTHEN, H.K.: Tourenplanung bei der Abfallbeseitigung. Abfallwirtschaft in Forschung und Praxis, Bd. 3. Erich Schmidt Verlag, Bielefeld 1977.
- [16] KLUTE, R.: Adsorption von Polymeren an Silikaoberflächen bei unterschiedlichen Strömungsbedingungen. Karlsruhe 1977 (Eigenverlag des Verfassers).
- [17] KNOBLAUCH, A.: Mathematische Simulation des Phosphorkreislaufs in einem gestauten Gewässer. GWF, Schriftenreihe Wasser- Abwasser, Bd. 17. Oldenbourg Verlag, München 1978.
- [18] ABENDT, R.: Aussagefähigkeit von Sauerstoffhaushaltsrechnungen. Hochschulsammlung Ingenieurwissenschaft, Wasserwirtschaft, Bd. 1. Hochschulverlag, Stuttgart 1978.
- [19] SENG, H.J.: Systematische Beurteilung der Umweltverträglichkeit bei Abfalldeponiestandorten. Hochschulsammlung Ingenieurwissenschaft, Abfallwirtschaft, Bd. 2. Hochschulverlag, Stuttgart 1979.
- [20] INSTITUT FÜR SIEDLUNGSWASSERWIRTSCHAFT: Fortschritte bei der Anwendung von Flockungsverfahren in der Abwassertechnologie. 2. Verfahrenstechnisches Seminar. Karlsruhe 1979 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [21] HAHN, H.H. (Hrsg.): Von der Abfallbeseitigung zur Abfallwirtschaft, Fachkolloquium zu Ehren von Prof. Dr.-Ing. Hans Straub, Karlsruhe 1980 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [22] INSTITUT FÜR SIEDLUNGSWASSERWIRTSCHAFT: Planung und Organisation von Einzelkläranlagen und Gruppenkläranlagen, 6. Planungstechnisches Seminar. Karlsruhe 1980 (Eigenverlag des Instituts).
- [23] KÄSER, F.: Transport suspendierter Feststoffe in Fließgewässern. Karlsruhe 1981 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [24] EPPLER, B.: Aggregation von Mikroorganismen. Karlsruhe 1981 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [25] INSTITUT FÜR SIEDLUNGSWASSERWIRTSCHAFT: Fortschritte bei der Anwendung des Flotationsverfahrens in der kommunalen Abwasserreinigung, 3. Verfahrenstechnisches Seminar. Karlsruhe 1981 (Eigenverlag des Instituts).
- [26] PAESSENS, H.: Tourenplanung bei der regionalen Hausmüllentsorgung. Karlsruhe 1981 (Eigenverlag des Instituts).
- [27] KIEFHABER, K.P.: Versuchsanlagen zur Entspannungsflotation von Abwasser - Vergleich von Versuchsergebnissen. Karlsruhe 1982 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [28] HAHN, H.H.; SENG, H.J. (Hrsg.): Wirtschaftlichkeit in der Abfallwirtschaft. Karlsruhe 1982 (Eigenverlag des Instituts).
- [29] HAHN, H.H.; PAESSENS, H. (Hrsg.): Tourenplanung in der Abfallwirtschaft II. Karlsruhe 1982 (Eigenverlag des Instituts).
- [30] DICKGIESSER, G.: Betriebssichere und wirtschaftliche Klärschlamm Entsorgung. Karlsruhe 1982 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [31] HAHN, H.H. (Hrsg.): Wasserversorgung und Abwasserbehandlung in Entwicklungsländern. Karlsruhe 1982 (Eigenverlag des Instituts).

- [32] HAHN, H.H. (Hrsg.): Schlämme aus der Abwasserfällung/-flockung. Karlsruhe 1983 (Eigenverlag des Instituts).
- [33] v. FALKENHAUSEN, K.: Planung eines Entsorgungssystems für die Klärschlammbehandlung. Karlsruhe 1983 (Eigenverlag des Instituts).
- [34] HEISS, H.-J.: Stabilität kostenminimaler Lösungen bei der Planung von Abwasserentsorgungssystemen. Karlsruhe 1983 (Eigenverlag des Instituts).
- [35] HAHN, H.H. (Hrsg.): Planung im Gewässerschutz unter besonderer Berücksichtigung von Flussgebietsmodellen. Karlsruhe 1984 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [36] BANTZ, I.: Ein Rechenverfahren zur Darstellung der Auswirkungen von Stoßbelastungen auf die Qualität von Fließgewässern. Karlsruhe 1985 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [37] LÖHR, J.: Einfluss der Tiefendurchmischung auf die Entwicklung von Phytoplankton - dargestellt am Beispiel des Maines. Karlsruhe 1984 (Eigenverlag des Instituts).
- [38] TROUBOUNIS, G.: Strukturorientierte Simulation des Kohlenstoff, Stickstoff-, Phosphor- und Sauerstoffhaushaltes flacher Gewässer. Karlsruhe 1985 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [39] DITTRICH, A.: Transport und Sedimentation organischer Stoffe in Abwasserteichen. Karlsruhe 1985 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [40] GROHMANN, A.; HAHN, H.H.; KLUTE, R. (Hrsg.): Chemical Water and Wastewater Treatment. Practical Experience and New Concepts. Proceedings from the 1st Gothenburg Symposium, 1984. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, 1985 (vergriffen).
- [41] HAHN, H.H.; NEIS, U. (Hrsg.): Belastungsschwankungen auf Kläranlagen: Auswirkungen und Möglichkeiten zur Reduktion, insbesondere durch Chemikalieneinsatz. Karlsruhe 1985 (Eigenverlag des Instituts).
- [42] SCHMITT, T.G.: Der instationäre Kanalabfluss in der Schmutzfrachtmodellierung. Karlsruhe 1985 (Eigenverlag des Instituts, 2. Auflage).
- [43] IOSSIFIDIS, V.: Die Rolle der Ablagerungen bei der Schmutzfrachtberechnung in Kanalisationsnetzen. Karlsruhe 1985 (Eigenverlag des Instituts, 2. Auflage).
- [44] SCHMITT, T.G.; HAHN, H.H. (Hrsg.): Schmutzfrachtberechnung für Kanalisationsnetze. Karlsruhe 1986 (Eigenverlag des Instituts, 2. Auflage).
- [45] DÖLL, B.: Die Kompensation der Oberflächenladung kolloidaler Silika-Suspensionen durch die Adsorption kationischer Polymere in turbulent durchströmten Rohrreaktoren. Karlsruhe 1986 (Eigenverlag des Instituts).
- [46] MERTSCH, V.: Sedimentation, Eindickung und Entwässerung von Fällungs-/Flockungsschlämmen. Karlsruhe 1987 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [47] KORDES, B.: Berechnung der Energiebilanz von Kläranlagen unter Berücksichtigung zeitlicher Schwankungen. Karlsruhe 1987 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [48] GEPPERT, B.: Tourenplanung bei der innenstädtischen Hausmüllentsorgung. Karlsruhe 1987 (Eigenverlag des Instituts).
- [49] GUTEKUNST, B.: Sielhautuntersuchungen zur Einkreisung schwermetallhaltiger Einleitungen. Karlsruhe 1988 (Eigenverlag des Instituts).

- [50] HAHN, H.H.; KLUTE, R.; BALMER, P. (Hrsg.): Recycling in Chemical Water and Wastewater Treatment. Proceedings from the 2nd international Gothenburg Symposium. Karlsruhe 1986 (Eigenverlag des Instituts).
- [51] HAHN, H.H.; PFEIFER, R.; (Hrsg.): Abwasserreinigung in Entwicklungsländern mit besonderer Berücksichtigung der Industrie. Karlsruhe 1987 (Eigenverlags des Instituts).
- [52] HOFFMANN, E.: Strömungsstrukturen in Flockungsreaktoren. (in Vorbereitung).
- [53] HAHN, H.H.; PFEIFER, R. (Hrsg.): Fällung/Flockung - Erfahrungen aus Labor und Praxis. Karlsruhe 1990 (Eigenverlag des Instituts).
- [54] KRÜGER, E.M.: Stabilität mineralischer Basisabdichtungen von Hausmülldeponien bezüglich des Ausbreitungsverhaltens anorganischer Schadstoffe. Karlsruhe 1989 (Eigenverlag des Instituts).
- [55] SISKOS, D.: Kläranlagenauslegung für stehende Vorfluter. Karlsruhe 1989 (Eigenverlag des Instituts).
- [56] HOU, R.: Kontrollstrategien für Fällung und Flockung auf Kläranlagen mit einem Vorhersagemodell der Zu- und Abflauracht. Karlsruhe 1990 (Eigenverlag des Instituts).
- [57] XANTHOPOULOS, C.: Methode für die Entwicklung von Modellregenspektren für die Schmutzfrachtberechnung. Karlsruhe 1990 (Eigenverlag des Instituts).
- [58] HAHN, H.H.; XANTHOPOULOS, C. (Hrsg.): Schadstoffe im Regenabfluss aus städtischen Gebieten - Präsentation eines BMFT - Verbundprojektes. Karlsruhe 1990 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).
- [59] LEE, C.-M.: Tone zur physikalisch-chemischen Abwasserreinigung. Karlsruhe 1990 (Eigenverlag des Instituts).
- [60] HARTMANN, K.-H.: Anaerobe Behandlung von Sickerwässern aus Hausmülldeponien. Karlsruhe 1991 (Eigenverlag des Instituts).
- [61] HAHN, H.H.; PFEIFER, R. (Hrsg.): Vor-, Simultan- oder Nachfällung? - Entscheidungskriterien für Planung, Entwurf und Betrieb. Karlsruhe 1991 (Eigenverlag des Instituts).
- [62] LEONHARD, D.: Eindickung und Entwässerung als Konsolidierungsvorgang. Karlsruhe 1992 (Eigenverlag des Instituts).
- [63] WEISSER, M.: Untersuchungen zur Belastung kommunaler Klärschlämme durch organische Schadstoffe - Abschlußbericht zum BMFT-Forschungsvorhaben 02 WS 464/8. Karlsruhe 1992 (Eigenverlag des Instituts, 2. Auflage).
- [64] HAHN, H.H.; XANTHOPOULOS, C. (Hrsg.): Schadstoffe im Regenabfluss II. Präsentation des BMFT-Verbundprojektes. Karlsruhe 1992 (Eigenverlag des Instituts, 2. Auflage).
- [65] HAHN, H.H.; PFEIFER, R. (Hrsg.): Sanierung von Kläranlagen. Karlsruhe 1992 (Eigenverlag des Instituts).
- [66] DÜRETH-JONECK, S.: Entwicklung eines naturnahen, praxisorientierten. Mobilitätstests für Schwermetalle und Arsen in kontaminierten Böden. Karlsruhe 1993 (Eigenverlag des Instituts).
- [67] HAHN, H.H.; TRAUTH, R. (Hrsg.): Fällungs-/Flockungschemikalien. Anforderungen, Angebot, Auswahl und Qualität. Karlsruhe 1993 (Eigenverlag des Instituts, vergriffen).

- [68] HAHN, H.H.; TRAUTH, R. (Hrsg.): Wechselwirkungen der biologischen und chemischen Phosphorelimination. Karlsruhe 1993 (Eigenverlag des Instituts).
- [69] LANGER, S.J.: Struktur und Entwässerungsverhalten polymergeflockter Klärschlämme. Karlsruhe 1994 (Eigenverlag des Instituts).
- [70] MÜLLER, N.: Gewässergütemodellierung von Fließgewässern unter Berücksichtigung qualitativer, quantitativer, flächenhafter und sozioökonomischer Informationen. Karlsruhe 1994 (Eigenverlag des Instituts).
- [71] HAHN; H.H.; TRAUTH, R. (Hrsg.): Klärschlamm - Ressource oder kostenintensiver Abfall? Karlsruhe 1994 (Eigenverlag des Instituts).
- [72] MIHOPULOS, J.: Wechselwirkung Flockenbildung - Flockenabtrennung unter Berücksichtigung der Durchströmungsmuster in Sedimentations- und Flotationsbecken. München 1995 (Oldenbourg Verlag).
- [73] XANTHOPOULOS, C.; HAHN, H.H. (Hrsg.): Schadstoffe im Regenabfluss III. München 1995 (Oldenbourg Verlag).
- [74] HAHN, H.H.; TRAUTH, R. (Hrsg.): Wirtschaftlichkeitsfragen in der Abwasserreinigung. München 1995 (Oldenbourg Verlag).
- [75] SCHMID, K.: Tensidunterstützte und biologische Sanierung der Feinkornfraktion aus der Bodenwäsche bei kohlenwasserstoffhaltigen Altlasten. München 1996 (Oldenbourg Verlag).
- [76] HÖLZER, D.: EDV-gestützte Planung von Belebtschlammanlagen unter Berücksichtigung betrieblicher Aspekte. München 1996 (Oldenbourg Verlag).
- [77] HARITOPULOU, T.: Polycyclische Aromatische Kohlenwasserstoffe und Schwermetalle in urbanen Entwässerungssystemen - Aufkommen, Transport und Verbleib. München 1996 (Oldenbourg Verlag).
- [78] HAHN, H.H.; TRAUTH, R.: Wechselwirkung zwischen Einzugsgebiet und Kläranlage. München 1996 (Oldenbourg Verlag).
- [79] FUCHS, S.: Wasserwirtschaftliche Konzepte und ihre Bedeutung für die Ökologie kleiner Fließgewässer - Aufgezeigt am Beispiel der Mischwasserbehandlung. München 1997 (Oldenbourg Verlag).
- [80] BEUDERT, G.: Gewässerbelastung und Stoffaustrag von befestigten Flächen in einem kleinen ländlichen Einzugsgebiet. München 1997 (Oldenbourg Verlag).
- [81] WITT, P.CH.: Untersuchungen und Modellierungen der biologischen Phosphatelimination in Kläranlagen. München 1997 (Oldenbourg Verlag).
- [82] PSCHERA, S.: Abwasserbehandlung mit Ozon: Klassifizierung von Abwasser zur optimierten Verfahrensgestaltung in der Kreislaufwirtschaft. München 1997 (Oldenbourg Verlag).
- [83] TRAUTH, R.: Lokalisierung von Grundwasserschadstoffquellen in urbanen Räumen. München 1998 (Oldenbourg Verlag).
- [84] JAKOBS, J.: Quantifizierung der Wirkung von Kanalnetzbewirtschaftungsmaßnahmen mit Hilfe des detailliert hydrodynamischen Schmutzfrachtmodells HAuSS. München 1998 (Oldenbourg Verlag).
- [85] XANTHOPOULOS, C.: Stoffströme in der Urbanhydrologie Teil 1 - Oberfläche. München 1998 (Oldenbourg-Verlag).

- [86] SCHMITT, T.G.: Stoffströme in der Urbanhydrologie Teil 2 - Kanalisation. München 1997 (Oldenbourg Verlag).
- [87] SEYFRIED, C.F.: Stoffströme in der Urbanhydrologie Teil 3 - Kläranlage. München 1998 (Oldenbourg Verlag).
- [88] HAHN, H.H.; SCHÄFER, M. (Hrsg.): Stoffströme in der Urbanhydrologie Teil 4 - Emission/Immission. München 1998 (Oldenbourg Verlag).
- [89] HAHN, H.H.; WILHELMI, M.: Abwasserreinigung - Reststoffproblem oder Sekundärrohstoffquelle. München 1997 (Oldenbourg Verlag).
- [90] SCHULZ, ST.: Der Kanal als Reaktor: Neubildung von AOX durch Wirkstoffe in Reinigungsmitteln. München 1998 (Oldenbourg Verlag).
- [91] WOLTER, CH.: Steuer- und Regelkonzepte der Vorklärung unter Einbeziehung der Vorfällung/Flockung und Schlammhydrolyse. München 1998 (Oldenbourg Verlag).
- [92] PFEIFER, R.: Schmutzstoffrückhalt durch chemisch/physikalische Regenwasserbehandlung im Trennsystem. München 1998 (Oldenbourg Verlag).
- [93] LIN, L.Q.: Entstabilisierung und Aggregation von Silika und Huminsäure mit Aluminiumsalzen in turbulenten Rohrströmungen. München 1998 (Oldenbourg Verlag).
- [94] HAHN, H.H.; WILHELMI, M. (Hrsg.): Abwasserfällung- und Flockung. München 1998 (Oldenbourg Verlag).
- [95] HUPPERT, N.: Elimination von Ibuprofen und NBBS in kommunalen Kläranlagen analysiert mittels Festphasenmikroextraktion. München 1999 (Oldenbourg Verlag).
- [96] FUCHS, S.; HAHN, H.H. (Hrsg.): Schadstoffstoffe im Regenabfluss IV. Abschlusspräsentation des BMBF-Verbundprojektes NIEDERSCHLAG. München 1999 (Oldenbourg Verlag).
- [97] SCHÄFER, M.: Regionalisierte Stoffstrombilanzen in städtischen Einzugsgebieten - Möglichkeiten, Probleme und Schlussfolgerungen.
- [98] HAHN, H.H.; KRAUS, J. (Hrsg.): Technologische Aspekte der Wasser-, Abwasser- und Schlammbehandlung. Karlsruhe 1999 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [99] KISHI, R.T.: Einzugsgebietseigenschaften und Fließgewässergüte (Modellierung stofflicher Parameter mit Hilfe raumbezogener Daten). Karlsruhe 2000 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [100] NAUDASCHER, I.: Kompostierung menschlicher Ausscheidungen durch Verwendung biologischer Trockentoiletten - mit besonderer Berücksichtigung des Kleingartenbereichs. Karlsruhe 2001 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [101] ANDERS, G.: Der Einsatz von Scheibentauchkörpern zur Güllebehandlung mit dem Ziel der weitergehenden Nährstoffreduktion. Karlsruhe 2002 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [102] WITTLAND, C.: Angepasste Verfahren zur Industrieabwasserreinigung - Modell zur Verfahrensauswahl. Karlsruhe 2000 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).

- [103] HAHN, H.H.; KRAUS, J. (Hrsg.): Projektmanagement, Maschinentechnik und gesetzliche Vorgaben. Karlsruhe 2000 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [104] SCHMID-SCHMIEDER, V.: Vergleich der Leistungsfähigkeit von Biofilmverfahren bei Sanierungen bzw. Erweiterungen von kommunalen Kläranlagen. Karlsruhe 2001 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [105] HAHN, H.H.; KRAUS, J.: Geruchsemissionen. Karlsruhe 2001 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [106] ANTUSCH, E.: Lokalisierung organischer Schadstoffemissionen durch Sielhautuntersuchungen. Karlsruhe 2002 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [107] OBERACKER, F.E.: Verwendung und Entsorgung arsenhaltiger Wasserwerkschlämme. Karlsruhe 2002 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [108] HAHN, H.H.; KRAUS, J.: Bläh- und Schwimmschlamm. Karlsruhe 2002 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [109] HITZLER, A.: Beurteilung und Optimierung von Sandwaschanlagen auf Kläranlagen. Karlsruhe 2002 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [110] KLINGEL, M.: Prozess-Simulation in der Abwasser- und Abfallbehandlung. Karlsruhe 2003 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [111] SONG, Y.: Precipitation Chemistry of Calcium Phosphate for Phosphorous Recovery. Karlsruhe 2003 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [112] KRAUS, J.: Herstellung von Leichtzuschlagstoffen aus Klärschlamm. Karlsruhe 2003 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [113] ZHANG, P.: Herstellung und Charakterisierung und Wirksamkeit polymerer anorganischer Flockungsmittel. Karlsruhe 2003 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [114] HAHN, H.H.; KRAUS, J.: Wertschöpfung durch Betriebsoptimierung. Karlsruhe 2003 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [115] LUCAS, S.: Auftreten, Ursachen und Auswirkungen hoher Fremdwasserabflüsse - eine zeitliche und räumliche Analyse. Karlsruhe 2003 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [116] SCHWARZ, M.: Mikrobielle Kolmation von abwasserdurchsickerten Bodenkörpern: Nucleinsäuren zum Nachweis von Biomasse und Bioaktivität. Karlsruhe 2004 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [117] HOLZ, A.: Immissionsorientierte Bilanzierung punktueller und diffuser Schwermetallfrachten. Karlsruhe 2004 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [118] HAHN, H.H.; KEGEBEIN, J.: Auf dem Weg zur Kläranlage von morgen. Karlsruhe 2004 (Universität Karlsruhe - Institutsverlag Siedlungswasserwirtschaft).
- [119] BUTZ, J.: Stoffstrombilanzen für Phosphor und sechs Schwermetalle am Beispiel des oberen Kraichbachs. Karlsruhe 2005 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).

- [120] MAHMUTSPAHIĆ, Z.: Projektfinanzierung - ein PPP Modell für internationale Siedlungswasserwirtschaftliche Projekte. Karlsruhe 2005 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [121] HAHN, H.H.; FRIEDRICH, K.: Chemikalien in der Abwasserbehandlung - was haben wir dazugelernt? Karlsruhe 2005 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [122] KEGEBEIN, J.: Die Verwendung von Küchenabfallzerkleinern (KAZ) aus abwasser- und abfallwirtschaftlicher Sicht. Karlsruhe 2006 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [123] HAHN, H.H., HOFFMANN, E., BLANK, A.: Abwasserproblemstoffe - Erfahrungen mit neuen Produkten und Technologien. Karlsruhe 2006 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [124] KPONGBENGA, K.: Wasserver- und Entsorgung in der Stadt Lomé/Togo: Analysen, Beiträge und Konzepte. Karlsruhe 2006 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [125] BEKKER, M.: Charakterisierung der anaeroben Abbaubarkeit von spezifischen organischen Stoffen. Karlsruhe 2007 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [126] DUTTA, S.: Mathematical Modeling of Rotating Biological Contactor for Process Optimisation in Wastewater Treatment. Karlsruhe 2007 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [127] HAHN, H.H., HOFFMANN, E., BLANK, A.: Die optimierte Kläranlage - Vision oder Realität? Karlsruhe 2007 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [128] FUCH, S.; FACH, S.; HAHN, H.H.: Stoffströme in Flussgebieten - Von der Bilanzierung zur Bewirtschaftung. Karlsruhe 2008 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [129] SCHERER, U.: Prozessbasierte Modellierung der Bodenerosion in einer Lösslandschaft. Karlsruhe 2008 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [130] BECHTEL, A.: Abschätzung regionaler Nitrateinträge in das Grundwasser unter Verwendung von N_{min} -Daten. Karlsruhe 2008 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [131] SCHEER, M.: Ermittlung und Bewertung der Wirkung der Abflusssteuerung für Kanalisationssysteme. Karlsruhe 2008 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [132] LITTY, K.: User-Oriented Wastewater Treatment Technology in Developing and Newly Industrialising Countries. Karlsruhe 2008 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [133] HOFFMANN, E., BLANK, A.: Nachhaltigkeit in der Abwasserreinigung - Der Weg ist das Ziel. Karlsruhe 2008 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [134] HILLENBRAND, T.: Analyse und Bewertung neuer urbaner Wasserinfrastruktursysteme. Karlsruhe 2009 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [135] BLANK, A.: Einfluss der Abwassertemperatur auf Bemessung, Auslegung und Reinigungsleistung von Scheibentauchkörpern. Karlsruhe 2009 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [136] TURKOVIĆ, R.: Sauerstoffregime in abwasserdurchsickerten Filtersanden. Karlsruhe 2009 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).
- [137] HOFFMANN, E., BLANK, A.: Abwasserreinigung - Perspektiven, Hilfsstoffe und neue Technologien. Karlsruhe 2009 (Verlag Siedlungswasserwirtschaft Karlsruhe).

Bestellanschrift:

Karlsruher Institut für Technologie (KIT)

Institut für Wasser und Gewässerentwicklung

Bereich Siedlungswasserwirtschaft und Wassergütewirtschaft

BIBLIOTHEK, Abteilung: Schriftenreihe

Adenauerring 20

76131 Karlsruhe

Tel.: 0721/608-2457

Fax: 0721/607151

E-Mail: kaupa@kit.edu