

Band 52

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und
der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

**Extrazelluläre polymere Substanzen aus Biofilmen –
Aufklärung von Strukturen und ihr
Einfluss auf die Foulingbildung in Membranbioreaktoren**

Ulrich-Matthias Metzger

Herausgeber
Fritz H. Frimmel

Karlsruhe 2011

Ulrich-Matthias Metzger

Extrazelluläre polymere Substanzen aus Biofilmen –
Aufklärung von Strukturen und ihr Einfluss auf die Foulingbildung in Membranbioreaktoren
Herausgeber: Fritz H. Frimmel

Band 52

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und der DVGW-Forschungsstelle am
Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
Karlsruhe 2011

ISSN: 1612-118X
Lehrstuhl für Wasserchemie und DVGW-Forschungsstelle
am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)
Engler-Bunte-Ring 1
D-76131 Karlsruhe
Tel.: +49-(0)721-608-42580
Fax: +49-(0)721-699154
E-mail: fritz.frimmel@kit.edu
<http://www.wasserchemie.ebi.kit.edu>

Titelbild: REM-Aufnahme einer gefaulten Mikrofiltrations-Hohlfasermembran, ^{13}C CPMAS NMR-Differenz-Spektrum von eEPS und Biomasse aus dem MBR UNSW.

Dieses Werk wird durch das deutsche Urheberrechtsgesetz und internationale Verträge urheberrechtlich geschützt. © 2011 Prof. Dr. F. H. Frimmel. Alle Rechte vorbehalten. All rights reserved.

Extrazelluläre polymere Substanzen aus Biofilmen – Aufklärung von Strukturen und ihr Einfluss auf die Foulingbildung in Membranbioreaktoren

zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER INGENIEURWISSENSCHAFTEN (Dr.-Ing.)

an der Fakultät für Chemieingenieurwesen und Verfahrenstechnik des
Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

genehmigte

DISSERTATION

von

Dipl.-Ing. Ulrich-Matthias Metzger

aus Bad Harzburg

Referent:	Prof. Dr. Dr. Fritz H. Frimmel
Korreferent:	Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten
Tag der mündlichen Prüfung:	14. Dezember 2010

Meinen Eltern und Großeltern

Vorwort

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit von März 2004 bis September 2009 im Bereich Wasserchemie des Engler-Bunte-Instituts der Universität Karlsruhe (TH). Sie wäre niemals ohne die vielfältige Unterstützung verschiedener Personen möglich gewesen, wofür ich mich im Folgenden recht herzlich bedanken möchte:

An erster Stelle danke ich Prof. Dr. Dr. Fritz H. Frimmel für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die hervorragenden Rahmenbedingungen und das Vertrauen, das er in mich und meine Arbeit gesetzt hat. Die Kombination exzellenter analytischer und verfahrenstechnischer Ausstattung des EBI sowie die unkomplizierte und liberale Gangart mit der Prof. Frimmel den Lehrstuhl führt, haben eine hervorragende Umgebung für diese Arbeit dargestellt.

Prof. Dr.-Ing. Clemens Posten danke ich für sein Interesse an meiner Arbeit, die fachlichen und konstruktiven Gespräche und die Übernahme des Korreferats.

Einen besonderen Dank möchte ich an Dr. Ulrich Lankes richten. Durch seine Unterstützung, seine guten und z.T. recht kritischen Ratschläge sowie seine niemals endende Geduld hat er mich in vielen Situationen nach ablenkenden Impulsen in den „relaxierten“ Zustand zurückgeführt und seinerseits durch hilfreiche Impulse zum Gelingen der Arbeit und zum tieferen Verständnis der NMR-Technologie beigetragen.

Meinem langjährigen Bürokollegen Dr. Eike ter Haseborg möchte ich für die angenehme Zeit, die vielen fachlichen wie auch fachfremden Gespräche sowie die durch seine ausgestrahlte Ruhe und Gelassenheit stets angenehme Atmosphäre im Büro danken.

In diesem Zusammenhang möchte auch meinen Kollegen Markus Ziegmann, Heiko Schwegmann, Luis Tercero, Uli Reichert, Angela Klüpfel, Carsten Jobelius, Markus Delay Florencia Saravia sowie allen anderen ehemaligen Kollegen für die angenehme Zeit bei vielen institutionellen und außer-institutionellen Veranstaltungen danken, ohne die die Routine am Institut sowie ein Blick über den Tellerrand meiner Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Weiterhin möchte ich meinen Kollegen aus dem Graduiertenkolleg 366 für deren Unterstützung und die schönen Zeiten bei diversen Seminaren danken. Dr. Birgit Gordalla möchte ich an dieser Stelle für die hervorragende Organisation und die unbürokratische Abwicklung des täglichen Graduiertenkolleg-Lebens danken, welches es mir u. a. ermöglichte, Teile der Arbeit an der University of New South Wales (UNSW) in Sydney durchzuführen.

Daher möchte ich auch einen Dank auf die andere Seite der Welt an Prof. Richard Stuetz und Dr. Pierre LeClech von der UNSW schicken und mich für die temporäre Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe, die tiefen Einblicke in die Problematik des Membranfoulings sowie für das mir mit der typisch australischen Gelassenheit entgegengebrachte Vertrauen bedanken.

Ein großer Dank gilt auch Dr. Michael Abert vom DOC-Labor Huber für die Erstellung der LC-OCD/OND-Chromatogramme und die rundum gute und angenehme Zusammenarbeit.

Ohne weitere technische Unterstützung wäre die Arbeit nicht möglich gewesen. In diesem Zusammenhang möchte ich mich herzlich bei Elly Karle und Raphael Peschke für die Aminosäure-Analytik und Matthias Weber für die LC-OCD/UV-Analysen bedanken.

Des Weiteren möchte ich Uli Reichert, Axel Heidt, Reinhard Sembritzki und Domnic Bandara für technische Unterstützung in sämtlichen Belangen danken. Manfred Hauck und Freddy Herbst aus der Institutswerkstatt danke ich für die unkomplizierte Zusammenarbeit und die perfekten Anfertigungen verschiedener Versuchsanlagen.

Volker Zibat vom Laboratorium für Elektronenmikroskopie möchte ich für REM-Aufnahmen von Membranen und dem Institut für anorganische Chemie für die unkomplizierte Durchführung der Elementaranalysen danken.

Ohne die Unterstützung studentischer Mitarbeiter und Mitarbeiterinnen wäre diese Arbeit nicht entstanden. Für ihren großen Einsatz und die Selbständigkeit, die sie in ihren Arbeiten an den Tag legten, möchte ich meinen Diplom- und Studienarbeitern Kai Fischpera, Atllia Zorkirisci, Vicky Rose, Georg Fröhlich sowie meinem HiWi Vincent Siauw danken.

Herrn Laufer von den Stadtwerken Schramberg danke ich für die wertvollen Einblicke in die Welt der kommunalen MBR-Technologie und die hilfreiche Unterstützung bei Fragen und Probenahmen vor Ort.

Neben Arbeiten zu meiner Promotion durfte ich in meiner Zeit am EBI eine Reihe weiterer wertvoller Erfahrungen sammeln und hatte die Möglichkeit über den Tellerrand der Biofilm-, NMR- und Membrantechnologie hinauszuschauen und auf diesem Weg meinen Horizont zu erweitern. Für die unkomplizierte Abwicklung und die Hilfe bei bürokratischen Fragen möchte ich mich in diesem Zusammenhang bei Dr. Gudrun Abbt-Braun bedanken.

Bei Silvia Heck und Ursula Schäfer möchte ich mich für ihr tägliches Engagement im Institutsbetrieb und darüber hinaus bedanken. Des Weiteren danke ich Dunja Haak für die Hilfe bei sämtlichen Computer-Problemen.

Ein herzlicher Dank gilt auch den beiden „Russland-Veteranen“ Axel Heidt und Herbert Metzger mit denen ich diverse Abenteuer auf gemeinsamen Russlandreisen erleben durfte. Dabei haben sie mir nicht nur die russische Kultur auf jeder Reise etwas näher gebracht, sondern auch diverse technische sowie andere fürs Leben wichtige Weisheiten vermittelt.

Ein spezieller Dank gebührt auch den „Mates“ und meinem Bruder für sämtliche Aktivitäten außerhalb meines akademischen Wirkens und den damit verbundenen, nötigen Ausgleich. Cheers Mates!

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) danke ich für die finanzielle Unterstützung im Rahmen des Graduiertenkollegs 366 „Grenzflächenphänomene in aquatischen Systemen und wässrigen Phasen“ und die Gewährung eines Reisestipendiums während meiner Zeit als Kollegiat. Des Weiteren danke ich dem Deutschen Verein des Gas- und Wasserfachs (DVGW) für weitere finanzielle Unterstützung.

Dr. Ulrich Lankes, Dr. Michael Abert, Dr. Eike ter Haseborg und Heiko Schwegmann danke ich ganz herzlich für die kritische Durchsicht der Arbeit.

Zu guter letzt danke ich ganz besonders meinen Eltern für ihre Unterstützung und das Vertrauen, das sie in mich gesetzt haben, was mir letztendlich die Durchführung dieser Arbeit erst ermöglicht hat!

Dresden im Januar 2011
Uli Metzger

1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Grundlagen.....	6
2.1. Biofilme	6
2.1.1. Vorkommen und Aufbau von Biofilmen.....	6
2.1.2. Biofilme in der Wasseraufbereitung	9
2.1.3. Modell-Biofilme.....	9
2.2. Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS).....	11
2.2.1. Zusammensetzung und Funktion von EPS.....	11
2.2.2. Lösliche mikrobielle Produkte (SMP).....	14
2.2.3. Extraktion von EPS.....	15
2.2.4. Modell-EPS	16
2.3. Physiko-chemische Charakterisierung von EPS	19
2.3.1. Elementanalyse.....	19
2.3.2. Biochemisch-photometrische Methoden	20
2.3.3. Größenausschlusschromatographie (SEC)	21
2.3.4. NMR-Spektroskopie	23
2.3.4.1. Kerndrehimpuls und Zeeman-Wechselwirkung	23
2.3.4.2. Chemische Verschiebung.....	25
2.3.4.3. Relaxation	26
2.3.4.4. Festkörper-NMR-Spektroskopie	28
2.4. Membranfiltration	31
2.4.1. Allgemeines	31
2.4.2. Membranklassifizierung	31
2.4.3. Begriffe und Kenngrößen.....	34
2.4.4. Prozessführung.....	35
2.4.5. Stofftransport in Membranen.....	38
2.4.6. Begrenzende Faktoren bei der Filtration	39
2.4.6.1. Fouling	40
2.4.6.2. Konzentrationspolarisierung	42
2.4.6.3. Widerstandsmodell	42
2.4.6.4. Kritischer Fluss	43

2.5. Membranbioreaktoren (MBR)	44
2.5.1. Aufbau und Anwendung von MBR	44
2.5.2. Vor- und Nachteile von MBR	46
2.5.3. Fouling in MBR.....	47
3. Experimentelle Vorgehensweise	49
3.1. Modell-Biofilme und EPS	49
3.1.1. Anzucht von Modell-Biofilmen	49
3.1.1.1. <i>Pseudomonas putida</i>	49
3.1.1.2. <i>Aureobasidium pullulans</i>	49
3.1.2. Verwendete Modell-EPS	50
3.2. Extraktion von EPS	50
3.2.1. Aufbereitung der EPS-haltigen Lösungen.....	51
3.3. Aufbereitung von SMP	52
3.3.1. Abtrennung von SMP	52
3.3.2. Fraktionierung von SMP mittels mehrstufiger Ultrafiltration	52
3.4. Membranbioreaktoren	54
3.4.1. Kleintechnischer MBR University of New South Wales (UNSW)	54
3.4.1.1. Anlagenschema und Inbetriebnahme	54
3.4.1.2. Aufbau der Hohlfasermembranmodule	56
3.4.2. Kommunaler MBR Waldmössingen (WM).....	57
3.4.2.1. Anlagenschema und Membranspezifikationen	57
3.4.2.2. Prozessparameter MBR WM.....	58
3.5. Versuche zum Fouling von Membranen	59
3.5.1. Prozessparameter der verwendeten Betriebsweisen	60
3.5.2. Fraktionierung der Foulingschichten	61
3.5.3. Bestimmung des hydraulischen Widerstands	62
3.6. Physiko-chemische Charakterisierung von Biofilmen und EPS	62
3.6.1. Photometrische und gravimetrische Bestimmungen.....	62
3.6.2. Elektrische Leitfähigkeit	63
3.6.3. Elementaranalyse	63
3.6.4. Aminosäure-Analyse mittels HPLC.....	63
3.6.5. Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC).....	64
3.6.6. Größenausschlusschromatographie.....	64
3.6.7. ¹³ C CPMAS NMR-Spektroskopie.....	66

3.6.7.1.	Pulsprogramme und Aufnahmeparameter	66
3.6.7.2.	Auswertung der NMR-Spektren	68
3.6.7.3.	Bestimmung von T_{1H} -Zeiten	70
3.6.7.4.	Bestimmung der Kontaktzeit.....	71
3.6.7.5.	Standardabweichung und Signal/Rausch-Verhältnis.....	71
4.	Ergebnisse und Diskussion	72
4.1.	(NMR)-Untersuchungen an Modell-Biofilmen und -EPS.....	72
4.1.1.	Optimierung der NMR-Parameter	72
4.1.1.1.	T_{1H} -Zeit-Bestimmung	72
4.1.1.2.	Kontaktzeit-Bestimmung.....	75
4.1.1.3.	Genauigkeit der Auswertung der ^{13}C NMR-Spektren	77
4.1.2.	NMR-Untersuchung von EPS-Modell-Substanzen	78
4.1.2.1.	Kohlenhydrate	78
4.1.2.2.	Proteine.....	82
4.1.2.3.	Kohlenhydrat-Protein-Gemisch	86
4.1.2.4.	Nukleinsäuren und Lipide	89
4.1.2.5.	Berechnung der EPS-Zusammensetzung	92
4.1.3.	(NMR)-Untersuchung von Modell-Biofilmen	93
4.1.3.1.	Biofilm Anzucht.....	93
4.1.3.2.	Zusammensetzung von Modell-Biofilmen.....	94
4.1.4.	Zusammenfassung und Ausblick.....	97
4.2.	EPS(-Extraktion) aus Modell-Biofilmen.....	98
4.2.1.	EPS-Ausbeuten und Zellaufschluss	98
4.2.2.	Zusammensetzung der EPS aus Modell-Biofilmen	99
4.2.2.1.	Elementaranalytische Untersuchungen der EPS	100
4.2.2.2.	^{13}C NMR-spektroskopische Charakterisierung der EPS.....	101
4.2.2.3.	Charakterisierung der EPS EDTA-Proben.....	107
4.2.2.4.	Vergleich der ^{13}C NMR-spektroskopischen, elementaranalytischen und biochemischen Ergebnisse.....	109
4.2.3.	Zusammenfassung und Beurteilung der Extraktionsmethoden.....	113
4.3.	Charakterisierung von EPS aus Membranbioreaktoren	115
4.3.1.	Charakterisierung von extrahierbaren EPS aus MBR.....	115
4.3.1.1.	Extraktionsausbeute von eEPS	115
4.3.1.2.	Dialyse von eEPS	116
4.3.1.3.	SEC-Untersuchungen von eEPS.....	119
4.3.1.4.	Strukturelle Charakterisierung der eEPS	124

4.3.1.5.	Zusammenfassung und Beurteilung der Extraktionsmethoden	131
4.3.2.	Charakterisierung von SMP aus MBR WM.....	132
4.3.2.1.	Ausbeute von SMP	132
4.3.2.2.	Fraktionierung der SMP mittels mst-UF	132
4.3.2.3.	SEC-Untersuchungen der mst-UF-Fraktionen	134
4.3.2.4.	¹³ C NMR-spektroskopische Charakterisierung der SMP-Fraktionen	138
4.3.3.	Vergleich von eEPS und SMP - Ausblick	141
4.4.	Makromolekulares Fouling in Membranbioreaktoren	145
4.4.1.	Einfluss von Betriebsweisen auf den transmembranen Druck.....	145
4.4.2.	Charakterisierung der Foulingschichten	149
4.4.2.1.	Zusammensetzung der Foulingschichten	149
4.4.2.2.	¹³ C NMR-Analyse der Foulingschichten	153
4.4.2.3.	Hydraulischer Widerstand der Foulingschichten	156
4.4.2.4.	Spezifischer Widerstand der Foulingschichten	158
4.4.3.	Möglicher Foulingmechanismus bei Kurzzeit-Experimenten	160
4.4.4.	Ergebnisse von Langzeit-Experimenten	162
5.	Zusammenfassung und Ausblick	164
	Literaturverzeichnis	176
	Verzeichnis der Abbildungen.....	189
	Verzeichnis der Tabellen	192
	Abkürzungen und Symbolverzeichnis.....	195
	Anhang.....	199
	Anhang A: Anhang zu Kapitel 3.....	199
	Anhang B: Anhang zu Kapitel 4.1.1.....	205
	Anhang C: Anhang zu Kapitel 4.1.2	208
	Anhang D: Anhang zur Auswertung der NMR-Spektren.....	210

1. Einleitung und Problemstellung

Ein Biofilm ist eine strukturierte Gemeinschaft von Mikroorganismen, die eingebettet in eine selbstproduzierte Polymermatrix meist an inerte oder lebende Oberflächen gebunden ist [Costerston et al. 1994]. Biofilme treten ubiquitär auf und stellen die häufigste Form mikrobiellen Lebens dar [Flemming und Wingender 2001a].

Den Großteil der organischen Materie eines Biofilms bilden extrazelluläre polymere Substanzen (EPS), die maßgeblich für dessen charakteristischen Eigenschaften und dessen strukturellen Aufbau verantwortlich sind.

Während Biofilme in der Natur bei den Selbstreinigungseffekten von Gewässern großen Nutzen aufweisen, stellen sie in technischen Systemen zur Trink- und Abwasseraufbereitung in Form von Biokorrosion oder Biofouling ein massives Problem dar.

Um Biofilme effektiv zu nutzen bzw. ihnen effektiv entgegen wirken zu können, ist es wichtig deren Aufbau und Zusammensetzung besser zu verstehen. Um Informationen über die Zusammensetzung von Biofilmen und besonders deren EPS zu erhalten, werden die EPS mittels verschiedener Extraktionsverfahren von den Zellen getrennt. Ziel aller Extraktionsverfahren ist es, eine hohe EPS-Ausbeute bei minimaler Zellyse zu erhalten [Wingender et al. 1999]. Nach wie vor gibt es keine einheitliche Extraktionsmethode und in verschiedenen Studien werden eine Vielzahl unterschiedlicher Extraktionshilfsmittel, wie z. B. Ethyldiamintetraessigsäure (EDTA), Ionenaustauscherharze, Formaldehyd und physikalische Effekte wie z. B. Hitze und Scherkraft eingesetzt [Liu und Fang 2003], um die EPS von den Zellen zu trennen.

Je nach Extraktionsmethode können unerwünschte Wechselwirkungen zwischen den Extraktionshilfsmitteln und den EPS auftreten, die zu Fehlinterpretationen der Extraktionsergebnisse führen. Besonders komplexierende Extraktionshilfsmittel, wie z. B. EDTA, stehen im Verdacht starke Wechselwirkungen mit den EPS einzugehen [Liu und Fang 2002, Comte et al. 2006].

Zur Analyse der EPS-Zusammensetzung werden die extrahierten EPS mittels verschiedener physiko-chemischer Methoden charakterisiert. Dazu werden häufig biochemisch-photometrische Verfahren zur Kohlenhydrat- und Protein-Analyse eingesetzt. Um Störeinflüsse durch Extraktionshilfsmittel zu minimieren, werden diese durch Filtrations- und/oder Dialyseverfahren entfernt.

Eine Schwachstelle aller kolorimetrischen Methoden stellen die Bezugsstandards und die Beeinflussung durch Matrixeffekte dar. Besonders im Bereich der Protein-Charakterisierung treten in Abhängigkeit der verwendeten Untersuchungsmethode und des verwendeten Analysen-Standards große Abweichungen zwischen den Ergebnissen verschiedener Methoden auf [Ras et al. 2008, Lucarini und Kilikian 1999, Berges et al. 1993].

In einer Vielzahl weiterer Studien werden EPS mittels FTIR-spektroskopischer Methoden untersucht. Diese erlauben die Analyse von funktionellen Gruppen in EPS, welche Rückschlüsse auf die Zusammensetzung zulassen. Aufgrund von Wechselwirkungen und zum Teil starken Überlagerungen der Signale ist diese Methode jedoch nur eingeschränkt zur quantitativen Analytik geeignet.

Die Heterogenität der Extraktionsverfahren in Kombination mit verschiedenen Probenvorbehandlungs- und Analysemethoden macht einen Vergleich verschiedener Studien somit äußerst schwierig, da es bisher erst unzureichende Erkenntnisse gibt, welchen Einfluss die Extraktionsmethode auf die Zusammensetzung der EPS hat.

Eine intensive und stetig wachsende Anwendung finden Biofilme in der Abwasseraufbereitung in Membranbioreaktoren (MBR). Ein entscheidender Vorteil von MBR gegenüber herkömmlichen Prozessen zur Wasseraufbereitung ist die hohe Qualität des gereinigten Wassers. Diese wird durch Kombination herkömmlicher biologischer Reinigungsverfahren mit fortschrittlichen Membranverfahren erzielt und lässt häufig eine direkte Wiederverwendung des gereinigten Abwassers zu.

Als anhaltender Nachteil des MBR-Prozesses kann die Wirtschaftlichkeit des Prozesses angesehen werden. Durch hohe Investitions- und Instandhaltungskosten liegen die Kosten über denen herkömmlicher Abwasseraufbereitungsanlagen. Besonders das Membranfouling und die damit verminderte Leistung des Prozesses stellt ein großes Problem dar. Während in früheren Untersuchungen hauptsächlich die hohen Biomasse-Konzentrationen für das sog. Membranfouling verantwortlich gemacht wurden, wurde in aktuelleren Studien besonders der Einfluss von EPS auf das Fouling beschrieben. Neben den extrahierbaren EPS (eEPS) sind in die gelösten mikrobiellen Substanzen (SMP, engl.: soluble microbial products) von besonderem Interesse. Die makromolekularen SMP werden maßgeblich mit dem Fouling von getauchten Membranen in MBR in Verbindung gebracht [Drews et al. 2008, Rosenberger et al. 2005, Huang et al. 2000]. Dabei spielt die Struktur und die Molekülgröße der polymeren Substanzen eine entscheidende Rolle. Laabs et al. (2006) haben festgestellt, dass makromolekulare Substanzen zum Fouling von MF-Membranen beitragen, während Moleküle kleiner 1 kDa die Membran passieren können. Daher ist neben der strukturellen Zusammensetzung der SMP besonders deren Molekülgrößenverteilung von Interesse.

In aktuellen Studien werden SMP-haltige Lösungen mittels mehrstufiger (mst)-Ultrafiltrations-Verfahren fraktioniert [Malamis und Andreadakis 2009, Liang et al. 2007, Jang et al. 2007]. In Studien zur Fraktionierung von Huminstoffen, konnte festgestellt werden, dass die Größenauftrennung durch Wechselwirkungen zwischen Probenbestandteilen und Membran erheblich beeinträchtigt ist [Müller 2004]. Aufgrund der polyfunktionellen Eigenschaften der SMP kann vermutet werden, dass es auch hier zu den beschriebenen Effekten bei der Fraktionierung kommt.

Um dem Fouling in MBR entgegenzuwirken, werden die Membranen mittels verschiedener Verfahrensweisen betrieben, welche eine periodische physikalische Reinigung zu lassen und so die Performance der Membranen steigert. Die häufigsten Methoden zur physikalischen Reinigung stellen dabei das Rückspülen der Membran mit Permeat und das periodische Aussetzen des Membranprozesses (Relaxation) dar. Trotz der zunehmenden Erkenntnisse über die verantwortlichen Substanzen, gibt es erst wenige systematische Studien über die Charakterisierung von EPS in MBR und die Auswirkung von EPS auf das MBR-Fouling bei verschiedenen Betriebsweisen.

Die vorliegende Dissertation soll dazu beitragen die Zusammensetzung von EPS und den Einfluss verschiedener Extraktionsverfahren auf deren Zusammensetzung besser zu verstehen. Daneben soll zum Verständnis der Entstehung und Zusammensetzung von Fouling in MBR in Abhängigkeit der Betriebsweise beigetragen werden und der Einfluss von EPS auf das Fouling untersucht werden.

Um ein tieferes Verständnis der Zusammensetzung von EPS zu entwickeln, wurde zunächst eine ^{13}C NMR-Methode mit Kreuzpolarisation und Magic Angle Spinning (CPMAS) an Modell-Substanzen etabliert, um die Zusammensetzung von EPS zu analysieren und um anschließend über die Charakterisierung der aus MBR extrahierten EPS Rückschlüsse auf deren Foulingpotential in MBR zu ziehen.

Die komplexe Gesamthematik der Charakterisierung von EPS wurde in 4 Thesen mit den sich aus ihnen ergebenden Teilzielen der Arbeit aufgelöst. Sie reichen von grundlegenden bis zu praktischen Anwendungen:

Hypothese 1: Die ^{13}C CPMAS NMR-Spektroskopie eignet sich durch ihre hoch aufgelösten Strukturinformationen für die detaillierte Charakterisierung des Aufbaus und Verhaltens von Biofilmen und deren EPS.

Ziel: Entwicklung eines leistungsfähigen und probenspezifischen Verfahrens für Probenpräparation und NMR-Messung von Biofilmen und deren EPS zur Charakterisierung der strukturellen Zusammensetzung.

Anhand von Modell-Substanzen für EPS und Modell-Biofilmen war eine ^{13}C CPMAS NMR-spektroskopische Methode zu entwickeln, die eine Quantifizierung von Kohlenhydraten und Proteinen, unabhängig von der EPS-Matrix, zulässt. Die Parameter für die NMR-Analyse waren zu optimieren und es war ein Algorithmus zur quantitativen Auswertung der Spektren festzulegen. Als Modell-Substanzen dienen verschiedene Polysaccharide und Proteine sowie Reinkultur-Biofilme der Spezies *Pseudomonas putida* und *Aureobasidium pullulans*.

Hypothese 2: Unterschiedliche Extraktionsmethoden von EPS führen zu unterschiedlichen Ergebnissen, deren Interpretation auf ihre operationelle Definition zurückgeführt werden kann, und die sich für unterschiedliche Zielsetzungen unterschiedliche gut eignen.

Ziel: Systematische Untersuchung verschiedener Extraktionsmethoden von EPS zur Entwicklung einer optimierten einheitlichen EPS-Probengewinnung.

Anhand der Reinkultur-Biofilme waren Untersuchungen zur Eignung verschiedener Extraktionsmethoden durchzuführen. Es sollte untersucht werden, welchen Einfluss verschiedene Extraktionsmethoden auf die Zusammensetzung, die Zellintegrität und die EPS-Ausbeute haben. Darüber hinaus sollen mögliche Wechselwirkungen zwischen EPS und Extraktionshilfsmitteln und Verunreinigungen der EPS mittels der ^{13}C CPMAS NMR-spektroskopischen Methode analysiert werden.

Hypothese 3: Die Anwendung weiterer unabhängiger Untersuchungsmethoden (mst-UF, SEC) führen in Kombination zu der NMR-Methode zu einem mehrdimensionalen Bild der EPS-Zusammensetzung. Dieses ist besonders wichtig für die praxisrelevante Differenzierung von SMP und eEPS aus MBR.

Ziel: Differenzierung und Charakterisierung von eEPS und SMP aus MBR.

Es waren die geeignetsten Extraktionsmethoden zur Extraktion von EPS aus MBR zu verwenden und der Einfluss der Extraktionsmethode auf die strukturelle Zusammensetzung der EPS zu untersuchen. Dazu werden die ^{13}C CPMAS NMR-spektroskopische Methode sowie Größenausschlusschromatographie (SEC) eingesetzt. Es soll geklärt werden, welcher Anteil der EPS bevorzugt in Lösung geht und somit einen maßgeblichen Anteil am Membranfouling verursacht. Dazu werden SMP aus einem kommunalen MBR mittels mst-UF fraktioniert. Die einzelnen Fraktionen werden anschließend mittels ^{13}C CPMAS NMR-Spektroskopie und SEC auf deren strukturelle Zusammensetzung untersucht und mit der Zusammensetzung von eEPS verglichen.

Hypothese 4: EPS ist maßgeblich am Fouling von Membranen im MBR beteiligt. Besonders die gelöste Fraktion (SMP) kann sich leicht an Membranen anlagern und möglicherweise die Poren verstopfen.

Ziel: Untersuchung des Einflusses von EPS auf das Fouling von Membranen.

Um den Einfluss von EPS auf das Membranfouling zu untersuchen, werden Foulingversuche in einem kleintechnischen MBR bei verschiedenen Betriebsweisen durchgeführt. Auf Grundlage des transmembranen Drucks (TMP, engl.: trans membrane pressure) soll die Entstehung des Foulingwiderstands über verschiedene Zeitintervalle untersucht werden. Die entstehenden Foulingschichten werden mittels physikalischer und chemischer Methoden in drei Fraktionen, in Abhängigkeit von der Bindungsstärke zur Membran (Poren- und

Oberflächenfouling), fraktioniert und die Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen sowie deren Einfluss auf den Foulingwiderstand untersucht. Anhand der Foulingwiderstände der einzelnen Fraktionen und dem Gehalt an EPS kann zum ersten Mal ein spezifischer Widerstand der einzelnen Fraktionen berechnet und somit Rückschlüsse auf die Struktur der Foulingschicht gezogen werden.

2. Grundlagen

2.1. Biofilme

Der Begriff Biofilm stellt einen nicht scharf definierten Überbegriff dar. Wuertz et al. (2003) definieren einen Biofilm als eine natürliche Akkumulation von Mikroorganismen (Bakterien, Pilzen, Hefen, Protozoen, etc.), sorbierter Substanzen und zurückgehaltener Feststoffe, welche in eine Matrix aus extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) eingelagert und miteinander und/oder an einer Grenzfläche verhaftet sind. Somit können Biofilme als sessiler, mikrobieller Bewuchs auf einer Oberfläche oder, wie z. B. in Kläranlagen, als mobile, „schwebende Biofilme“ in Form von Flocken auftreten [Wimpenny et al. 2000].

2.1.1. Vorkommen und Aufbau von Biofilmen

Die Grundvoraussetzungen für Biofilmwachstum sind die Anwesenheit von Mikroorganismen, Nährstoffen, Wasser und einer Oberfläche. Da diese nahezu ubiquitär vorhanden sind, stellen Biofilme in natürlichen Ökosystemen die dominante Form mikrobiellen Lebens dar [Flemming und Wingender 2001a, Costerton und Lewandowski 1995]. Gegenüber der Existenz als suspendierter Einzelorganismus bietet das Dasein in Biofilmen entscheidende Vorteile, die in Tabelle 1 zusammengefasst sind.

Tabelle 1: Vorteile der Lebensform Biofilm für Mikroorganismen [Wuertz et al. 2003, Decho 1999].

Nährstoffanreicherung in der Gel-Matrix
Entwicklung von stabilen Mikrokonsortien: - Symbiose verschiedener Arten (z. B. bei Nitrifikanten) - Nutzung schwer-abbaubarer Substrate durch Zusammenarbeit - Schaffung ökologischer Nischen
Schutz vor: - pH-Extremen - Salzbelastungen - Bioziden und Antibiotika - Hydraulischer Belastung - Austrocknung
Gentransfer
Chemische Kommunikation (Quorum sensing)

EPS stellen in der Regel den größten Anteil der Biofilm-Trockenmasse dar und können zwischen 70 bis 95 % dieser ausmachen. Sie verleihen dem Biofilm eine pilzartige Morphologie, in der die Bakterien, die je nach Biofilm in hohen Zelldichten (bis zu $10^{12}/\text{mL}$) als Mikrokolonien eingebettet sind [Flemming 1994, Flemming und Wingender 2002].

Im Biofilm liegen die EPS zumeist stark hydratisiert vor und schützen die Mikroorganismen so vor dem Austrocknen [Flemming und Wingender 2003b]. An die EPS gebundenes Wasser stellt mit 70 bis 95 % des Feuchtgewichts den größten Anteil am Gesamt-Biofilm dar. Ein kleiner Teil des Wassers liegt ungebunden vor und sorgt für konvektiven Transport von Nährstoffen und Sauerstoff in der Biofilmmatrix, welche von einem System von Kanälen und Poren durchzogen wird [de Beer und Stoodley 1995, Okabe et al. 1997, Okabe et al. 1998]. Der mittlere Porendurchmesser nimmt von der äußeren Grenzschicht (Biofilm/wässriges Medium) zur anhaftenden Grenzfläche hin ab [Bishop 1997]. Innerhalb der EPS-Matrix erfolgt der Stofftransport durch Diffusion [de Beer und Stoodley 1995, Picioreanu et al. 2000].

Des Weiteren können biogene Partikel, wie Zellreste und Detritus, und anorganische Partikel, wie Sand oder Mineralstoffe, in den Biofilm eingelagert oder an ihn sorbiert werden [Flemming 1995, Flemming und Leis 2002]. Die schematische Struktur des Aufbaus eines Biofilms ist in Abbildung 1 dargestellt. Die räumliche Struktur der Biofilmmatrix variiert dabei in Abhängigkeit der vorhandenen Zellen, dem physiologischen Status, den verfügbaren Nährstoffen und den äußeren Bedingungen, wie z. B. Strömung und Scherkraft [Schmitt und Flemming 1999, Liu und Tay 2002, van Loosdrecht et al. 1995].

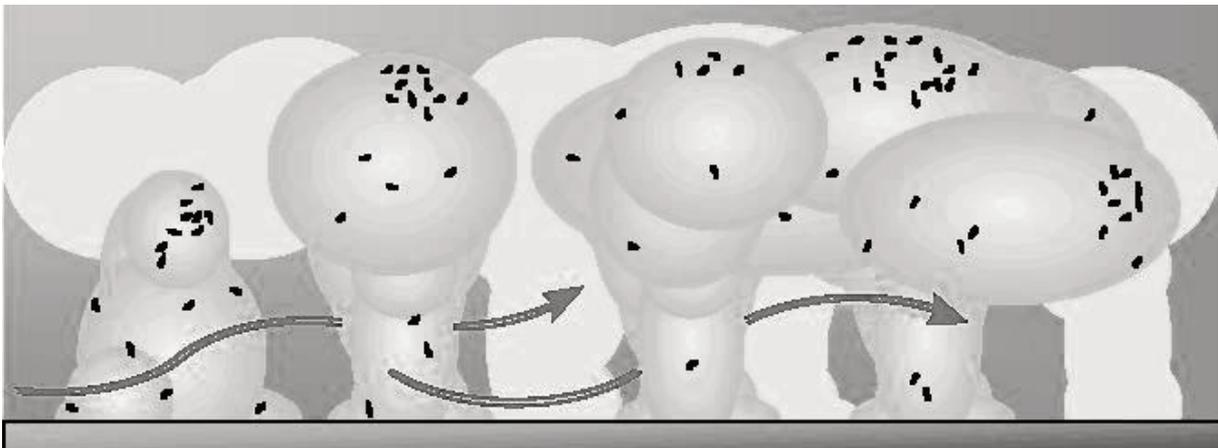


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Architektur eines überströmten Biofilms auf einer inerten Oberfläche [Costerton et al. 1994].

Obwohl Biofilme sehr heterogene Systeme darstellen [Wimpenny et al. 2000] und ihre Zusammensetzung von vielen äußeren Bedingungen abhängt, verläuft deren Entwicklung nach einem charakteristischen Schema, wie in Abbildung 2 dargestellt ist [Sauer und Camper 2002]:

1. Ausbildung eines „conditioning films“

Anorganische und organische Verbindungen adsorbieren an der Aufwuchsoberfläche und dienen den Mikroorganismen als Nährstoffe und Adhäsive.

2. Vermehrung der Mikroorganismen und EPS-Produktion

Durch Adhäsion an der Oberfläche kommt es zu einer Veränderung der Genexpression im Vergleich zu planktonischen Zellen, welche zu erhöhter Osmolarität, erhöhter Zelldichte und einer intensiven Produktion von EPS führt.

3. Ausbildung einer dreidimensionalen Struktur

Die intensive EPS-Produktion führt zur räumlichen Ausbreitung des Biofilms, was die Ausbildung einer dreidimensionalen Architektur innerhalb des Films zur Folge hat.

4. Stationäre Phase

Der Zuwachs des Biofilms und die Abnahme durch Abrasion durch Partikel, die auf die Oberfläche des Biofilms auftreffen, sind gleich groß. Der Biofilm hat somit eine quasi-stationäre Phase erreicht.

5. Dispersion

Neben Abrasion kommt es durch Änderung der äußeren Bedingungen (Nährstoffkonzentration, Strömungsgeschwindigkeit, Temperatur, etc.) bzw. durch Veränderungen im Biofilm (Absterben von Mikroorganismen) zur Lockerung der Biofilmstruktur und letztendlich zum Ablösen großer Biofilmteile.

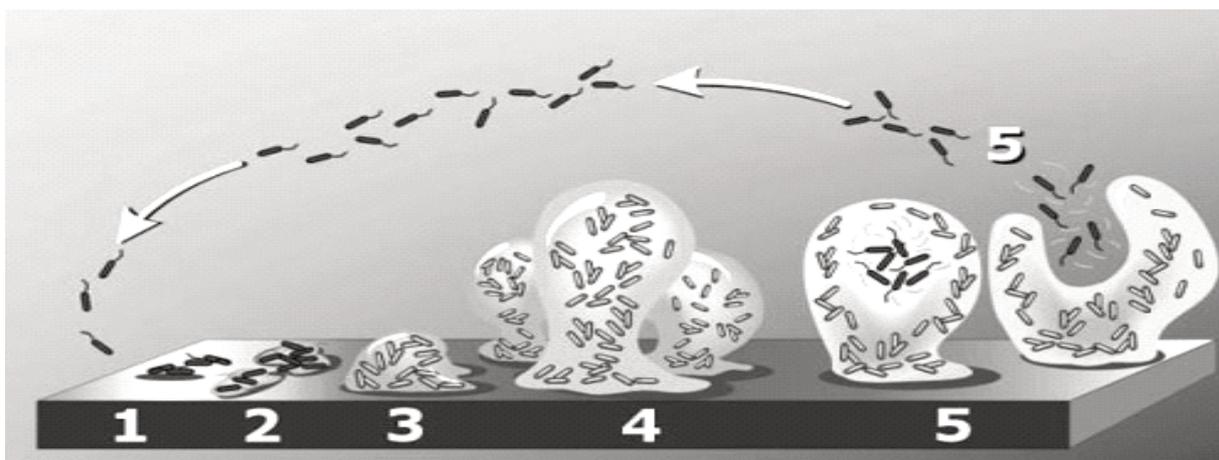


Abbildung 2: Die verschiedenen Stufen der Biofilmentwicklung [Sauer und Camper 2002]:
1. Anhaftung, 2. Vermehrung und EPS Produktion, 3. 3-D Wachstum, 4. Stationäre Phase, 5. Dispersion.

2.1.2. Biofilme in der Wasseraufbereitung

Biofilme treten in verschiedenen Ausprägungen in wasserführenden und Wasseraufbereitungssystemen auf. Dabei lassen sich positive Nutzungsmöglichkeiten der Biofilme und ihr unerwünschtes Auftreten als Störfaktor unterscheiden.

In Kläranlagen tragen Biofilme in Form von Belebtschlammflocken im erheblichen Umfang zur Reinigung der Abwässer bei. In verschiedenen Stufen werden organische Substanzen durch unterschiedliche Mikroorganismen-Populationen abgebaut und Stickstoffverbindungen eliminiert. Des Weiteren werden Mikroorganismen in Festbettreaktoren, Tropfkörpern etc. immobilisiert, was entscheidende Prozessvorteile mit sich bringt. Aufgrund der höheren Zelldichten ist der Umsatz von Substrat wesentlich höher als bei einer vergleichsweise einfachen Reaktorführung [Lattner 2003].

In Anlagen zur Trink- und Abwasseraufbereitung, wie z. B. bei Ionenaustauschern und Aktivkohle-Adsorbern sowie in Membrananlagen, können Biofilme jedoch auch erhebliche Störfaktoren darstellen, wenn es zur unerwünschten Ausbildung von mikrobiellen Belägen kommt. Man spricht hier von einem sogenannten „Biofouling“. Diese unerwünschte Ausbildung eines Biofilms führt zur Beeinträchtigung von Gewinnung, Aufbereitung, Transport, Lagerung und Nutzung von Trinkwasser [Flemming 1994]. In der Trinkwassertechnologie sind Biofilme in wasserführenden Systemen äußerst problematisch und können als Habitate humanpathogener Bakterien dienen, für die gesetzliche Grenzwerte bestehen [Gorenflo 2003]. Technisch von enormer Bedeutung ist die mikrobiell induzierte Biokorrosion, die nahezu alle Metalle betreffen kann [Kreysig 2001]. Bis heute ist es trotz intensiver Materialforschung nicht gelungen, ein Material zu entwickeln, welches auf Dauer gegen die Besiedlung von Mikroorganismen inert ist.

Ein spezieller Fall in dem die positiven und negativen Eigenschaften von Biofilmen unmittelbar aufeinandertreffen stellen Membranbioreaktoren (MBR) dar. Auf der einen Seite werden durch die Biofilme die zum Teil hohen organischen Frachten abgebaut. Auf der anderen Seite führt Fouling durch Biofilme und deren EPS zu einer Beeinträchtigung des Prozesses, was durch verschiedene Reinigungsverfahren und einen höheren Energieaufwand zu erheblichen Kosten führt [Melin und Rautenbach 2007, Evenblij et al. 2005]. Auf die Problematik des Membranfoulings wird im weiteren Verlauf der Arbeit detailliert eingegangen (Kapitel 4.4).

2.1.3. Modell-Biofilme

Für grundlegende Untersuchungen an Biofilmen eignen sich Reinkultur-Biofilme, die im Labor unter definierten Bedingungen (Temperatur, Nährstoffangebot, pH-Wert, etc.) gezüchtet werden. Sie geben wichtige Informationen zum Verständnis der Strukturen und der biochemischen Vorgänge in Biofilmen [Nielsen und Jahn 1997]. Als Aufzuchtmedium

werden häufig Nährmedien und Fließzellen verwendet. Reinkultur-Biofilme bieten gegenüber Biofilmen aus der Umwelt und aus Kläranlagen den Vorteil der Reproduzierbarkeit, da das Biofilmwachstum nicht durch äußere Einflüsse gestört oder verändert wird [Rode 2004]. Da das Wachstum im Labor überwiegend bei Nahrungsüberschuss und optimalen äußeren Bedingungen stattfindet und nicht mit toxischen Substanzen, Austrocknung oder Fressfeinden zu rechnen ist, produzieren einige Mikroorganismen in Biofilmen große Mengen an EPS.

Als Beispiel für einen prokaryotischen Mikroorganismus wurde in dieser Arbeit ein Biofilm von *Pseudomonas putida* und für eukaryotische Mikroorganismen ein Biofilm von *Aureobasidium pullulans* eingesetzt und systematisch untersucht.

P. putida ist ein stäbchenförmiges, gram-negatives, aerobes Bakterium, das sich mit Geißeln aktiv fortbewegen kann. Das Bakterium tritt ubiquitär in Boden, Wasser sowie in oder auf Pflanzen und Tieren auf. *P. putida* ist ein häufig verwendeter Modell-Organismus, der unter bestimmten Bedingungen Biofilme ausbildet. Nach Anheftung an der Oberfläche konnte im Biofilm Zell-zu-Zell-Kommunikation [Arevalo-Fero et al. 2005, Steidle et al. 2002] und eine durch EPS verursachte Struktur [Auerbach et al. 2000] festgestellt werden. Die dabei produzierten EPS sind sehr heterogen und bestehen überwiegend aus Proteinen und zu kleineren Teilen aus Kohlenhydraten [Jahn et al. 1998].

A. pullulans ist ein Pilz, der pinke, hefe-artige Kolonien ausbildet, die mit einer schleimigen Sporenschicht bedeckt sind. Ältere Kolonien verfärben sich schwarz, was durch die Produktion der Pigmente Chlamydospore verursacht wird. Unter bestimmten Bedingungen bildet der Pilz große Mengen des Polysaccharides Pullulan als EPS. Dabei wurde besonders der Einfluss des physiologischen Status der Zellen und der Sauerstoffkonzentration [Roukas et al. 2001, Lee et al. 2001] sowie der Kohlenstoff- und Stickstoffquelle [Seo et al. 2004, Gibson und Coughlin 2002] auf die Pullulan-Produktion untersucht. Biofilme von *A. pullulans* findet man häufig an feuchten Orten, wie Badezimmern, wo sich der Pilz auf Silikonfugen ausbildet [Cooke 1959].

Prokaryotische Zellen unterscheiden sich generell in verschiedenen Kriterien von eukaryotischen Zellen.

Im Gegensatz zu eukaryotischen Zellen besitzen prokaryotische Zellen keinen echten Zellkern und weisen eine einfachere innere Organisation auf. Bei prokaryotischen Zellen liegt die DNA frei im Cytoplasma vor und ist nicht durch Histone stabilisiert, stellt also kein echtes Chromosom dar. Die DNA ist auf engem Raum angeordnet und wird als Nukleotid bezeichnet. Im Gegensatz dazu weisen eukaryotische Zellen die Existenz eines Zellkerns mit einer Kernhülle um die in Chromosomen organisierte DNA auf.

Ein weiterer wesentlicher Unterschied zwischen eukaryotischen und prokaryotischen Zellen, liegt im Aufbau der Zellwände. In gram-negativen prokaryotischen Zellen besteht die Zellwand zu etwa 10 % (w/w TM) aus Murein (Peptidoglycan). Der größte Anteil der

Zellwand wird von der äußeren Membran, der Lipopolysaccharid-Schicht, gebildet, die zum Großteil aus Lipopolysacchariden sowie Lipoproteinen und Proteinen besteht. Die vorkommenden Monocarbonsäuren sind vorwiegend gesättigt (Caprinsäure (10:0), Laurinsäure (12:0), Myristinsäure (14:0), Palmitinsäure (16:0), Stearinsäure (18:0)) [O'Leary 1962]. Des Weiteren treten große Mengen an Kohlenwasserstoffverbindungen in Phospholipiden in der Cytoplasma-Membran auf. Die Lipid-Strukturen können somit bis zu 80 % der Zellwandtrockenmasse, welche bis 5 bis 20 % der Zelltrockenmasse darstellt, ausmachen. Im Gegensatz dazu bestehen Zellwände eukaryotischer Organismen überwiegend aus Homo- und Heteropolysacchariden. Das Polysaccharid Chitin, stellt einen großen Anteil der Polysaccharide höherer Pilze dar. Nur etwa 10 bis 20 % (w/w) der Zellwand werden von Protein- und Lipid-Strukturen gebildet [Peberdy 1990].

2.2. Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS)

Wingender et al. (1999) definieren EPS als Polymere mikrobiellen Ursprungs, die am Aufbau mikrobieller Aggregate beteiligt sind. Prokaryotische Mikroorganismen (Bakterien und Archaeen) sowie eukaryotische Mikroorganismen (Pilze und Algen) sind in der Lage EPS zu bilden. Die EPS werden von den Mikroorganismen in unterschiedlichen Formen und in unterschiedlichen Phasen ihres Lebenszyklusses im Biofilm produziert und/oder vom Biofilm sorbiert. Die Makromoleküle können durch aktive Sekretion, Ablösen von Bestandteilen der äußeren Zellmembran, Zellyse, Hydrolyse oder Sorption aus der wässrigen Phase in die Biofilmmatrix gelangen [Lattner 2003].

2.2.1. Zusammensetzung und Funktion von EPS

Längere Zeit wurde angenommen, dass EPS überwiegend aus Polysacchariden bestehen [Uhlinder und White 1983, Horan und Eccles 1986, Laspidou und Rittmann 2002], so dass die Abkürzung EPS noch teilweise für extrazelluläre Polysaccharide verwendet wird [Naylson Moreira 2004]. Zahlreiche Studien haben jedoch gezeigt, dass EPS eine heterogene Mischung verschiedener Makromoleküle sind und sie neben Polysacchariden vor allem aus Proteinen und zu kleineren Anteilen aus Lipiden (Glykolipide) und Nukleinsäuren bestehen [Gehrke et al. 2001, Palmgren und Nielsen 1996, Liu und Fang 2002, Steinberger und Holden 2005]. In Abwasserbiofilmen wurden zudem häufig Huminstoffe gefunden [Nielsen und Jahn 1999, Sheng und Yu 2006, Al-Halbouni et al. 2009], die im Gegensatz zu den vorher genannten Komponenten nicht selbst vom Biofilm synthetisiert werden, sondern an die EPS sorbieren. Die Angaben über EPS-Gehalte und deren Zusammensetzung in Biofilmen und Belebtschlamm variieren stark. Ursachen hierfür sind die Zusammensetzung der mikrobiellen Population [Dasinger et al. 1994], der physiologische Zustand der Zellen und die Umweltbedingungen unter denen die Biofilme wachsen [Uhlinger und White 1983, Urbain et al. 1993, Flemming und Wingender 2001b]. Abweichungen zwischen verschiedenen Studien

können jedoch auch analytisch bedingte Ursachen haben [Frolund et al. 1996], da in unterschiedlichen Arbeiten eine Vielzahl von Extraktions- und Analysemethoden zum Einsatz kommen, welche erheblichen Einfluss auf die erfasste EPS-Zusammensetzung haben. Ein Vergleich verschiedener Literaturquellen gestaltet sich daher äußerst schwierig. In Tabelle 2 sind Konzentrationsbereiche der verschiedenen EPS-Komponenten aufgeführt:

Tabelle 2: Zusammensetzung von EPS und Konzentrationsbereiche der Komponenten [Flemming und Wingender 2002, Rode 2004].

Polymer	Mengenanteil in EPS in %
Polysaccharide	40 - 95
Proteine	< 1 - 60
Nukleinsäuren (DNA)	<1 - 10
Lipide	1 - 40

EPS tragen überwiegend negative Ladungen [Poxon und Darby 1997]. Dies spielt für die Stabilisierung der EPS-Matrix eine wichtige Rolle. Durch den Einbau von di- und trivalenten Kationen bilden sich Brücken zwischen negativ geladenen Gruppen von Polysacchariden, Proteinen und Nukleinsäuren aus und vernetzen die Polymere. Dies führt zur mechanischen Stabilität der mikrobiellen Aggregate [Flemming und Wingender 2001b, Bruus et al. 1992]. Neben den auf Kationen basierenden Brückenbindungen, treten in EPS als Hauptbindungskräfte van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und hydrophobe Wechselwirkungen auf, welche die EPS zusammenhalten und mit den Zellen verbinden [Flemming und Wingender 2001b, Jorand et al. 1998, Rode 2004]. Bei einer erfolgreichen Extraktion gilt es die genannten Wechselwirkungen und Bindungen zu lösen bzw. zu lockern, so dass EPS vom gebundenen Zustand in die umgebende Phase übergehen können.

Die Funktionen von EPS in Biofilmen sind sehr vielseitig. Extrazelluläre Polysaccharide haben hauptsächlich strukturbildende Funktionen und tragen durch die oben beschriebenen Wechselwirkungen zur mechanischen Stabilisierung der Biofilm-Matrix bei [Wingender und Jäger 2002]. Über Länge und Verzweigungsgrad der Polysaccharide sowie Art der Monomere können Mikroorganismen gezielt die Eigenschaften der entstehenden Biofilme beeinflussen. Im Vergleich zu Polysacchariden ist über die Zusammensetzung und Funktion extrazellulärer Proteine im Biofilm bisher weniger bekannt. Ein Teil der extrazellulären Proteine konnte als Lektine identifiziert werden, die reversibel an Polysaccharide gebunden sind. In dieser Form tragen Proteine, ähnlich wie Kohlenhydrate, zur Strukturbildung des Biofilms bei [Higgins und Novak 1997]. Zudem wurden häufig extrazelluläre Enzyme in Biofilmen analysiert, die von heterotrophen Bakterien, aber auch von Pilzen gebildet werden [Smucker und Kim 1991,

Priest 1992] und organische Verbindungen extrazellulär hydrolysieren und für die Zellen verfügbar machen.

Neben strukturbildenden Eigenschaften haben EPS eine Reihe weiterer funktioneller Eigenschaften im Biofilm. EPS schützen den Biofilm gegen abiotische und biotische Umwelteinflüsse. Durch Hydratisierung schützen sie die Mikroorganismen vor Austrocknung. Sie erzeugen definierte Strömungsverhältnisse am bzw. im Biofilm, was ein symbiotisches System von Nährstoffzugänglichkeiten ermöglicht [Flemming und Wingender 2003a]. Aufgrund ihrer sorptiven Eigenschaften akkumulieren sie verschiedene Komponenten aus der Umwelt. So werden extrazelluläre Energiereserven in Form von Fetten, Phosphaten und Polysacchariden geschaffen, auf die bei Nahrungsknappheit zurückgegriffen werden kann. Andere Lebensumstände führen somit zu anderen EPS-Zusammensetzungen [Bura et al. 1998]. Die Funktionalität und die Bedeutung der EPS in Biofilmen sind in Tabelle 3 zusammengefasst.

Tabelle 3: Übersicht über die Funktionalität von EPS innerhalb von Biofilmen [Wingender et al. 1999, Rode 2004].

Funktion	Bedeutung
Adhäsion an Oberflächen	Initialer Schritt bei der Kolonisierung inerter Oberflächen, Ursache für Biofouling/-korrosion
Aggregation von Bakterienzellen, Bildung von Flocken und Biofilmen	Verbindung zwischen Zellen und anorganischen Trägermaterialien, Immobilisierung heterogener Bakterienpopulationen
Schutzfunktion	Resistenz gegenüber Bioziden wie Desinfektionsmitteln und Antibiotika
Wasserrückhaltung/Hydratisierung	Schutz vor Austrocknung
Sorption organischer Verbindungen	Akkumulation von Nährstoffen aus der Umgebung
Enzymatische Aktivität	Verwertung exogener Makromoleküle als Nährstoffquelle, Freisetzung von Biofilmzellen durch den Abbau strukturbildender EPS
Bildung von Mikrokonsortien	Immobilisierung der Zellen - synergistische Gemeinschaften
Schaffung von Biodiversität	Ausbildung von Konzentrationsgradienten führen zu anaeroben Bereichen im Biofilm; Ermöglichung eines Gentransfers zwischen verschiedenen Spezies
Aufrechterhaltung der Stabilität des Biofilms	Mechanische Stabilität von Biofilmen (oft in Zusammenhang mit bivalenten Kationen) durch nicht-kovalente Bindungskräfte, Diffusionsbarriere nach außen; ungehinderte Diffusion in der Matrix

2.2.2. Lösliche mikrobielle Produkte (SMP)

EPS können im Laufe der Biofilm-Entwicklung an die Umgebung abgegeben werden und in gelöster Form vorliegen. Besonders in Studien zur Charakterisierung von EPS aus Kläranlagen und MBR werden EPS in zwei Unterfraktionen gegliedert [Ramesh et al. 2006, Laspidou und Rittmann 2002, Rosenberger et al. 2005]. Die extrahierbaren EPS (eEPS) stellen dabei die Fraktion dar, die fest an den Biofilm gebunden sind und sich nur mittels verschiedener Isolierungsverfahren (siehe Kapitel 2.3.4) vom Biofilm trennen lassen. Im Gegensatz dazu werden die gelösten mikrobiellen Produkte (SMP, engl.: soluble microbial products) vom Biofilm durch hydrolytische und/oder diffusive Vorgänge an das umgebende Medium abgegeben und liegen gelöst vor. Abbildung 3 verdeutlicht den Unterschied zwischen EPS und SMP.

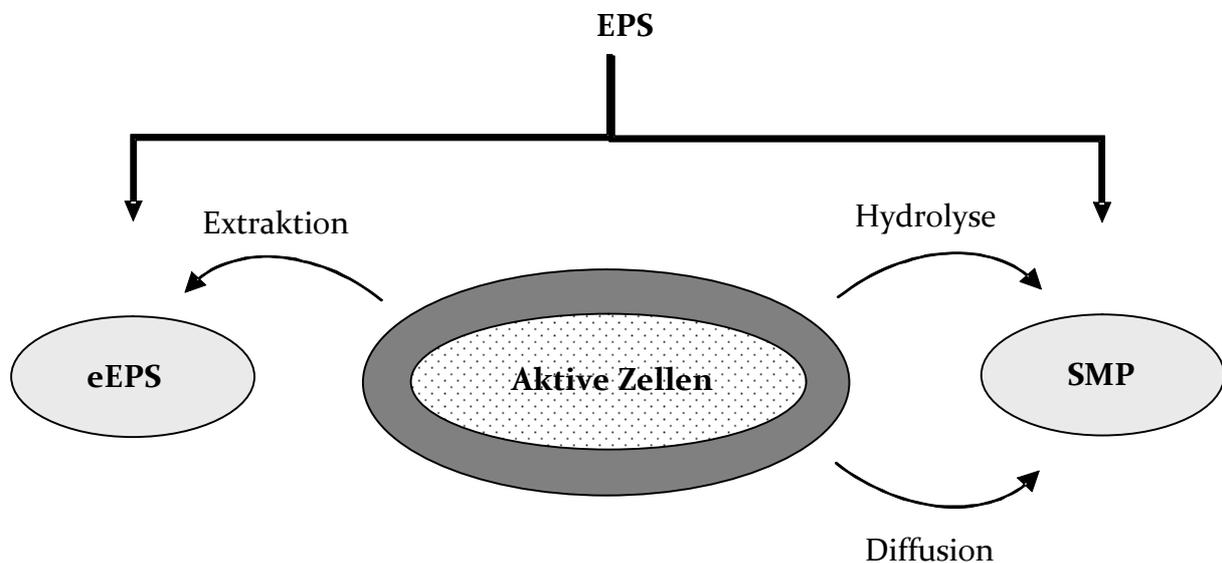


Abbildung 3: Differenzierung zwischen eEPS und SMP.

Es wird vermutet, dass SMP überwiegend aus zellulären Verbindungen bestehen, die aus der Hydrolyse von Makromolekülen, aus dem Zell-Metabolismus sowie aus der Zelllyse hervorgehen. Sie diffundieren durch die Zellmembran und liegen ungebunden zwischen den Zellen in der Biofilmmatrix vor [Ramesh et al. 2006]. Noguera et al. (1994) beschreiben SMP als einen „Pool“ organischer Verbindungen, die im Substratmetabolismus als Zwischenprodukt und beim Biomasseabbau gebildet werden. Beispiele für SMP sind Exoenzyme, Zellwände, DNA und Proteine aus der Zelllyse. Aufgrund hydrolytischer Vorgänge wird vermutet, dass SMP kleinere Molekülgrößen als eEPS aufweisen und leichter biologisch abbaubar sind [Laspidou und Rittman 2002]. Die Trennung der SMP von der Biomasse erfolgt durch Zentrifugation. Trotz der zunehmenden Erkenntnis der Bedeutung von SMP beim Membranfouling in MBR liegen erst wenige detaillierte Studien zu deren Charakterisierung vor.

2.2.3. Extraktion von EPS

Zur Charakterisierung von EPS werden diese mittels verschiedener Extraktionsmethoden vom Biofilm isoliert. Eine erfolgreiche Extraktion soll zu einer hohen EPS-Ausbeute ohne Beeinflussung der EPS-Struktur und Schädigung der Zellen (Zellyse) führen [Wingender et al. 1999], um eine Verunreinigung der EPS mit intrazellulären polymeren Substanzen zu vermeiden [Zhou et al. 1996]. In der Praxis sind diese Punkte jedoch nur schwer zu erreichen und stehen oft in Konkurrenz zueinander [Naylson Moreira 2004]. In der Literatur ist eine Vielzahl von Methoden zur EPS-Extraktion beschrieben. Die Arbeiten von Zhang et al. (1999) und Liu und Fang (2003) geben einen umfangreichen Überblick über verschiedene Extraktionsmethoden. Nach wie vor gibt es keine universelle Methode, was einen Vergleich verschiedener Studien erschwert.

Trotz unterschiedlicher Extraktionsergebnisse verlaufen die meisten Extraktionsverfahren nach einem ähnlichen Prinzip. Die mit den Zelloberflächen verbundenen EPS werden zunächst von den negativ geladenen Zellen gelöst und durch das sie umgebende Lösungsmittel, meist Wasser, aufgenommen. Somit werden mit nahezu allen Methoden hydrophile EPS-Komponenten, wie Proteine und Kohlenhydrate, im Gegensatz zu hydrophoben Komponenten, wie z. B. Lipiden, bevorzugt extrahiert [Nielsen und Jahn 1999]. Um die Bindungskräfte zwischen EPS und Zelloberfläche bei der Extraktion zu überwinden, werden häufig chemische Extraktionshilfsmittel oder ein mechanisch-physikalischer Energieeintrag in das System eingebracht. Zu den mechanisch-physikalischen Methoden zählen die Ultrazentrifugation [Horan und Eccles 1986] und die Extraktion unter Hitzeeinfluss [Goodwin und Forster 1985], während die Extraktion mit Formaldehyd und NaOH [Rode 2004], EDTA [Liu und Fang 2002] und Kationenaustauscher [Frølund et al. 1996] den chemischen bzw. physikalisch-chemischen Methoden zugeordnet werden.

Mechanisch-physikalische Extraktionsverfahren

Bei der Extraktion mittels Ultrazentrifugation werden EPS durch Scherkraft von den Zellen gelöst und an das umgebende Lösungsmittel abgegeben. Es stellt eines der einfachsten Verfahren dar [Brown und Lester 1980]. Das Verfahren hat den Vorteil, dass keine Extraktionsmittel hinzugefügt werden und somit nicht mit Verunreinigungen der EPS zu rechnen ist. Die Struktur der EPS bleibt erhalten. Des Weiteren können Scherkräfte durch Rühren und/oder Ultraschall auf die Proben ausgeübt werden, um die Biofilmstruktur aufzubrechen.

Bei der thermischen Methode werden die EPS unter Hitzeeinfluss homogenisiert. Der durch das Erhitzen stattfindende Energieeintrag lockert die intermolekularen Bindungen. Dies führt zur Zerstörung der Biofilmstruktur, so dass die EPS leichter in die gelöste Phase übergehen [Comte et al. 2006].

Physikalisch-chemische Extraktionsverfahren

Bei den physikalisch-chemischen Verfahren werden die Ladungsverhältnisse der EPS gezielt verändert, um deren Struktur zu lockern und eine Trennung der EPS von den Zellen zu ermöglichen. Zu diesem Zweck wird der Biofilm unter Zugabe eines Kationenaustauschers (CER, engl.: cation exchange resin) homogenisiert. Dadurch werden zweiwertige Ca^{2+} - und Mg^{2+} -Kationen, die den Biofilm durch Kationenbrücken stabilisieren, entfernt. Dies führt zu einer Schwächung der Bindungen zwischen EPS und Zellen, was eine leichtere Abtrennung der EPS ermöglicht [Frølund et al. 1996].

Chemische Extraktionsverfahren (EDTA, Formaldehyd und Natriumhydroxid)

Bei chemischen Extraktionsverfahren wird die Biofilmstruktur durch Zugabe von spezifischen Chemikalien gelockert, was zur besseren Abtrennung der EPS führt. Die Extraktion unter Zugabe von Ethylendiamintetraacetat (EDTA) beruht auf einem ähnlichen Prinzip, wie die Kationenaustauscher-Methode. Durch die Entfernung von divalenten Kationen stoßen sich Polymere mit negativ geladenen Oberflächen, wie Proteine und Kohlenhydrate, durch die veränderten Ladungsverhältnisse von den negativ geladenen Zelloberflächen ab, was zur Löslichkeit der EPS-Bestandteile führt [Labare et al. 1989, Platt et al. 1985, Liu und Fang 2002]. EDTA steht im Verdacht einen negativen Einfluss auf die (photometrischen) Untersuchungsmethoden zu haben, weshalb es vor der Konzentrationsbestimmung aus den entsprechenden Proben entfernt werden muss [Davies 1998]. Des Weiteren werden Wechselwirkungen von EDTA mit den EPS vermutet [Comte et al. 2006, Liu und Fang 2002]. Das Ausmaß der Wechselwirkungen und eine mögliche Anreicherung von EDTA in den EPS konnte bisher jedoch noch nicht quantifiziert werden.

Bei der Formaldehyd-NaOH-Methode wird der pH-Wert der Extraktionslösung durch NaOH in den alkalischen Bereich angehoben. Dies führt zu einer vollständigen Ionisierung der ansonsten als Zwitterionen vorliegenden Proteine und Kohlenhydrate, deren isoelektrische Punkte zwischen pH 4 und pH 6 liegen. Daraus resultiert eine starke Abstoßung der EPS-Komponenten im Biofilm und eine Erhöhung derer Löslichkeit [Sato und Ose 1980, Sheng et al. 2005]. Um eine Beschädigung der Zellen als Reaktion des pH-Wert-Wechsels zu verhindern, wird Formaldehyd zugefügt, das die negativ geladenen funktionellen Gruppen von Proteinen und Nukleinsäuren in der Zellmembran verknüpft und auf diese Weise eine Zelllyse verhindert [Liu und Fang 2002].

2.2.4. Modell-EPS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei Polysaccharide und ein Protein als Modell-EPS verwendet. Bei der Auswahl der Modell-Substanzen wurde darauf geachtet, dass die wesentlichen strukturellen Eigenschaften der Substanzklassen Kohlenhydrate und Proteine widergespiegelt werden.

Polysaccharide

Polysaccharide sind hochmolekulare Kohlenhydrate. Kohlenhydrate haben die allgemeine Formel $[C_x(H_2O)_x]_y$ und bestehen aus Monosacchariden, die durch glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Hexosen, insbesondere die Aldosen D-Glukose, L-Rhamnose, D-Mannose und D-Galaktose, stellen den größten Anteil an Monosacchariden in Biofilmen und EPS dar [Dignac et al. 1998, Celik et al. 2008, Faber et al. 1998]. Ein besonders großer Anteil von Hexosen wurde in Reinkultur-Biofilmen gefunden [Dignac et al. 1998], was vermutlich auf die aus Hexosen bestehende Kohlenstoffquelle zurückzuführen ist. Des Weiteren können Polysaccharide Aminozucker und Uronsäuren, wie z. B. D-Glucuronsäure, D-Galacturonsäure oder D-Mannuronsäure, enthalten [Decho 1990, Christensen 1989, Sutherland 1994] und durch organische (z. B. O-Acetyl, N-Acetyl, Succinyl- oder Pyruvyl-Gruppen) oder anorganische Reste (z. B. Sulfat- oder Phosphat-Gruppen) substituiert sein. Während besonders in Reinkultur-Biofilmen von *Pseudomonas aeruginosa* erhebliche Mengen an Uronsäuren basierend auf Alginat gefunden wurden [Rode 2004], wurde der Gehalt an Uronsäuren in EPS aus Belebtschlamm als gering (1 - 3 %) eingeschätzt [Frolund et al. 1996, Nielsen et al. 1996, Leppard et al. 2003]. In Zellwänden- und membranen treten Polysaccharide häufig in Verbindung mit Lipiden als Lipopolysaccharide auf (LPS). Ein besonders großer Anteil ist in gram-negativen Bakterien zu finden [Zelles 1999, Conrad et al. 2003]. Die Monosaccharide sind die über α - und β -glykosidische Bindungen verknüpft. Polysaccharide können aufgrund ihres Aufbaus in Homoglykane (gleiche Monosaccharid-Einheiten) und in Heteroglykane (verschiedene Monosaccharid-Einheiten) unterteilt werden. In Abhängigkeit der Art und Häufigkeit der glykosidischen Bindungen (1,4 oder 1,6) liegen die Polysaccharide als langkettige, verzweigte oder vernetzte Polymere vor. Polysaccharide sind überwiegend polymolekular, d. h. sie setzen sich aus einer Vielzahl von Molekülen mit einer breiten Molmassenverteilung zusammen, wobei das Grundgerüst gleich bleibt.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die mikrobiell gebildeten Polysaccharide Pullulan, Dextran und Alginat als Modell-EPS verwendet, die spezifische Eigenschaften der Polysaccharide in ihren verschiedenen Erscheinungsformen widerspiegeln.

Pullulan wird von dem Pilz *A. pullulans* gebildet und ist ein langkettiges Homoglykan bestehend aus Glukose-Monomeren.

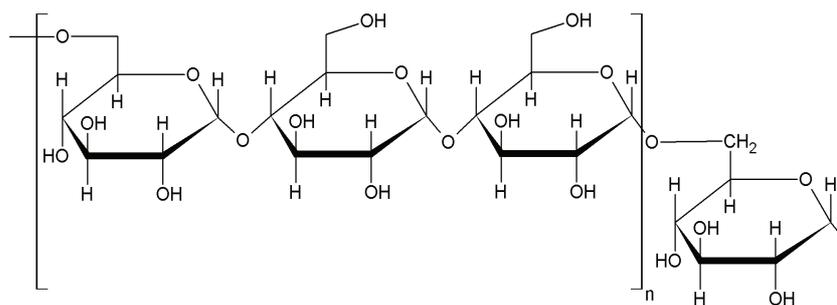


Abbildung 4: Strukturmodell des Polysaccharides Pullulan.

Glukose liegt α -1,4-glykosidisch gebunden in Maltotriose-Einheiten vor, welche miteinander α -1,6-glykosidisch verknüpft sind, wie in Abbildung 4 dargestellt ist. Das Molekulargewicht beträgt zwischen 10 und 1000 kDa [Lazaridou et al. 2003].

Dextran wird von Bakterien der Gattung *Leuconostoc* (*L. mesenteroides* und *L. dextranicum*) synthetisiert und stellt ein verzweigtes Homoglykan dar. Der überwiegende Teil der Glukose-Monomere ist α -1,6-glykosidisch verknüpft. Die Verknüpfungsarten der Seitenketten wurden als α -1,2, α -1,3 und α -1,4 identifiziert. Die Einheiten können einzelne D-Glukose-Bausteine und/oder Ketten von α -1,6 verknüpften D-Glukose-Einheiten sein.

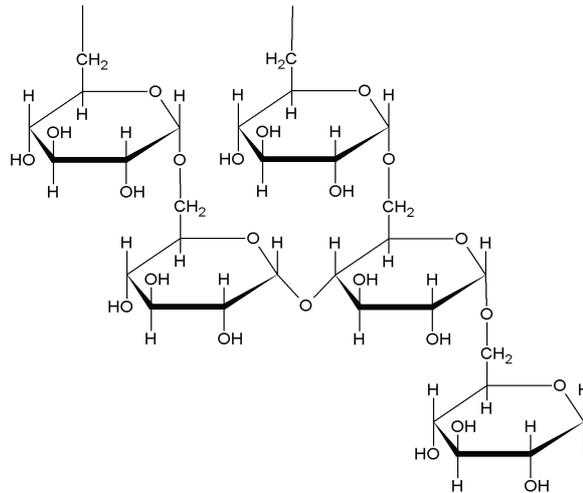


Abbildung 5: Strukturmodell des Polysaccharides Dextran.

Die Anzahl und Art der Anordnung der Seitenketten führen somit zu Unterschieden in der Struktur der Dextrane. Dextran ist polymolekular und weist Molekulargewichte zwischen 70 und 250 kDa auf [Ebert et al. 2003]. In Abbildung 5 ist ein Strukturmodell von Dextran dargestellt.

Alginate wird von Braunalgen und einigen Bakterien, wie z. B. *Pseudomonas aeruginosa* oder *Azotobacter vinelandi*, gebildet und ist ein unverzweigtes, langkettiges Heteroglykan.

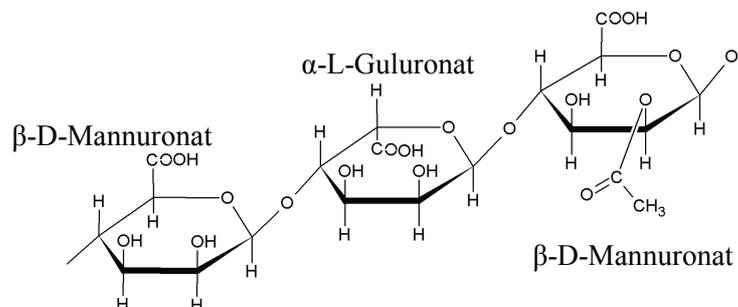


Abbildung 6: Strukturmodell eines MG Blocks des Polysaccharides Alginate [modifiziert nach Rode 2004].

Es besteht aus den beiden Uronsäuren α -L-Guluronsäure und β -D-Mannuronsäure. Die Bausteine im Alginat-Molekül sind in Blockstrukturen angeordnet [Gacesa und Russell 1990], die homopolymer oder heteropolymer sind. Homopolymere Blöcke bestehen aus Poly- β -D-Mannuronsäure (M-Blöcke) oder Poly- α -L-Guluronsäure (G-Blöcke). In Heteropolymer-Regionen (MG-Blöcke) liegen beide Uronsäuren statistisch verteilt vor. Die verschiedenen Blöcke sind 1,4-glykosidisch zu einer linearen Kette miteinander verbunden.

Proteine

Proteine bestehen aus Aminosäuren, die in für jedes Protein spezifischer Menge und Sequenz über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Proteine können Molmassen in einem weiten Bereich von 6 bis über 1000 kDa aufweisen. Jedes Protein besitzt eine genau definierte Sequenz aus Aminosäuren (Primärstruktur), die die Struktur und Eigenschaften des Proteins bestimmt. Die Aminosäureketten weisen bestimmte Faltungen (Sekundärstruktur) auf, die durch Wasserstoffbrücken zwischen verschiedenen Peptid-Gruppen entstehen. Die häufigsten Sekundärstrukturen stellen die α -Helix- und die β -Faltblatt-Struktur dar. Die relative Anordnung der Sekundärstrukturen innerhalb der Proteine wird als Tertiärstruktur bezeichnet. Somit ist die Gestalt der einzelnen Polypeptid-Ketten durch die Primär-, Sekundär-, und Tertiärstruktur gegeben. Einige Proteine bestehen aus mehreren Peptid-Ketten. Die Anordnung der verschiedenen Peptid-Ketten zueinander wird als Quartärstruktur bezeichnet. Im Rahmen der Arbeit wurde das Protein BSA als Standardprotein verwendet, welches in der Biofilm- und EPS-Forschung das am häufigsten verwendete Standardprotein ist und dessen Aminosäuresequenz bekannt ist [Hirayama et al. 1990] (Tabelle 51, Anhang C).

2.3. Physiko-chemische Charakterisierung von EPS

Eine große Herausforderung bei der Analytik von EPS stellt deren Heterogenität und die damit verbundenen niedrigen Konzentrationen einzelner Verbindungen dar. Aus diesem Grund findet eine Charakterisierung häufig auf Basis summarischer Parameter statt, welche allerdings mit einem Informationsverlust im Hinblick auf die Molekülstruktur verbunden sind. Daher werden in der vorliegenden Arbeit neben der Charakterisierung auf Grundlage summarischer Parameter auch strukturaufklärende Analysen durchgeführt und mit Ergebnissen der summarischen Parameter ergänzt.

2.3.1. Elementanalyse

Grundlegende Informationen über die Zusammensetzung von Biofilmen und EPS können durch die Quantifizierung der Hauptelemente erhalten werden. Für EPS werden üblicherweise die Gehalte an Kohlenstoff und Stickstoff sowie in einigen Fällen von Wasserstoff bestimmt. EPS bestehen zu ungefähr 30 bis 40 % (w/w) aus Kohlenstoff und in Abhängigkeit des

Protein-Gehalts zu 5 bis 10 % (w/w) aus Stickstoff. Aufgrund der unterschiedlichen Aschegehalte der Proben sind die absoluten Elementgehalte verschiedener Proben wenig aussagekräftig. Dabei repräsentiert der Aschegehalt die Menge anorganischer Salze und Spurenelemente, die zum Teil aus der Umwelt bzw. aus dem Anzuchtmedium an die EPS adsorbiert oder erst durch die Extraktionsmethode eingetragen werden. Eine bessere Charakterisierungsmöglichkeit bieten daher Elementverhältnisse. Ein hohes N/C-Verhältnis spiegelt somit die Anwesenheit von Proteinen, Peptiden, N-actelyierten Kohlenhydraten (z. B. Murein) oder DNA wider.

2.3.2. Biochemisch-photometrische Methoden

Die Konzentrationen an Proteinen und Kohlenhydraten werden anhand charakteristischer farbgebender Reaktionen analysiert. Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wird die Lowry-Methode verwendet [Lowry et al. 1951]. Die Methode nach Lowry beruht auf der Komplexbildung von Kupfer mit bestimmten Aminosäuren der Proteine (Tryptophan, Tyrosin, Cystin, Histidin) unter alkalischen Bedingungen [Peterson 1979]. Folin-Phenol-Reagens (Phospho-Molybdän-Phosphorwolframsäure), auch Folin-Ciocalteu-Reagens genannt, bindet an die Proteinkomplexe und wird reduziert. Dabei wird das Absorptionsmaximum verschoben und die Probe verfärbt sich blau, so dass eine Absorptionsmessung bei $\lambda = 750$ nm durchgeführt werden kann.

Zur Konzentrationsbestimmung von Kohlenhydraten wird die Methode nach Dubois verwendet [Dubois et al. 1956]. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Reaktion reduzierender Zucker mit Phenol, was zu orange-gelben Reaktionsprodukten führt. Um sämtliche Zucker (Di-, Oligo-, Polysaccharide) in reduzierende Einfachzucker zu überführen, findet zunächst eine Säurehydrolyse mit konzentrierter Schwefelsäure statt. Es werden alle Arten an Kohlenhydraten (Mono-, Oligo-, Polysaccharide, Hexosen, Pentosen, Uronsäuren) gleichermaßen erfasst, wodurch eine Bestimmung des Gesamt-Kohlenhydrat-Gehalts ermöglicht wird. Die Bestimmung des Gesamt-Kohlenhydrat-Gehalts erfolgt durch Messung der Absorption der entsprechend behandelten Probe bei $\lambda = 485$ nm.

Die UV/Vis-Spektroskopie dient bei der Charakterisierung von EPS überwiegend der Konzentrationsbestimmung, kann jedoch im Falle der spezifischen Absorption (SUVA, engl.: specific UV absorbance) auch zur strukturellen Aufklärung herangezogen werden. Dazu werden üblicherweise SUVA-Werte für die Wellenlängen $\lambda = 254$ nm (UV-Bereich) in L/mg ermittelt, wobei der spektrale dekadische Absorptionskoeffizient α auf die DOC-Konzentration bezogen wird:

$$SUVA = \frac{\alpha}{\rho(DOC)} \quad (1)$$

Die Absorption in diesem Bereich wird vor allem durch aromatische und konjugierte Elektronensysteme verursacht, die in Proteinen, DNA und in aus der Umwelt sorbierten Huminstoffen vorkommen.

2.3.3. Größenausschlusschromatographie (SEC)

Zur Untersuchung der Molekülgrößenverteilung von eEPS und SMP wurde die Größenausschlusschromatographie (SEC, engl.: size exclusion chromatography) eingesetzt. Die SEC ist eine Unterart der Flüssigchromatographie, bei der die Trennung der Analyten anhand ihres unterschiedlichen hydrodynamischen Radius mit Hilfe eines porösen Trennsäuenfüllmaterials und einer flüssigen Elutionsphase erfolgt.

Als stationäre Phase dient ein Trenngel mit definierter Partikel- und Porengröße. In Abhängigkeit der Größe der unterschiedlichen Moleküle dringen diese unterschiedlich weit in die Poren des Trenngels ein und werden dadurch in unterschiedlichem Maße retardiert. Große Moleküle mit einem hydrodynamischen Radius größer als die Porengröße des Gels können nicht in die Poren eindringen und eluieren somit am Ausschlussvolumen der Säule (V_0), welches dem Flüssigkeitsvolumen zwischen den Gelpartikeln der Trennsäule entspricht. Im Gegensatz dazu können kleine Moleküle leicht in den intrapartikulären Porenraum eindringen und werden dadurch retardiert. Sie eluieren am Permeationsvolumen (V_p) der Säule, welches die Summe aus den Volumina der Flüssigkeit in den Poren und zwischen den Gelpartikeln darstellt. Moleküle deren hydrodynamischer Durchmesser zwischen den oben beschrieben liegt, werden je nach Größe aufgetrennt und eluieren zwischen V_0 und V_p .

Neben dem Trennprinzip basierend auf den Diffusionsvorgängen, kann es bei den in der Arbeit verwendeten TSK-Gelen zu Wechselwirkungen der gelösten organischen Substanzen mit der Gelmatrix kommen. Besonders hydrophobe Strukturen neigen zu Wechselwirkungen mit der Gelmatrix und somit zu zusätzlicher Retardierung. Daneben können ionogene Wechselwirkungen, van-der-Waals-Kräfte sowie Wasserstoffbrückenbindungen auftreten, welche die Retardierung zusätzlich beeinflussen.

Zur möglichst vollständigen Unterdrückung von hydrophoben Wechselwirkungen wird in der Praxis häufig ein organisches Lösemittel (organischer Modifier) mit einem Volumenanteil von bis zu 20 % zum wässrigen Eluenten eingesetzt. Ein solcher Zusatz verbietet sich hier durch den Einsatz eines Detektors zur Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC, engl.: dissolved organic carbon) [Huber und Frimmel 1991, Huber 1992].

Neben der fehlenden Unterdrückung von hydrophoben Wechselwirkungen durch Einsatz eines organischen Modifiers weicht die angewandte Methode in einem zweiten Punkt von der „klassischen“ SEC-Methode ab. Üblicherweise erfolgt keine Anpassung der Ionenstärke in der Probelösung an die Ionenstärke des Eluenten. Dadurch kommt es infolge eines erwünschten ionenchromatographischen Effektes zu einer Co-Elution aller niedermolekularen organischen Säuren, die so als Summe quantifiziert werden können. Aufgrund der oben

genannten Abweichungen wird diese Methode im Folgenden mit LC-UV/OCD (Liquid Chromatography-Ultraviolet Absorbance/Organic Carbon Detection) bezeichnet.

Die Molekülgrößenverteilung von eEPS und SMP wurde in der vorliegenden Arbeit mittels zwei verschiedener Größenausschlusschromatographie-Systeme durchgeführt. Das LC-UV/OCD-System kombiniert die Größenausschlusschromatographie mit einer UV- und DOC-Detektion [Huber 1992]. Dies erlaubt die direkte Bestimmung der gelösten organischen Substanz im Anschluss der chromatographischen Trennung. Zur Oxidation der gelösten organischen Substanz wurde in dem von Huber entwickelten LC-UV/OCD-System ein spezieller Reaktortyp (Grenzfilmreaktor) verwendet [Huber und Frimmel 1991].

Die seit Jahren bestehende LC-OCD-Methode konnte in jüngster Zeit um einen Detektor zur Bestimmung von organischen Stickstoffverbindungen (OND, engl.: organic nitrogen detection) erweitert werden. Das Prinzip dieses Stickstoff-Detektors beruht auf der Oxidation von gelösten stickstoffhaltigen Verbindungen zu Nitrat (sowie Kohlendioxid und Wasser) in einem Teilstrom des Säuleneluats. Das gebildete Nitrat wird anschließend anhand eines UV-Detektors bei $\lambda = 210$ nm detektiert. Eine Quantifizierung ist durch die Kalibrierung mit Nitrat oder einer anderen stickstoffhaltigen Verbindung möglich. Eine Unterscheidung zum Nitrat, welches schon in der aufgegebenen Probe enthalten ist, erfolgt anhand dessen Retentionszeit auf der chromatographischen Trennsäule. So kann bei Anwesenheit von Nitrat in der Probe in diesem Retentionszeitfenster keine Quantifizierung anderer stickstoffhaltiger Komponenten erfolgen. Nitrit als weitere anorganische „Stör“-Substanz eluiert auf der eingesetzten Trennsäule mit gleicher Retentionszeit wie Nitrat. Ammonium wird ebenfalls zu Nitrat oxidiert, besitzt aber eine deutlich höhere Retentionszeit und kann daher ebenfalls unterschieden und quantifiziert werden. Organische Substanzen, die aufgrund ihrer Eigenabsorption bei $\lambda = 210$ nm eine Querempfindlichkeit der Methode bewirken würden, werden durch eine spezielle UV-Quarzkapillarlampe (DONOX) vor dem UV-Detektor zerstört. Diese DONOX-Lampe bewirkt gleichzeitig auch die Oxidation der stickstoffhaltigen Verbindungen zu Nitrat. Diese Methode wird im Folgenden als LC-OCD/OND bezeichnet.

Ein Problem bei der Untersuchung von EPS und SMP stellt der Vergleich der Ergebnisse mit Kalibrierstandards dar. Eine optimale Größenausschlusschromatographie und quantitative Interpretation der Ergebnisse ist nur möglich, wenn die Wechselwirkungen der untersuchten Proben identisch zu denen der Kalibrierstandards sind [Perminova et al. 1998]. Da es keine Kalibrierstandards für EPS und SMP gibt, ist diese Voraussetzung nicht gegeben. DOC-Chromatogramme, die unter identischen Bedingungen aufgenommen wurden, lassen jedoch einen Vergleich auf relativer Basis sehr gut zu.

2.3.4. NMR-Spektroskopie

Die NMR-Spektroskopie (NMR, engl.: nuclear magnetic resonance) stellt eine wichtige spektroskopische Methode zur Strukturaufklärung organischer Verbindungen dar und basiert auf dem Kernspin I und seiner „Orientierbarkeit“ im äußeren Magnetfeld. Das Verfahren wird bei Atomkernen angewendet, welche einen von Null verschiedenen Kernspin ($I \neq 0$) besitzen. Solche Kerne weisen einen Gesamtdrehimpuls und damit ein magnetisches Moment auf. Unter dem Einfluss eines statischen, homogenen Magnetfeldes werden Übergänge zwischen Energieniveaus durch Einstrahlen einer elektromagnetischen Strahlung im Radiofrequenzbereich induziert. Die zeitabhängige Wiederherstellung der Gleichgewichtszustände wird dabei als Relaxation bezeichnet und stellt die Grundlage für die Anwendung der NMR-Spektroskopie als Messmethode dar [Friebolin 2006].

2.3.4.1. Kerndrehimpuls und Zeeman-Wechselwirkung

Die Energiezustände von Atomkernen sind quantisiert. Sie werden durch den Gesamtdrehimpuls des Korns (= Kernspin I), der sich aus den Spins und den Bahndrehimpulsen der Nukleonen zusammensetzt, beschrieben. Die Spins lassen sich als Rotation der Nukleonen um die eigene Achse betrachten; die Bahndrehimpulse als Bewegungen der Nukleonen im Kern. Protonen und Neutronen in Atomkernen besitzen den Spin $I = \pm \frac{1}{2}$ und einen ganzzahligen Bahndrehimpuls. Atomkerne mit einer speziellen Kombination an Protonen und Neutronen zeigen einen von Null verschiedenen Kerndrehimpuls ($I \neq 0$), den so genannten Kernspin I . Die in dieser Arbeit wichtigen Isotope ^1H und ^{13}C haben den Kernspin $I = \frac{1}{2}$.

Alle Kerne mit Spin $I \neq 0$ besitzen ein magnetisches Dipolmoment μ und können mit internen und externen magnetischen Feldern in Wechselwirkung treten. Das magnetische Moment μ steht über das gyromagnetische Verhältnis γ (kernspezifische Größe) mit dem Drehimpulsvektor \vec{I} im Verhältnis. Der Kernspin I und damit auch das magnetische Moment μ können nur diskrete Werte als Vielfaches des Planckschen Wirkungsquantum \hbar annehmen:

$$\mu = \gamma \hbar I \quad (2)$$

Ein „freier“, isolierter Kern mit Spin $I = \frac{1}{2}$ besitzt ein entartetes Energieniveau E_0 . Beim Anlegen eines statischen, homogenen Magnetfeldes B_0 wird die Entartung aufgehoben. Für Protonen ($I = \frac{1}{2}$) ergeben sich zwei verschiedene Werte für die magnetische Quantenzahl m_I ($m_I = \frac{1}{2}$ und $m_I = -\frac{1}{2}$). Es resultiert eine Aufspaltung in zwei Energieniveaus E_α und E_β , die man als Kern-Zeeman-Niveaus bezeichnet. Die Energiedifferenz E_{NZ} zum entarteten Energieniveau beträgt:

$$E_{NZ} = -\vec{\mu} \vec{B}_0 = -m_I \hbar \gamma B_0 \quad (3)$$

In Abhängigkeit der Stärke des äußeren Magnetfeldes B_0 besitzen die kernmagnetischen Momente $\vec{\mu}$ unterschiedliche potentielle Energien. E_α beschreibt das niedrigere und damit energetisch günstigere Niveau in paralleler Spinrichtung zum äußeren Magnetfeld, während Spins mit einer antiparallelen Spinrichtung das energetisch höhere Niveau E_β besetzen. Die Energiedifferenz wächst linear mit der Induktion B_0 (Abbildung 7).

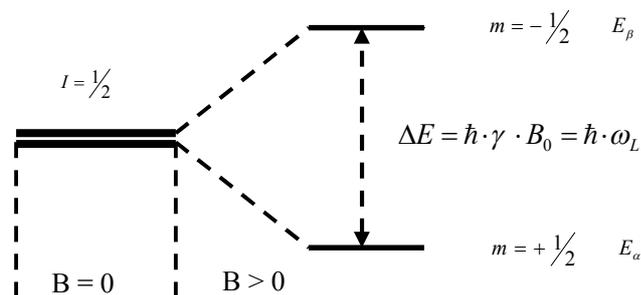


Abbildung 7: Aufspaltung der Energieniveaus in Abhängigkeit des äusseren Magnetfeldes B_0 . [modifiziert nach Traficante 1996].

Der Energieunterschied ΔE zwischen den aufgespaltenen Energieniveaus ($\Delta m_I = 1$) beträgt:

$$\Delta E = \hbar \cdot \gamma \cdot B_0 = \hbar \cdot \omega_L \quad (4)$$

Dabei ist ω_L die Larmor-Frequenz mit der der Kernspin um eine parallel zum Magnetfeld ausgerichtete Achse rotiert. Durch elektromagnetische Strahlung lassen sich Übergänge zwischen den aufgespaltenen Energieniveaus induzieren. Dabei gilt folgende Resonanzbedingung für die Energie der Photonen:

$$h\nu = \hbar \omega_L \quad (5)$$

Die Resonanzfrequenz ist somit vom gyromagnetischen Verhältnis γ und von der Stärke der magnetischen Induktion \vec{B}_0 abhängig. Durch das kernspezifische gyromagnetische Verhältnis γ ist es experimentell möglich, gezielt einzelne Kernsorten in Abhängigkeit von ihrer Umgebung zu untersuchen.

Die Übergangswahrscheinlichkeit und somit die Stärke des detektierbaren Signals hängt bei Einstrahlung der Resonanzfrequenz vom Besetzungsunterschied $\Delta N = N_\alpha - N_\beta$ der jeweiligen

Energieniveaus α und β ab. Im thermischen Gleichgewicht ist die Aufteilung der einzelnen Spins auf die Energieniveaus durch die Boltzman-Verteilung gegeben:

$$\frac{N_\alpha}{N_\beta} = e^{\frac{\hbar\gamma B_0}{k_B T}} = e^{\frac{\Delta E}{k_B T}} \quad (6)$$

Dabei ist N_α die Anzahl der Kernspins im Energieniveau α mit $m_I = -1/2$ und N_β die Anzahl im Energieniveau β mit $m_I = +1/2$.

Der Unterschied der relativen Besetzungszahlen ist dabei sehr gering, so dass eine makroskopische Kernmagnetisierung \vec{M}_0 parallel zu \vec{B}_0 resultiert. Es gilt:

$$\vec{M}_0 \propto \frac{N \gamma^2 \vec{B}_0}{T} \quad (7)$$

Die Größe der makroskopischen Magnetisierung ist abhängig von der Anzahl der Kernspins N , dem gyromagnetischen Verhältnis γ , der magnetischen Induktion \vec{B}_0 und der absoluten Temperatur T .

2.3.4.2. Chemische Verschiebung

Durch Einbringen einer Probe in ein Magnetfeld wird das Magnetfeld B_0 am Kernort (effektive Induktion B_{eff}) durch die Elektronenhülle verändert. Diese Veränderung des effektiven Magnetfeldes B_{eff} gegenüber B_0 bzw. die Veränderung der Kern-Zeemann-Wechselwirkung wird als Abschirmung bezeichnet:

$$B_{\text{eff}} = B_0 (1 - \sigma) \quad (8)$$

Sämtliche Faktoren, die die elektronische und magnetische Umgebung des zu messenden Kerns verändern, beeinflussen somit auch dessen Resonanzfrequenz. Daher geht die Abschirmungskonstante σ in die Resonanzbedingung mit ein:

$$\nu = \frac{\gamma B_0 (1 - \sigma)}{2\pi} \quad (9)$$

Atome gleicher Sorte, aber in unterschiedlicher chemischer Umgebung weisen eine unterschiedliche Elektronendichteverteilung auf, was in einer spezifischen Abschirmungs-

konstante σ resultiert. Die Differenz zwischen der Resonanzfrequenz des Kerns in der Probe und der eines Referenzkerns wird als chemische Verschiebung bezeichnet. Dabei bezieht man sich auf die Abschirmungskonstante einer Referenzsubstanz σ_{ref} mit der Resonanzfrequenz ν_{ref} . In der Praxis wird die chemische Verschiebung in einer vom \vec{B}_0 -Feld unabhängigen ppm-Skala angegeben:

$$\delta_{ppm} = \sigma_{ref} - \sigma_S = 10^6 \frac{\nu_{exp} - \nu_{ref}}{\nu_{ref}} \quad (10)$$

Da die Elektronendichteverteilung eines Atoms in Molekülen meist asymmetrisch ist, ist die Abschirmung richtungsabhängig. Neben der isotropen Abschirmungskonstante σ erhält man daher noch einen anisotropen Term $\Delta\sigma$. Die Änderung der Abschirmungskonstanten $\Delta\sigma$ ist von den Werten der drei Hauptachsen des Tensors σ abhängig. Aufgrund schneller und zufälliger Rotationen in Flüssigkeiten mittelt sich $\Delta\sigma$ zu Null. Im Gegensatz dazu variieren die Beträge der effektiven magnetischen Induktion \vec{B}_{eff} in festen Stoffen, was zu stark verbreiterten Resonanzlinien führt. Bei sehr schneller Rotation der festen Probe um eine Achse, die den Winkel Θ zur magnetischen Induktion B_0 bildet, gilt:

$$\Delta\sigma \propto 3 \cos^2 \Theta - 1 \quad (11)$$

Für den magischen Winkel $\Theta = 54,7^\circ$ wird der anisotrope Term $\Delta\sigma$ Null. Neben der Winkelabhängigkeit der chemischen Verschiebungsanisotropie (CSA) ist die lineare Abhängigkeit von der magnetischen Induktion \vec{B}_0 von Bedeutung, d. h. mit höherem Magnetfeld nimmt die Stärke der CSA-Wechselwirkung zu.

2.3.4.3. Relaxation

Im thermodynamischen Gleichgewicht ist der Kernmagnetisierungsvektor \vec{M}_0 parallel zur magnetischen Induktion B_0 ausgerichtet. Dies entspricht der z-Achse im (x, y, z)-Koordinatensystem. Bringt man das System durch das Einstrahlen eines RF-Impulses mit der Larmorfrequenz des zu messenden Kerns aus dem Gleichgewicht, ergibt sich eine Änderung der Besetzungsverhältnisse des Spinsystems und eine Quermagnetisierung (M_x , M_y). Durch Relaxation kehrt das Spinsystem in den Gleichgewichtszustand zurück. Dabei wächst M_z wieder zu M_0 an und M_x und M_y gehen gegen Null. Die zeitliche Rückkehr der Magnetisierung \vec{M} mit den Komponenten M_x , M_y , M_z zum thermodynamischen Gleichgewicht M_0 wird als Relaxation bezeichnet.

Die longitudinale Relaxationszeit T_1 (Spin-Gitter-Relaxation) ist ein Maß für die Geschwindigkeit, mit der die Magnetisierung der z-Achse wieder aufgebaut wird, was der Wiederherstellung der Besetzung der Zeeman-Niveaus im thermischen Gleichgewicht nach vorheriger Anregung entspricht. Da die freiwerdende Energie über fluktuierende Magnetfelder aus dem Kernspinsystem an die Umgebung (Gittersystem) übertragen wird, wird der Prozess als Spin-Gitter-Relaxation bezeichnet. Mathematisch wird die Veränderung der Magnetisierung in z-Richtung (M_z) durch die Blochsche Gleichung beschrieben:

$$\frac{dM_z}{dt} = \frac{M_0 - M_z}{T_1} \quad (12)$$

Die Lösung der Gleichung stellt eine Exponentialfunktion dar. Die reziproke Relaxationszeit T_1^{-1} entspricht dabei der Geschwindigkeitskonstanten. Üblicherweise werden Wartezeiten τ zwischen Resonanzanregungen von $5 T_1$ eingehalten, um Sättigungseffekte zu vermeiden.

Die Bestimmung der T_{1H} -Zeit findet in der Praxis mittels eines „inversion recovery“-Experiments mit einer Impulsabfolge von $180^\circ - \tau - 90^\circ$ -FID statt. Durch den 180° -Puls findet zunächst eine Invertierung der Magnetisierung M_0 statt, die somit in die Richtung der (-z)-Achse zeigt. Während der Zeit τ relaxiert das System mit einer Geschwindigkeitskonstanten von $k = T_1^{-1}$. Nach der Zeit τ wird ein 90° -Puls auf das Spinsystem gegeben und die Magnetisierung direkt aufgezeichnet. Ist zu diesem Zeitpunkt M_0 immer noch negativ, ergibt sich für M_z nach Rotation in der (x,y)-Ebene und nach Fourier-Transformation ein negatives Signal. Ist der Pulsabstand τ lang genug, wächst M_z über den Koordinatenursprung hinaus und man erhält ein positives Signal. Im Falle von $\tau = (\ln 2) T_1$ ist M_0 gerade bis zum Koordinatenursprung relaxiert und man erhält kein Signal. In Abbildung 8 sind die durch Relaxation erreichten Entwicklungsstufen des Magnetisierungsvektors M_z für verschiedene Pulsabstände τ dargestellt.

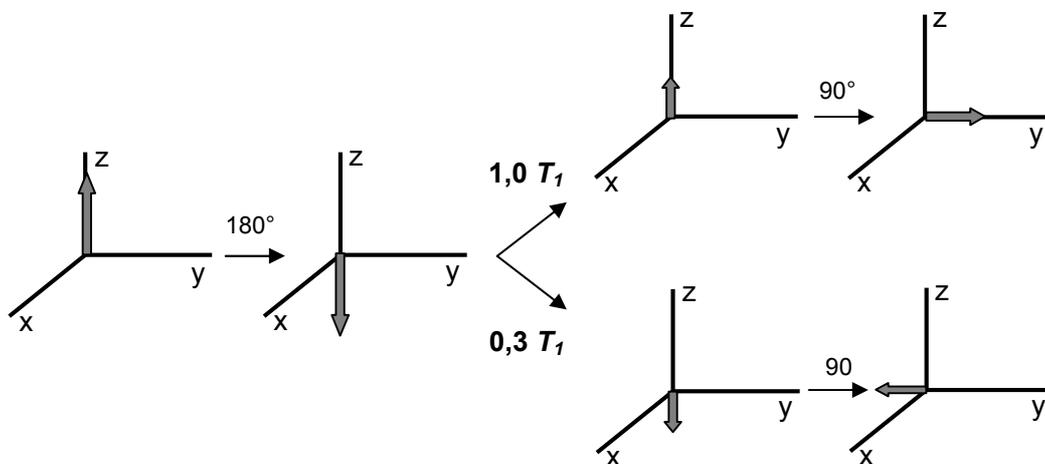


Abbildung 8: Entwicklungsstufen des Magnetisierungsvektors M_z für verschiedene Wartezeiten τ bei einem „inversion recovery“-Experiment [modifiziert nach Traficante 1996].

Die transversale Relaxationszeit T_2 (Spin-Spin-Relaxation) charakterisiert die Änderung der Quermagnetisierung $M_{x,y}$ bis zum Wert Null. Hierbei bleibt die Gesamtenergie des Spinsystems konstant, da die Besetzungsverhältnisse der Zeeman-Niveaus unverändert bleiben. Da über der gesamten Probe kein homogenes Magnetfeld B_0 vorliegt sowie durch intra- und intermolekulare Wechselwirkungen natürliche Feldinhomogenitäten anfallen, unterscheiden sich die Präzessionsfrequenzen ν_0 auch für chemisch äquivalente Kerne geringfügig. Dieser Verlust der Phasenkohärenz führt dazu, dass die effektive Magnetisierung in x- bzw. y-Richtung abnimmt, was durch die Relaxationszeit T_2 beschrieben wird. Die Differentialgleichung der Magnetisierung bezüglich der x- bzw. y-Achse lautet nach Bloch:

$$\frac{dM_{x,y}}{dt} = -\frac{M_{x,y}}{T_2} \quad (13)$$

Anhand der T_2 -Relaxationszeiten werden Informationen über den zeitlichen Verlauf des freien Induktionsabfalles (FID, engl.: free induction decay) und der Halbwertsbreite $\Delta\nu_{1/2}$ des NMR-Signals gewonnen.

2.3.4.4. Festkörper-NMR-Spektroskopie

Ziel der Anwendung der Festkörper-NMR auf EPS und Biofilme ist eine möglichst gute Auflösung entlang der chemischen Verschiebungsskala, was eine Quantifizierung unterschiedlicher Gruppen von Strukturelementen ermöglicht. Um die anisotropen Wechselwirkungen zu reduzieren, werden spezielle Techniken, wie MAS (engl.: magic angle spinning) und Hochleistungs-Protonen-Entkopplung angewendet. Mittels der Kreuzpolarisation (CP, engl.: cross polarisation) lässt sich die Empfindlichkeit des NMR-Experiments erhöhen.

2.3.4.4.1. *Rotation um den magischen Winkel (MAS)*

In der Flüssig-NMR-Spektroskopie werden aufgrund schneller Translations- und Rotationsbewegungen anisotrope Wechselwirkungen herausgemittelt, so dass ein hoch aufgelöstes Spektrum erhalten wird. Im Gegensatz dazu führen die anisotropen Wechselwirkungen in der Festkörper-NMR-Spektroskopie zu breiten und weniger strukturierten Spektren. Die Winkelabhängigkeit der chemischen Verschiebungsanisotropie von schnellen Probenrotationen wurde bereits in Kapitel 2.3.4.2 erwähnt. Verallgemeinert lässt sich der Anisotropie-Anteil des chemischen Verschiebungstensors wie folgt darstellen:

$$\sigma_{aniso} = \frac{1}{3} \sum_{i=1}^3 \sigma_{ii} (3 \cos^2 \Theta_{iz} - 1) \quad (14)$$

Dabei sind die drei Hauptachsen des Tensors mit den Indices $i = 1-3$ gekennzeichnet. Der Winkel zwischen der z-Achse des Laborkoordinatensystems und der entsprechenden Hauptachse des Tensors geht als θ_{iz} in die Gleichung ein. Bei einem magischen Winkel von $\Theta = 54,7^\circ$ wird der winkelabhängige Term $(3\cos^2\Theta-1)$ des Tensors der chemischen Verschiebung Null. Somit wird die chemische Verschiebungsanisotropie eliminiert. Dies gilt für den Fall einer hinreichend schnellen Rotation bei der die in der Probe verteilten Orientierungen im zeitlichen Mittel aller Spins diesen magischen Winkel zum statischen Magnetfeld einnehmen. Bei ^{13}C -Messungen am 400 MHz-Spektrometer, wie in der vorliegenden Arbeit, bedeutet dies, dass Rotationsfrequenzen von etwa 15 kHz ausreichen, um die Linienverbreiterung aufgrund CSA weitgehend zu beseitigen. Die Anisotropie der chemischen Verschiebung kann somit mit Hilfe der MAS-Technik effektiv herausgemittelt werden.

2.3.4.4.2. Kreuzpolarisation

Durch die CP-Technik wird die Signalintensität von Kernen mit geringer Häufigkeit X (^{13}C) durch Kerne mit größerer Häufigkeit H und einem größeren gyromagnetischen Verhältnis γ erhöht. Die Magnetisierung von Kernen mit größerer Häufigkeit H wird dabei auf Kerne mit geringer natürlicher Häufigkeit X übertragen. Durch den Magnetisierungsaufbau über Protonen, die wesentlich kürzere Relaxationszeiten T_{1H} besitzen, lassen sich die längeren Relaxationszeiten der X-Kerne T_{1X} deutlich verkürzen. Zeitbestimmend für die Relaxation sind dann nicht mehr die T_{1C} -Zeiten, sondern die wesentlich kürzeren T_{1H} -Zeiten.

Der Magnetisierungstransfer über die heteronukleare Dipol-Dipol-Kopplung von H- auf X-Spins ist maximal, wenn die Stärke der B_1 -Felder der Hartmann-Hahn-Bedingung folgt:

$$\gamma_H B_{1H} = \gamma_C B_{1C} \quad (15)$$

Ist diese Bedingung erfüllt, so ist die Kern-Zeeman-Aufspaltung der Protonen und ^{13}C -Kerne energetisch gleich und es kommt zu einem Energietransfer.

Während des „CP“-Prozesses zerfällt die Magnetisierung \vec{M}_H mit der charakteristischen Protonen-Spin-Gitter-Relaxationszeit im rotierenden System $T_{1\rho}(1H)$ für die gilt: $T_2 < T_{1\rho}(1H) < T_{1H}$. Die ^{13}C -Magnetisierung $M(t_{CP})$ erreicht ein Maximum, da sie einerseits abhängig von der Zeitkonstante T_{CH} anwächst und andererseits eine Reduktion von $M(t_{CP})$ durch den Zerfall der Magnetisierung \vec{M}_H mit der charakteristischen Protonen-Spin-Gitter-Relaxationszeit im rotierenden System $T_{1\rho}(1H)$ erfolgt. Nach der Kreuzpolarisation werden die X-Spins bei entkoppelten H-Spins aufgenommen, um die Effekte der dipolaren Kopplung auf die Linienbreite zu minimieren.

Die CPMAS-NMR-Spektren zeigen im Vergleich zu DP (Direkte Polarisation)-NMR-Spektren ein besseres Signal/Rausch-Verhältnis da die Wiederholzeit der Experimente durch die T_{1H} -Zeiten bestimmt wird und somit mehr FIDs pro Zeiteinheit akkumuliert werden können. Der Energietransfer wird durch die Länge und die Form der CP-Pulse bestimmt. Um einen gleichmässigen Energietransfer auf alle in der Probe enthaltenen Kerne zu ermöglichen, wurde in der Arbeit ein gerampter-Puls angewendet.

2.4. Membranfiltration

2.4.1. Allgemeines

Kern aller Membranverfahren ist die Membran, mit den an ihr stattfindenden Transportvorgängen. Membranen sind folienartige, mikro- und makroporöse Trennschichten. Die Trennwirkung der Membran beruht darauf, dass sie für mindestens eine Komponente aus einem sie berührenden Rohwasser (Feed) permeabel und für andere Komponenten des gleichen Stroms undurchlässig ist. Somit stellt die Membran eine selektive Barriere zwischen zwei Medien unterschiedlicher Konzentration dar. Es kommt zur Trennung in zwei Phasen. Zum einen in das Lösungsmittel Wasser (Filtrat) und zum anderen in eine aufkonzentrierte Phase (Konzentrat).

Für alle Membranprozesse gelten zwei charakteristische Eigenschaften [Melin 1998]:

- 1) Die Trennung durch die Membran erfolgt rein physikalisch. Das zu trennende Medium wird nicht thermisch, chemisch oder biologisch verändert, was eine theoretische Wiederverwendung der getrennten Stoffe ermöglicht.
- 2) Die Kapazität lässt sich durch modulare Anordnung der Membranverfahren an jegliche Anwendungen anpassen.

2.4.2. Membranklassifizierung

Membranen werden zum einen nach der Größe oder Molmasse der größten noch durchgelassenen Komponenten und andererseits nach der aufgewendeten Triebkraft (Druckdifferenz oder elektrochemische Potentialdifferenz) unterschieden. Des Weiteren lassen sich Membranen in poröse und dichte Membranen unterteilen. Dichte Membranen, bei denen ein diffusiver Stofftransport durch die Membran erfolgt, werden als Lösungsdiffusionsmembranen bezeichnet; poröse Membranen, bei denen der Transport konvektiv erfolgt, als Porenmembranen [Melin und Rautenbach 2007].

In der Wasseraufbereitung werden überwiegend druckbetriebene Membranverfahren angewendet, wobei der transmembrane Druck (TMP, engl.: trans membrane pressure) die Triebkraft darstellt. Zu diesen Prozessen zählen die Umkehrosmose (UO), die Nanofiltration (NF), die Ultrafiltration (UF) und die Mikrofiltration (MF). Deren Unterscheidung findet durch die Höhe der nötigen Druckdifferenz sowie anhand der Porengröße der Membranen, welche verantwortlich für deren Trennverhalten ist, statt. In Abbildung 9 ist eine Einteilung der Membranfiltrationsverfahren und deren Trennverhalten anhand in dieser Arbeit relevanter Stoffe dargestellt.

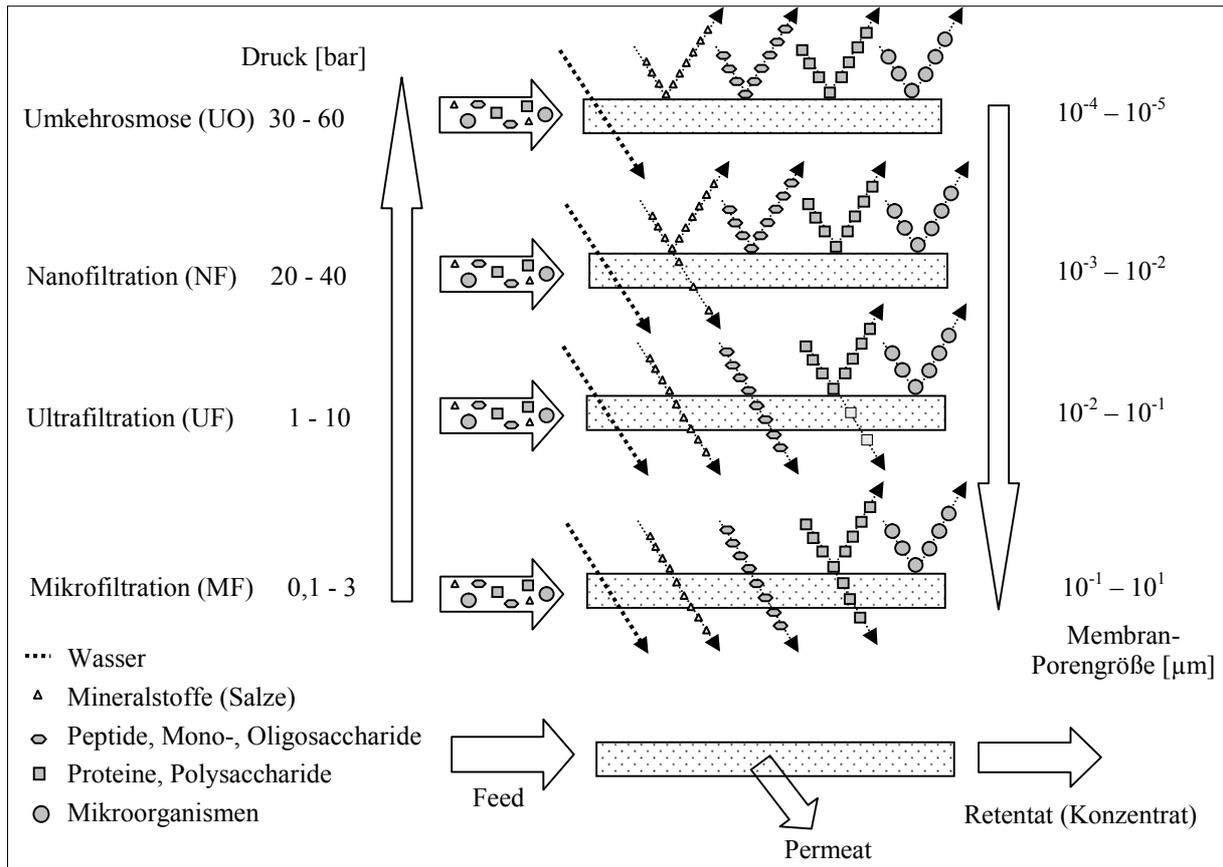


Abbildung 9: Einordnung der Membranverfahren.

Zur Abtrennung suspendierter Teilchen werden poröse Membranen (MF, UF) eingesetzt. Hierbei macht man sich sterische Effekte bzw. Siebeffekte zwischen Membranpore und den Komponenten des Gemisches zu Nutze. Bei ausreichend kleiner Porengröße sind UF-Membranen auch zur Abtrennung von gelösten Makromolekülen geeignet, wie z. B. bei der Fraktionierung von SMP. Der Arbeitsbereich der UF liegt üblicherweise zwischen 1 und 10 bar transmembraner Druckdifferenz, während bei der MF niedrigere Drücke zwischen 0,1 und 3 bar genutzt werden.

Im Gegensatz dazu findet die Trennung des Stoffgemisches bei der UO und NF aufgrund unterschiedlicher Löslichkeiten des Lösungsmittels und der gelösten Komponenten statt [Mason und Lonsdale 1993]. Während bei der UO nahezu alle gelösten Stoffe aus dem Wasser getrennt werden, werden bei der NF Moleküle mit Molmassen über 300 g/mol zurückgehalten. Zusätzlich erlauben NF-Membranen eine Trennung von ein- und mehrwertigen Ionen aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen von Ionen mit dem Polymermaterial der Membran.

Neben den verschiedenen beschriebenen Membrantypen gibt es unterschiedliche Möglichkeiten die Membranen anzuordnen. Bei der Anordnung von Membranen spricht man von Modulen, da technische Membrananlagen meist aus einer Vielzahl von identischen Einheiten, die über Rohrleitungen miteinander verbunden sind, modular aufgebaut sind. In der

Wasseraufbereitung häufig anzutreffende Module sind die Plattenmodule mit parallel angeordneten Membranen, Wickelmodule, in denen die Membranen, durch Abstandhalter (Spacer) getrennt, spiralförmig aufgerollt sind, Rohrmodule und Hohlfasermodule, in denen Tausende dünner Hohlfasern parallel durchströmt werden [Melin und Rautenbach, 2007].

Im Rahmen dieser Arbeit werden Hohlfasermodule in einem kleintechnischen sowie in einem kommunalen MBR eingesetzt, so dass im Weiteren auf diesen Modultyp näher eingegangen wird. In Abbildung 10 sind exemplarisch das Kapillarmodul der Firma Zenon (ZeeWeed®) sowie die im kleintechnischen MBR verwendeten Hohlfasermembranmodule dargestellt.

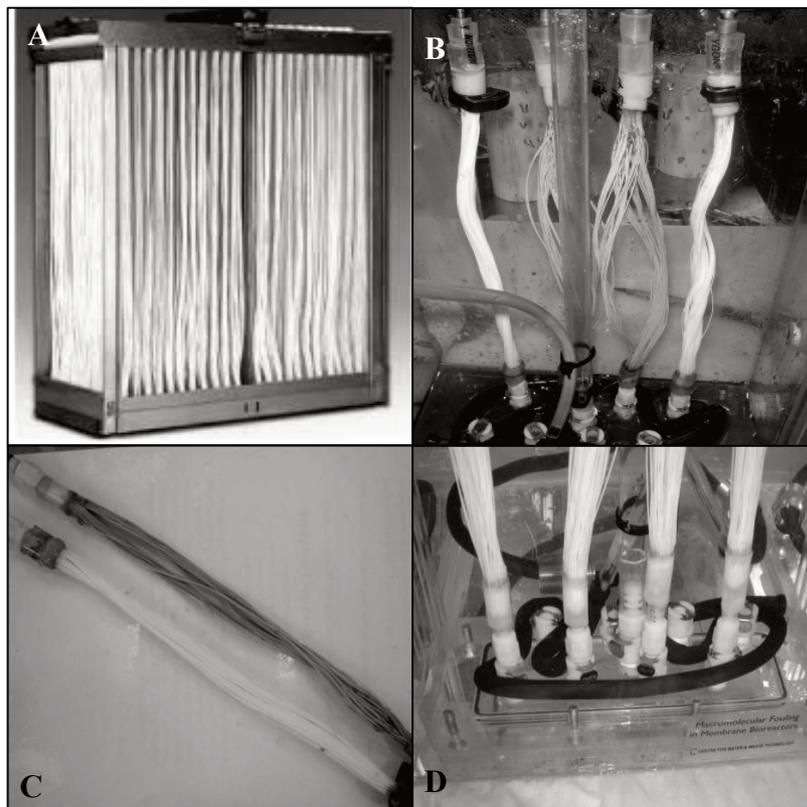


Abbildung 10: Getauchtes Hohlfasermodul der Firma Zenon (A) und Membranmodule UNSW (B, C, D).

Eine Vielzahl parallel angeordneter Hohlfasern ist zu einem Modul zusammengefasst. Die Hohlfasern besitzen Durchmesser von ca. 1 - 3 mm und sind außen mit einer Membran beschichtet. Die Module sind senkrecht angeordnet und werden zwischen zwei Kunststoffblöcken (Modulkopf und -fuß) fixiert, die als Pakete in Kassetten eingespannt werden. Das Permeat wird durch Anlegen eines Unterdrucks an der Kopfseite durch die Membran in den Hohlkörper gesaugt (Wasserfluss: „out/in“) und über eine im Modulkopf integrierte Sammelleitung als reines Filtrat abgeleitet. Der kommunale Membranbioreaktor Waldmössingen ist mit zwölf ZeeWeed-Modulen ausgestattet, welche in das Belebungsbecken integriert sind [Krampe und Laufer 2006].

2.4.3. Begriffe und Kenngrößen

Spezifischer Filtrationsfluss (J)

Der spezifische Filtratfluss (J) charakterisiert die hydraulische Leistungsfähigkeit einer Membran. J errechnet sich aus dem Permeat-Volumenstrom (Q_p) bezogen auf die Membranfläche (A_M):

$$J = \frac{Q_p}{A_M} \quad (16)$$

mit:

J : spezifischer Filtratfluss [L/m^2h]

Q_p : Volumenstrom Permeat [L/h]

A_M : aktive Membranfläche [m^2]

Brutto-/Nettofiltrationsfluss

Bei getauchten Membranen wird die Filtrationsleistung durch den Filtratfluss bezogen auf einen Quadratmeter Membranfläche pro Betriebsstunde beschrieben. Dabei ist es wichtig die Bezugsgrößen klar zu definieren. Der Bruttofluss definiert den während der Filtrationsphase ermittelten Fluss bezogen auf einen Quadratmeter Membranfläche. Im Gegensatz dazu wird beim Nettofluss die in einer Stunde behandelte Abwassermenge auf einen Quadratmeter bezogen [ATV-DVWK 2000]. Hier werden Rückspülmengen, die bis zu 20 % des erzeugten Filtrats ausmachen können, und Rückspülzeiten leistungsmindernd berücksichtigt. In dieser Arbeit werden die Auswertungen überwiegend auf die Nettoflüsse bezogen. In Abbildung 11 ist der Einfluss verschiedener Reinigungsverfahren auf das Netto-Permeatvolumen dargestellt.

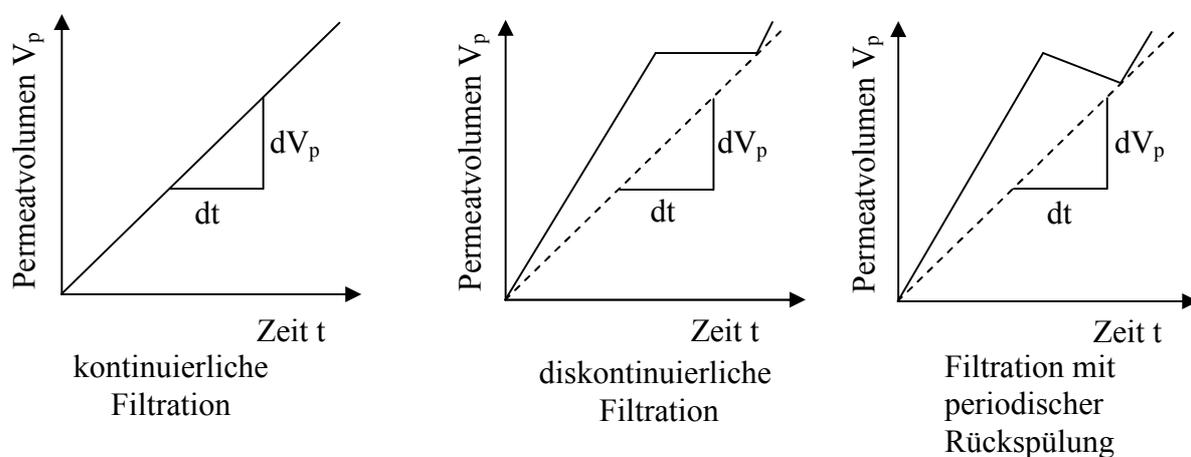


Abbildung 11: Einfluss der Reinigung auf das Netto-Permeatvolumen [nach ATV-DVWK 2000, Rosenberger 2003].

Transmembrane Druckdifferenz (TMP)

Die transmembrane Druckdifferenz Δp_{TMP} (TMP, engl.: trans membrane pressure) ist ein Maß für die treibende Kraft des Trennvorgangs durch die Membran. Sie wird aus dem mittleren Feed- und Konzentratdruck, abzüglich des Permeatdrucks, berechnet:

$$\Delta p_{TMP} = \frac{p_f + p_k}{2} - p_p \quad (17)$$

mit:

Δp_{TMP} : Transmembrane Druckdifferenz [bar]

p_f : Feeddruck [bar]

p_k : Konzentratdruck [bar]

p_p : Permeatdruck [bar]

Hydraulische Permeabilität

Die hydraulische Permeabilität (L_p) beschreibt das Verhältnis von Filtratfluss zu TMP. Die hydraulische Permeabilität ist ein Maß für die Durchlässigkeit der Membran:

$$L_p = \frac{J}{\Delta p_{TMP}} \quad (18)$$

mit:

L_p : Hydraulische Permeabilität [L/m²h bar]

Hydraulischer Widerstand

Der hydraulische Widerstand R ist proportional zum TMP und umgekehrt proportional zur Permeatviskosität η und dem Permeatfluss J_p :

$$R = \frac{\Delta p_{TMP}}{\eta J_p} \quad (19)$$

mit:

η : dynamische Viskosität des Permeats [kg/m s]

2.4.4. Prozessführung

Die Aufrechterhaltung eines hohen Permeatflusses ist ein wichtiges Kriterium für den Betrieb von Membranen und lässt sich über die Prozessführung beeinflussen. Ein gleichmäßiger hoher Permeatfluss setzt voraus, dass einer Deckschichtbildung, verursacht von zurückgehaltenen Feed-Inhaltsstoffen, gezielt entgegen gewirkt werden kann. Bei der MF und UF unterscheidet man zwischen drei Prozessführungen; dem statischen Betrieb (Dead-End-

Filtration), dem dynamischen Betrieb (Cross-Flow-Filtration, Querstromfiltration) und dem Betrieb von getauchten Membranen. Die Auswahl der geeigneten Prozessführung ist dabei abhängig vom Gehalt an Feststoffen in der zu filternden Suspension und der zu erzielenden Trennaufgabe.

Dead-End

Bei der Dead-End-Filtration findet eine orthogonale Durchströmung der Membran mit dem zu filtrierenden Medium statt. Dabei lagern sich alle zurückgehaltenen Teilchen auf der Membran ab, so dass ein Filterkuchen entsteht. Der Filterkuchen stellt einen stetig wachsenden Strömungswiderstand dar, was zur stetigen Abnahme des Permeatflusses durch die Membran führt (Abbildung 12). Durch physikalische Reinigungsverfahren, wie z. B. durch Rückspülung der Membran, lässt sich der Filterkuchen entfernen und der Permeatfluss regenerieren. Bei Vernachlässigung der Rückspülung oder anderer Reinigungsverfahren geht der Permeatfluss über die Zeit t gegen Null.

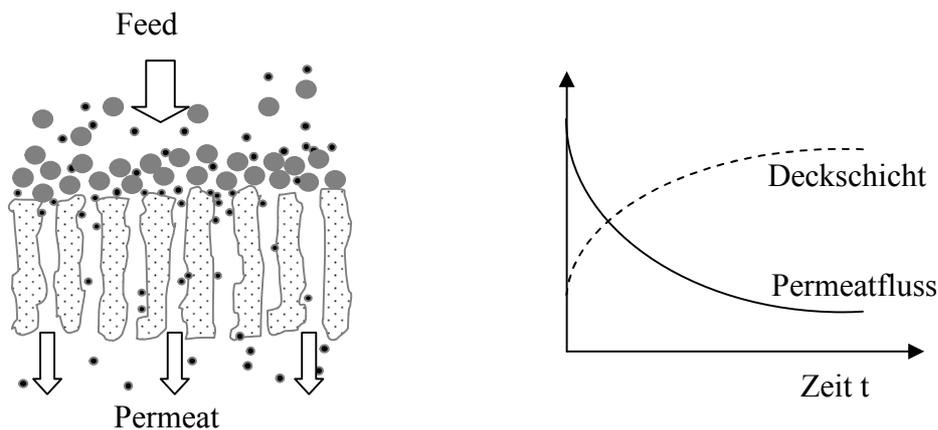


Abbildung 12: Schematische Darstellung des Dead-End-Betriebs [Melin 1998].

Die Betriebsweise wird überwiegend bei geringer Feed-Feststoffkonzentration angewendet, da bei hoher Feststoffkonzentration die Gefahr einer schnellen Verblockung besteht.

Cross-Flow

Im Gegensatz zum Dead-End-Betrieb wird bei der Cross-Flow-Filtration eine membranparallele Überströmung der Membran durch den Feed erzeugt. Dennoch kommt es zu Ablagerung von Partikeln auf der Membran und zu einer Deckschichtbildung, die sich jedoch durch die Feed-Strömung kontrollieren lässt. Die Überströmung erzeugt Scherkräfte auf der Membran, so dass abgelagerte Partikel in die Kernströmung zurückgeführt werden und sich je nach Strömungsgeschwindigkeit ein Gleichgewichtszustand ausbildet (Abbildung 13). Die Membranüberströmung ist mit einem feedseitigen Druckverlust über der Membran verbunden ist, was die Betriebsweise sehr energieaufwändig macht.

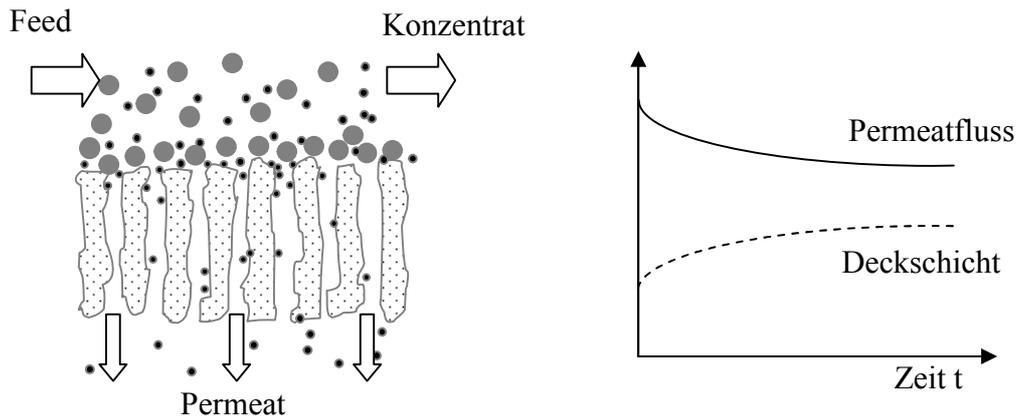


Abbildung 13: Schematische Darstellung des Cross-Flow-Betriebs [Melin 1998].

Getauchte Membranen

Das Funktionsprinzip von getauchten Membranen beruht, unterstützt von einer geeigneten Belüftung, auf einer Kombination zwischen Dead-End- und Cross-Flow-Filtration. Getauchte Membranen werden in das Becken mit dem zu filtrierenden Medium getaucht, so dass keine aufwendigen Modulgehäuse erforderlich sind. Die Triebkraft des Prozesses wird dabei über das Anlegen eines permeatseitigen Unterdrucks realisiert.

Neben getauchten Platten- und Kapillarmodulen kommen besonders häufig Hohlfasermodule zum Einsatz. Die Deckschichtkontrolle wird bei getauchten Hohlfasermembranen durch den Eintrag von Luft in die Becken direkt unterhalb der in Faserbündel zusammengefassten Membranen gewährleistet. Durch den erzeugten Cross-Flow wird eine membranparallele Walzenströmung erzeugt, die den umgebenden Wasser/Schlammkörper in Bewegung setzt. Durch diesen Effekt wird das vor den Membranen entstehende Konzentrat (Membranbeläge bzw. beginnende Verschlämzung) kontinuierlich aus dem Modul gefördert und die Deckschicht kontrolliert [Brinkmeyer 2008]. Die aufsteigenden Luftblasen bewirken neben der Schwerkraftwirkung auf der Membran eine leichte Bewegung der Membranen, welche zur Reinigung der Membranen beiträgt und die Verblockungsneigung reduziert. Da diese Maßnahme nicht ausreicht eine Deckschichtbildung zu vermeiden, werden verschiedene Betriebsweisen angewendet, um der Deckschichtbildung zusätzlich entgegen zu wirken. Die gängigsten Betriebsweisen sind das Rückspülen der Membran in kurzen Intervallen und das Abstellen (Relaxation) des permeatseitigen Unterdrucks. Auf diese Weise können mit getauchten Membranen Wässer mit hohem Feststoffgehalt aufbereitet werden, was deren Einsatz in MBR zur Feststoffabtrennung ermöglicht. Die Konzentratabscheidung findet beim Einsatz im MBR über den Überschussschlammabzug statt.

Nachteil der getauchten Membranen ist der geringe Permeatfluss, welcher im Bereich von 10 - 30 L/m²h liegt. Der niedrige Permeatfluss hat zwei physikalische Ursachen; zum einen ist

die transmembrane Triebkraft aufgrund des eingeschränkten permeatseitigen Unterdrucks gering, zum anderen reicht die Scherkraftwirkung der aufsteigenden Luftblasen nicht aus bei höheren Permeatflüssen die Deckschichtbildung auf der Membranoberfläche zu kontrollieren. Daher muss der vergleichsweise niedrige Permeatfluss in der Praxis durch eine größere Membranfläche kompensiert werden.

2.4.5. Stofftransport in Membranen

Für die Modellierung des Stofftransports in Membranen werden zwei Membrantypen idealisiert. Die bei der MF und UF eingesetzten Porenmembranen lassen sich durch das Porenmodell beschreiben [Stauder 1992]. Bei der NF und der UO geht man von reinen Lösungsdiffusionsmembranen aus, die durch hydrodynamische Modelle, wie z. B. dem erweiterten Diffusionsmodell, beschrieben werden können [Mason und Lonsdale 1993, Merten 1966]. Während Porenmembranen nach dem Siebeffekt funktionieren und Lösungsmittel sowie niedermolekulare Stoffe durchlassen, andere hochmolekulare Stoffe auf Grund sterischer Effekt jedoch zurückhalten, tritt in Lösungsdiffusionsmembranen ein rein diffusiver Stofftransport, hervorgerufen durch eine elektrochemische Potentialdifferenz auf beiden Membranseiten, auf.

Da im Rahmen dieser Arbeit überwiegend MF- und UF-Membranen verwendet werden, soll im Folgenden lediglich auf das Porenmodell eingegangen werden, welches die Berechnung des Permeatflusses durch eine Membran ermöglicht. Für die Bestimmung des Permeatflusses durch eine Membran mittels des Porenmodells sind folgende Annahmen zu treffen [Rautenbach 1997].

- Strömung durch poröse Membranen = Strömung durch ein Haufwerk
- Reduzierung der Membran auf ein System parallel geschalteter Kapillaren

Das Porenmodell legt zur Beschreibung des Permeatflusses die aus der Filtrationstheorie bekannte Carman-Kozeny-Beziehung zu Grunde [Carman 1938]:

$$J = \frac{\Delta p_{TMP}}{\eta R_m} \quad (20)$$

mit:

η : dynamische Viskosität [kg/m s]

R_m : hydraulischer Widerstand der Membran [1/m]

Zur Berechnung des Membranwiderstands R_m wird mit Hilfe des Gesetzes von Hagen-Poiseuille die Strömung in den Kapillaren der Membran beschrieben [Rautenbach 1997]:

$$J_{kap} = \frac{d_h^2}{32\eta} \frac{\Delta p_{TMP}}{L} \quad (21)$$

mit:

$$L = t_o * h$$

J_{kap} : Volumenstrom durch eine einzelne Kapillare [m^3/s]

d_h : hydraulischer Durchmesser (Kapillardurchmesser) [m]

t_o : Faktor zur Berücksichtigung der Tortuosität der Poren (engl.: tortosity: Windung)

h : Membrandicke [m]

Nach Rautenbach (1997) ergibt sich für den Widerstand R_m :

$$R_m = \frac{\eta(1-\varepsilon)^2 S_v^2 2\tau_F h}{\varepsilon^3} \quad (22)$$

mit:

ε : Porosität der Membran

S_v : volumenspezifische Oberfläche [1/m]

τ_F : Umwegfaktor (engl.: tortosity, Windung)

Der Rückhalt ungelöster Partikel wird bei der MF durch die Porengrößenverteilung und bei der UF durch die Fraktionsabscheidungskurve oder Trennkurve beschrieben. Als Richtwert für die Trenngrenze wird der nominelle Kapillarendurchmesser d_{kap} verwendet [Rautenbach 1997].

2.4.6. Begrenzende Faktoren bei der Filtration

Die meisten UF- und MF-Verfahren in der Wasseraufbereitung sind deckschichtorientiert. Schon nach kurzen Filtrationszeiten wird der Einfluss der Membran auf den Filtratfluss durch die angelagerten Deckschichten überlagert. Es kommt zur Absenkung des Permeatflusses, dessen Ausmaß vom verwendeten Membranmodul sowie den Betriebs- und Zulaufparametern bestimmt wird. Die Deckschicht ist dabei über die Betriebszeit stetigen Veränderungen unterworfen.

Besonders bei Anwendungen der MF ist die Deckschichtbildung häufig erwünscht, da die Gefahr der innern Verblockung der Membran durch sehr kleine Partikel verringert wird. Kleine Partikel, die in etwa gleich groß wie Poren einer MF-Membran sind, können sich leicht in diesen verfangen und zum raschen Abfall der Permeatleistung durch Verblockung führen. Mit Entfernung der Deckschicht, z. B. durch Rückspülung, wird somit die ursprüngliche Funktionsfähigkeit der Membran zumindest teilweise wieder hergestellt.

Durch Adsorption der kleinen Partikel in der Deckschicht können auch Teilchen zurückgehalten werden, deren Durchmesser kleiner als der Porendurchmesser ist. Beim

Einsatz der MF in MBR wird so z. B. ein Großteil der Viren zurückgehalten, obwohl deren Durchmesser ein Vielfaches kleiner ist, als der von Bakterien [Iversen et al. 2007]. Eine Deckschichtbildung führt somit stets zu einer Verschiebung des effektiven Trennschritts in Richtung kleinerer Partikeldurchmesser [Staude 1992].

Deckschichtbildung und Verblockung von Membranen kann unterschiedliche Ursachen haben. Im Folgenden wird auf verschiedene Ursachen der Deckschichtbildung und Verblockung (Fouling, Konzentrationspolarisierung) eingegangen und das Widerstandsmodell und der kritische Fluss zu dessen Charakterisierung vorgestellt.

2.4.6.1. Fouling

Allgemein wird eine leistungsmindernde Verschmutzung von Oberflächen in technischen Anlagen als „Fouling“ bezeichnet [Melin und Rautenbach 2007]. Bei Membranen äußert sich dies in der Entstehung einer Deckschicht, die eine Abnahme des Filtratflusses zur Folge hat. Ursachen sämtlicher Arten von Fouling sind physikalisch-chemische Wechselwirkungen zwischen den zurückgehaltenen Stoffen und der Membran, welche für Haftung der Partikel untereinander bzw. an der Membran sorgen.

Es wird zwischen reversiblen und irreversiblen Fouling unterschieden, je nachdem ob sich das Fouling mit physikalischen und/oder chemischen in-situ-Reinigungsverfahren von der Membran entfernen lässt oder dauerhaft auf der Membran haftet. Des Weiteren kann zwischen Fouling innerhalb oder außerhalb der Membran unterschieden werden, welches als sterische Verblockung, Porenverengung durch Adsorption innerhalb der Porenstruktur und Biofouling auftreten kann.

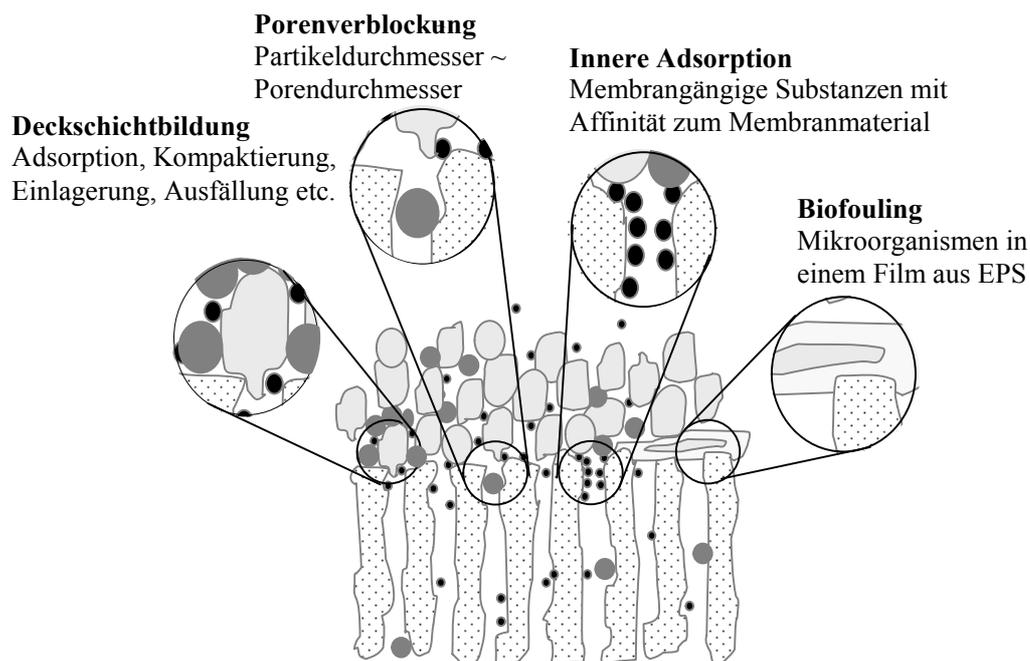


Abbildung 14: Unterschiedliche Foulingmechanismen [modifiziert nach Melin und Rautenbach 2007].

In Abbildung 14 sind verschiedene Foulingmechanismen dargestellt.

Deckschicht-Kuchenbildung

Bei Ablagerung von Partikeln und Molekülen auf der Membranoberfläche, die größer als die Poren der Membran sind, kommt es zur Ausbildung einer oberflächlichen Deckschicht, die auch als Filterkuchen bezeichnet wird. Der Filterkuchen weist eine zusätzliche Filtrationswirkung auf und ist besonders bei MF-Verfahren erwünscht, um kleine Partikel zurückzuhalten, welche zu Porenverblockung führen können.

Porenverblockung

Eine Porenverblockung kommt durch sterische Effekte von Partikeln im Größenbereich der Membranporen zustande. Die Partikel lagern sich in den Membranporen ab und verhindern den Permeatfluss durch die Membran.

Adsorption

Durch Adsorption von Kolloiden und Makromolekülen auf der Membranoberfläche und in den Poren wird der effektive Durchmesser der Poren verringert und die Oberflächeneigenschaften der Membran verändert. Der Durchmesser der anhaftenden Stoffe ist hierbei wesentlich kleiner als der Porendurchmesser. Die Verengung der Membranporen führt zu höheren Filtrationswiderständen und einem raschen Permeabilitätsabfall besonders zu Beginn des Filtrationsprozesses [Hanemaaijer et al. 1989, Jonsson et al. 1996]. Aufgrund starker Wechselwirkungen zwischen den Partikeln und der Membran lässt sich die Schicht im Laufe des Filtrationsprozesses nicht mehr von der Überströmung kontrollieren. Zusätzlich tragen Adsorptionsprozesse zur Einlagerung kleiner Partikel in die Deckschicht bei, welche zunehmend kompakter und undurchlässiger wird.

Biofouling

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Prozessen wird Biofouling durch lebende, sich auf der Oberfläche vermehrende, Mikroorganismen gebildet. Auf der Membran betten sich die Mikroorganismen in eine Matrix aus ausgeschiedenen EPS ein, welche für die Haftung der Mikroorganismen an der Membranfläche sowie für die chemische und physikalische Stabilität des Biofilms sorgen. Durch Rückspülen und der Anwendung von Desinfektionsmitteln lässt sich dem Biofilmwachstum auf der Membran entgegenwirken.

Der Einfluss der einzelnen Foulingmechanismen auf den Leistungsverlust lässt sich nur schwer abschätzen und zeigt deutliche Unterschiede zwischen verschiedenen Studien. Während Lee et al. (2001a) einen Beitrag von bis zu 80 % des Kuchenfoulings analysierten, stellen Huang et al. (2000) einen besonderen Beitrag des Porenfouling bei MF-Membranen von bis zu 50 % zum Gesamtwiderstand in MBR fest.

2.4.6.2. Konzentrationspolarisierung

Durch den Rückhalt eines gelösten Stoffes an der Membranoberfläche steigt dessen Konzentration an der Membranoberfläche an und es kommt zu einem Konzentrationsgefälle zur anströmenden Feed-Lösung. Die auftretende Konzentrationserhöhung an der Membranoberfläche wird als Konzentrationspolarisation bezeichnet. Das Konzentrationsgefälle führt zur Rückdiffusion des gelösten Stoffes in die freie Feed-Lösung, so dass sich ein Gleichgewicht zwischen konvektiven Stofftransport zur Membranoberfläche und dem diffusiven Stofftransport zurück in die freie Lösung einstellt. Ein erhöhter Permeatfluss führt dabei zu einer erhöhten Konzentrationspolarisation.

Der Rückhalt von Ionen bei der UO, der NF und der UF resultiert in der Bildung einer konzentrierten Ionenschicht an der Membranoberfläche. Eine starke Erhöhung der Ionenkonzentration kann zum Überschreiten der Sättigungskonzentration verschiedener Ionen und somit zu deren Ausfällung auf der Membran führen [Staude 1992]. Dieser Vorgang wird als Scaling bezeichnet.

Substanzen mit hohen Molmassen haben im Vergleich zu niedermolekularen Substanzen einen niedrigeren Diffusionskoeffizienten. Somit ist die Konzentrationspolarisation stärker ausgeprägt, wenn die Substanz von der Membran zurückgehalten wird. Dieser Effekt kann z. B. bei der Anwesenheit von SMP in MBR beobachtet werden, wenn bereits eine porenverengende Deckschicht besteht und die Makromoleküle auf der Membranoberfläche zurückgehalten werden. Der Diffusionskoeffizient lässt sich mit Hilfe der Stoke-Einstein-Beziehung berechnen:

$$D_s = \frac{k_B T}{3\pi \eta d_s} \quad (23)$$

mit:

D_s : Diffusionskoeffizient [m^2/s]

k_B : Boltzmann-Konstante [$1,38 \cdot 10^{-23}$ J/K]

d_s : Teilchendurchmesser [m]

2.4.6.3. Widerstandsmodell

Das Widerstandsmodell beschreibt den konvektiven Permeatfluss durch eine gefoulte Membran und basiert auf dem Darcy'schen Gesetz. Dabei wird jedem Foulingmechanismus ein hydraulischer Widerstand zugeordnet und dieser zum Membranwiderstand (R_m) addiert [Bacchin et al. 2006].

Der in Gleichung (22) eingeführte Widerstand der Membran R_m wird somit um den Widerstand, der durch reversibles Fouling (R_{rev}) und durch irreversible Verblockung der Membranporen (R_{irrev}) verursacht wird, erweitert. Dies resultiert in folgender Gleichung:

$$J = \frac{\Delta p_{TMP}}{\eta(R_m + R_{rev} + R_{irrev})} \quad (24)$$

Reversibles Fouling R_{rev} wird vor allem durch Deckschichtbildung (Kuchenfouling) und durch reversible Verblockung der Poren verursacht, welches durch physikalische Reinigungsverfahren entfernbar ist. Reversible Verblockung der Poren entsteht durch Adsorption an den Porenwänden oder an der Oberfläche der Membran. Dieser Prozess ist meist unabhängig von dem verwendeten TMP und den Permeatflüssen. Adsorptionsprozesse können durch erhöhten Druck und die damit verbundene Erhöhung des Permeatflusses beschleunigt werden.

Irreversibles Fouling R_{irrev} wird durch Ablagerungen auf der Membran, die aufgrund starker Wechselwirkungen nicht durch physikalische Reinigungsverfahren entfernbar sind, verursacht. Für die Entfernung und Charakterisierung der irreversiblen Ablagerungen wurde in der Arbeit eine chemische Reinigungsmethode eingesetzt.

2.4.6.4. Kritischer Fluss

Das Konzept des kritischen Flusses J_c hat sich als ein gutes Verfahren etabliert, um Fouling zu charakterisieren. Das Auftreten von Membranfouling ist dabei direkt mit dem angelegten Fluss verbunden. Dabei steht J_c für den Fluss, der angelegt werden muss, um Fouling zu verursachen [Field et al. 1995]. Der kritische Fluss J_c lässt sich unter Verwendung des Widerstandsmodells charakterisieren. Dabei ist der Fluss J unterhalb des kritischen Flusses J_c nur vom Membranwiderstand abhängig:

$$\text{wenn } J < J_c, \text{ dann } J = \frac{\Delta p_{TMP}}{\eta R_m} \quad (25)$$

Beim Überschreiten des kritischen Flusses nimmt die Permeabilität deutlich ab. Der Fluss ist nun sowohl vom Membranwiderstand als auch von den auftretenden Foulingwiderständen abhängig. In MBR-Systemen konnte gezeigt werden, dass Fouling auch unterhalb des kritischen Flusses auftreten kann, da die Permeabilität im MBR immer kleiner als bei reinen Wasserfahrten war [Fane et al. 1999, Cho et al. 1999]. Daher kann der Begriff kritischer Fluss in MBR-Systemen nur eingeschränkt verwendet werden. Dennoch tritt bei niedrigeren Flüssen erheblich geringeres Fouling auf, welches bei Überschreitung des kritischen Flusses

deutlich erhöht wird. Graphisch kann dieses Phänomen anhand der Permeabilitätskurve beschrieben werden. Bei Flüssen unterhalb des kritischen Flusses liegt eine lineare Beziehung zwischen Permeabilität und Fluss vor. Beim Überschreiten des kritischen Flusses geht die Gerade in ein Plateau über. Der Übergang zwischen TMP-abhängigem und TMP-unabhängigem Fluss wird dabei als kritischer Fluss bezeichnet [Bouhabila et al. 1998].

2.5. Membranbioreaktoren (MBR)

Obwohl MBR schon in den 1970er Jahren entwickelt wurden, hat die Technologie erst im letzten Jahrzehnt an Bedeutung in der Abwasserreinigung als Alternative zu herkömmlichen Wasseraufbereitungsverfahren erlangt. Im Jahr 2005 hatten MBR bereits einen Marktwert von US \$ 217 Millionen mit einem durchschnittlichen Anstieg von 10 % pro Jahr. Dies stellt ein schnelleres Wachstum als bei jeder anderen „Advanced Water Technology“ und als bei anderen Einsatzgebieten der Membrantechnologie dar [Judd 2008].

2.5.1. Aufbau und Anwendung von MBR

MBR stellen eine Verfahrenskombination aus biologischer Abwasserreinigung und einem Membranverfahren dar. Sie können unter aeroben und anaeroben Bedingungen betrieben werden. Dabei werden aerobe MBR üblicherweise zur Behandlung von kommunalem Abwasser und anaerobe Systeme zur Behandlung von industriellem Abwasser mit höherer organischer Fracht verwendet.

Nach Abbildung 15 unterscheidet sich der Aufbau eines MBR von dem einer konventionellen Kläranlage vor allem durch die Abtrennung der Biomasse. Während die Biomasse beim herkömmlichen Verfahren (A) über ein Sedimentationsbecken entfernt wird, findet dies im MBR über Membranen statt, welche im Cross-Flow-Modus (Querstromverfahren (B)) oder getaucht (Submersverfahren (C)) betrieben werden.

Besonders in den Anfängen der MBR-Technologie wurde die Membranfiltration im Anschluss an das Belebungsbecken in Querstrom-Prozessen durchgeführt. Dabei wird der Belebtschlamm mit hohem feedseitigen Druck im Cross-Flow-Modus über die Membran geführt, was zu hohen spezifischen Permeatflüssen, begleitet von einem hohen Energiebedarf, führt. Die Weiterentwicklung des MBR-Verfahrens zum Submersverfahren führte zu exponentiellem Wachstum der Technologie in den 1990iger Jahren [Judd 2008, Pinnekamp et al. 2007]. Beim Submersverfahren sind die Membranmodule (Hohlfaser- oder Plattenmodule) direkt in das Belebungsbecken getaucht oder alternativ in einem Filtrationsbecken integriert. Die notwendige Druckdifferenz wird durch eine permeatseitig angebrachte Pumpe oder durch den hydrostatischen Druck der Wassersäule im Belebungsbecken erzeugt. Das gereinigte Wasser wird mittels sehr geringer transmembraner Druckdifferenzen abgezogen (siehe

Kapitel 2.4.4). In Tabelle 4 sind charakteristische Prozessparameter für MBR mit getauchten und externen Membranmodulen aufgelistet.

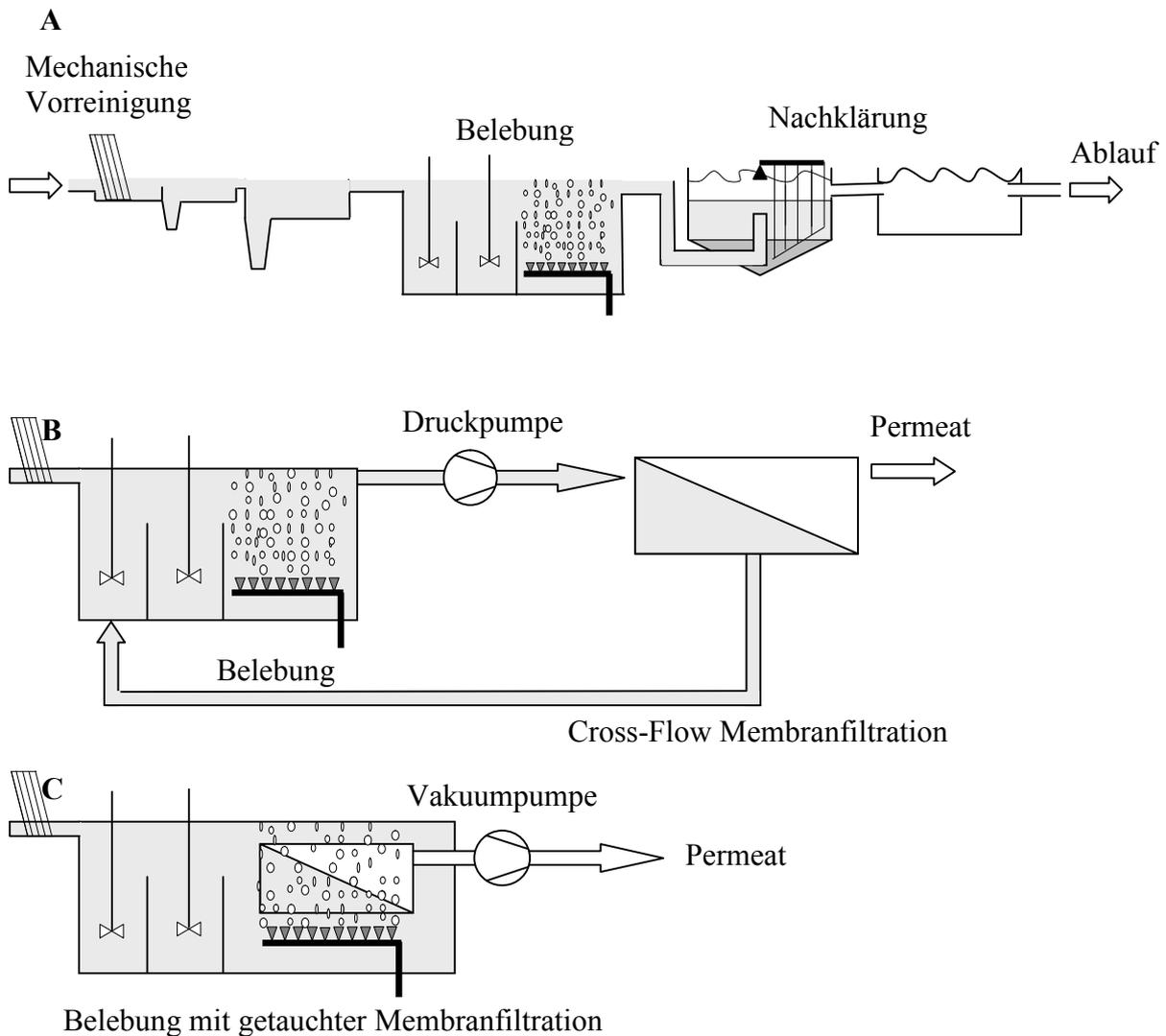


Abbildung 15: Vergleich konventioneller (A) und MBR-Verfahren ((B) MBR Querstromverfahren, (C) MBR Submersverfahren) zur Wasseraufbereitung [modifiziert nach Melin und Rautenbauch 2007].

Tabelle 4: Prozessparameter für MBR mit getauchten und externen Membranmodulen [nach Stephenson et al. 2000, Rosenberger 2003].

Prozessparameter	Externe Membranmodule	Getauchte Membranmodule
TMP	0,5 - 5 bar	0,1 - 0,5 bar
Überströmgeschwindigkeit	2 - 5 m/s	Gering (Gasliftprinzip)
Permeatfluss	40 - 120 L/(m ² h)	10 - 60 L/(m ² h)
Energieaufwand	2 - 10 kWh/m ³	0,2 - 0,8 kWh/m ³
Membranfläche	niedrig	Hoch

Da die Membrananlage erhöhte Anforderungen an die Abwasserqualität stellt, werden zur mechanischen Vorbehandlung feinere Rechen und Siebe als bei herkömmlichen Verfahren eingesetzt. Besonders Haare aus kommunalem Abwasser können sonst in Form von „Verzopfungen“ zu erheblichen Problemen beim Membranprozess führen. Typische nominale Porengrößen der Membranen liegen im Bereich der MF und UF zwischen 0,40 und 0,02 μm . Dies gewährleistet eine Abtrennung von Bakterien und Feststoffpartikeln sowie von Viren, welche überwiegend an Biomasse adsorbiert vorliegen [Iversen et al. 2007].

Die eigentliche Abwasserreinigung im MBR erfolgt wie bei konventionellen Kläranlagen durch Stoffwechsel- und Umsetzungsprozesse in der biologischen Reinigungsstufe. Die verfahrenstechnischen Anforderungen an die Betriebsweise des Belebungsverfahrens sind weitgehend die gleichen wie beim konventionellen Verfahren. Wichtige Voraussetzung ist eine ausreichende Durchmischung und die Versorgung der Mikroorganismen mit Sauerstoff bei aerober Prozessführung. Bei einer vollständigen Stickstoffelimination wird ein Teil des Reaktors anoxisch betrieben. Die biologische Reinigung erfolgt dann in zwei Behandlungsbecken. Zunächst werden Stickstoffverbindungen unter Luftzufuhr im Nitrifikationsbecken zu Nitrat umgewandelt. Anschließend gelangt das Abwasser über eine Rezirkulation in das Denitrifikationsbecken, wo das Nitrat unter anoxischen Bedingungen zu Nitrit und zuletzt in gasförmigen Stickstoff umgewandelt wird. In einigen MBR, wie z. B. dem MBR Waldmössingen, ist das Denitrifikationsbecken dem Nitrifikationsbecken (Belebungsbecken) vorgeschaltet.

2.5.2. Vor- und Nachteile von MBR

Gegenüber herkömmlichen Verfahren zur Abwasserbehandlung weisen MBR einige Vorteile auf:

Generell ist in MBR mehr Prozesskontrolle als in konventionellen Kläranlagen möglich. Die Membranfiltration erlaubt es, die hydraulische Verweilzeit (HRT, engl.: hydraulic retention time) von der Feststoffverweilzeit (SRT, engl.: solid retention time) zu entkoppeln und auf diesem Weg den Trockenmasse (TM)-Gehalt und die SRT gegenüber herkömmlichen Prozessen zu erhöhen [Smiths et al. 2003].

Der TM-Gehalt des Belebungsbeckens in konventionellen Verfahren wird durch die Leistung der Sedimentation im Nachklärbecken limitiert. Biomasse-Konzentrationen, die über 5 - 6 g/L hinausgehen, führen zu Ausschwemmungen des Klärschlammes in den Vorfluter. Durch den vollständigen Biomasserückhalt durch die Membranen ist es möglich hohe TM-Gehalt von bis zu 20 g/L [Rosenberger et al. 2001] und somit verbesserte Abbauraten der Schadstofffracht zu erzielen. Übliche TM-Konzentrationen liegen bei 8 - 12 g/L und sind 2 - 4-mal höher als in konventionellen Anlagen [Kubin 2004]. Eine hohe Konzentration an Biomasse führt zu einer Verminderung des Food/Microorganism-Verhältnis. Damit kann die HRT verringert und höhere Durchsätze erzielt werden [Yoon et al. 2004]. Bei gleichem

Durchsatz werden wesentlich geringere Volumina des Belebungsbeckens benötigt, so dass die Kläranlage einen geringen Platzbedarf hat. Durch Erhöhung des Schlammalters (> 10 Tage) kommt es zusätzlich zur Ausbildung spezieller Abbauwege, so dass auch Mikroverunreinigungen (Pharmazeutika) effektiv entfernt werden [Clara et al. 2005]. Des Weiteren tritt bei hohem Schlammalter eine verminderte Schlammüberschussbildung auf [Yoon et al. 2004], was sich positiv auf die Kosten der Schlamm Entsorgung auswirkt. Neben der guten Nährstoffelimination und einer resistent gegen größere Schwankungen in der Zulaufkonzentration zeichnet sich der MBR durch sehr gute Ablaufqualität des Filtrats aus. Um eine vergleichbare Wasserqualität zu erreichen, ist bei herkömmlichen Verfahren eine weitergehende Behandlung in Form eines tertiären Desinfektionsprozesses (wie z. B. Chlorung, Ozonierung) erforderlich.

Den Vorteilen steht eine Reihe von Nachteilen gegenüber:

Der größte Nachteil der MBR besteht derzeit in der geringen Wirtschaftlichkeit des Prozesses. Die Energiekosten verursachen den größten Teil der Kosten von etwa einem Drittel der Betriebskosten bei modernen Abwasserbehandlungsanlagen. Der Stromverbrauch geht fast ausschließlich zu Lasten der feinblasigen Belüftung zur biologischen Abwasserreinigung [Bohn 1993, Agis 2001]. Der Betrieb einer MBR-Anlage verursacht einen zusätzlichen Energieverbrauch für die Membranstufe (Filtratpumpe und Gebläse) und somit einen höheren Energieverbrauch. Zusätzlich treten bei MBR höhere Investitionskosten durch die Membranstufe auf. Im laufenden Prozess stellt besonders Membranfouling ein großes Problem dar und beeinflusst die Leistung des MBR erheblich [Meng et al. 2005]. Auf Fouling in MBR wird im folgenden Kapitel näher eingegangen.

2.5.3. Fouling in MBR

In MBR treten die beschriebenen Formen des Foulings in unterschiedlicher Ausprägung auf. In der überwiegenden Zahl der Studien zur Charakterisierung von Fouling in MBR wurde der Aufbau und die Entstehung von Kuchenfouling untersucht [Meng et al. 2007, Lee et al. 2001a, Chu und Li 2005]. Besonders die Biomasse-Konzentration im MBR wurde in Verbindung mit dem auftretenden Fouling gebracht. Mit zunehmender Biomasse im MBR wurde eine Zunahme des Foulings angenommen. Dabei wurde die Foulingschicht überwiegend als eine Einheit betrachtet und wenige Differenzierungen zwischen Bereichen in der Foulingschicht sowie zwischen Poren- und Oberflächenfouling vollzogen. Cho et al. (2005) erstellten funktionelle Abhängigkeiten zwischen dem spezifischen Widerstand, der Biomasse-Konzentration und dem TMP. Lee et al. (2001a) stellte einen Beitrag des Kuchenfoulings von 80 % zum Gesamt-Fouling fest, während irreversibles Fouling nur einen Beitrag von 8 % aufwies.

Im Gegensatz dazu wurde in anderen Studien eine differenziertere Betrachtung des Foulings vorgenommen und ein besonders großer Beitrag von EPS zum Fouling erkannt [Cho und

Fane 2002, Rosenberger und Kraume 2002]. Chen et al. (2006) konnten durch Anfärben spezifischer EPS-Komponenten die Ausbildung verschiedener Bereiche mit unterschiedlichen EPS-Konzentrationen in der Foulingschicht und somit die Heterogenität der Foulingschicht sichtbar machen.

Besonders der gelöste Teil der EPS, die SMP, stehen in Verdacht einen großen Anteil am Fouling zu haben. SMP gelangen durch konvektiven Transport an die Membranoberfläche und haften an dieser aufgrund adsorptiver Eigenschaften an. Dies resultiert in der Verblockung der Poren und in der Ausbildung eines gelartigen Belags, der zu einer Zunahme des hydraulischen Widerstands führt [Rosenberger et al. 2005]. Durch die anhaftenden EPS und SMP erhöht sich die Klebrigkeit der Membran und somit die Neigung zur Anhaftung weiterer Biomassekomponenten [Chu und Li 2005]. Die an die Membran anhaftenden Biomasseflocken werden durch eEPS stärker zusammen gebunden, was den hydraulischen Widerstand der Kuchenfoulingschicht zusätzlich erhöht. Im Widerspruch zu der Studie von Lee et al. (2001a) stellten Huang et al. (2000) einen Beitrag der SMP von bis zu 50 % zum Foulingwiderstand fest.

Anhand der verschiedenen Studien kann davon ausgegangen werden, dass sowohl eEPS und SMP als auch das Kuchenfouling in unterschiedlicher Ausprägung zum Fouling beitragen und für den Aufbau einer Barriere auf der Membran verantwortlich sind. Aufgrund der Heterogenität verschiedener EPS und der unterschiedlichen Konzentrationen in MBR ist der Mechanismus des EPS-Fouling noch nicht geklärt.

Um der verminderten Leistung entgegenzuwirken ist eine periodische chemische Reinigung der Membranen und ein zeitweise anfallender Membranersatz notwendig, was hohe Kosten verursacht und Optimierungsbedarf erfordert [Melin und Rautenbach 2007]. In aktuellen Studien wurden daher Betriebsweisen mit unterschiedlich ausgeprägten Reinigungszyklen getestet, die dem Fouling entgegen wirken und den Prozess wirtschaftlicher machen [Wu et al. 2008a, Wu et al. 2008b].

3. Experimentelle Vorgehensweise

3.1. Modell-Biofilme und EPS

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Untersuchungen an Modell-Biofilmen von *Pseudomonas putida* und *Aureobasidium pullulans* vollzogen. Des Weiteren wurden verschiedene Polysaccharide und Proteine als Modell-EPS eingesetzt und charakteristische Merkmale zur weiteren Charakterisierung von heterogeneren EPS aus MBR herausgearbeitet.

3.1.1. Anzucht von Modell-Biofilmen

3.1.1.1. *Pseudomonas putida*

Die Stammhaltung von *Pseudomonas putida* (DSMZ-Nr. 12735) erfolgte bei 4°C auf M1-Agar (DSMZ-Nr. 457). Ausgangskultur der Biofilme-Anzucht war eine *P. putida* Übernachtskultur (30°C) in M1-Medium (DSMZ-Nr. 457, $\rho(\text{Glukose}) = 2 \text{ g/L}$). Die Bakterien wurden durch Zentrifugation vom Medium getrennt (2000 g, 5 min) und eine Bakterien-Suspension (ca. 6×10^8 Zellen/mL) in 10 mL steriler 0,14 M NaCl-Lösung hergestellt. Jeweils 0,1 mL der Suspensionen wurden mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig auf der Oberfläche einer *Pseudomonas* Isolierungs Nähragarplatte (BD Diagnostics, USA) mit 2 % (v/v) Glycerin verteilt. Bei 30°C entwickelte sich innerhalb von 24 h ein konfluenter Bakterienbewuchs auf der Agarplatte, der mit einem Metallspatel abgeschabt werden konnte.

3.1.1.2. *Aureobasidium pullulans*

Der Biofilm von *Aureobasidium pullulans* (DSMZ-Nr. 2404) wurde mit zwei verschiedenen Verfahren angezüchtet. Die Stammhaltung erfolgte bei 4°C auf Kartoffel-Agar (DSMZ-Nr. 129).

Erlenmeyerkolben

Zur Kultivierung wurden 5 mL Hefe-Pepton-Glukose-Medium (DSMZ-Nr. 852, $\rho(\text{Glukose}) = 25 \text{ g/L}$) in einem 250 mL Erlenmeyerkolben mit einer *A. pullulans* Kultur angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bei 25°C für 48 h auf einem Schütteltisch bei 30 rpm. Anschließend wurde für 48 h bei 25°C ohne Schütteln inkubiert, so dass sich ein geschlossener Biofilm ausbilden konnte, der sich durch Neigen des Erlenmeyerkolben entnehmen ließ.

Festbettreaktor

Ausgehend von der Stammplatte wurden 50 mL Hefe-Pepton-Glukose (HPG)-Medium in einem 250 mL Erlenmeyerkolben beimpft und für 48 h bei 24°C und 200 rpm kultiviert. Der Festbettreaktor bestand aus einer Polycarbonat-Röhre (Innendurchmesser: 22 mm, Länge: 500 mm, Volumen: 190 mL) gepackt mit 3 mm Glaskugeln (Dichte: 2.1 g/cm^3) und einem 50 mm ungepackten, freien Kopfraum. Die *A. pullulans* Suspension wurde unter sterilen

Bedingungen von unten in den Reaktor überführt. Der Reaktor wurde von unten nach oben mit einer Durchflussgeschwindigkeit von 40 mL/h mit einer Zahnradschlepppumpe (Ecoline VC-MS/CA, Ismatec SA, Schweiz) mit HPG-Medium durchströmt. Das Medium wurde in einem 5 L Vorlagebehälter mit purem Sauerstoff gesättigt. Nach 48 h wurde der Reaktor im Kreislauf betrieben und die Durchflussgeschwindigkeit auf 880 mL/h erhöht. Nach weiteren 24 h konnte eine homogene Biofilm-Verteilung im Reaktor festgestellt werden. Durch Öffnen des Festbettreaktors konnte der Biofilm zusammen mit den Glaskugeln, welche manuell entfernt wurden, entnommen werden.

3.1.2. Verwendete Modell-EPS

Als Modell-EPS zur Bestimmung der ^{13}C CPMAS NMR-spektroskopischen chemischen Verschiebungsbereiche wurden die Kohlenhydrate Dextran, Pullulan und Alginat sowie das Protein Rinderserumalbumin (BSA, engl.: bovine serum albumin) verwendet. Zusätzlich wurde DNA aus Fisch-Sperma untersucht. Die Substanzen lagen in Reinform vor (> 99%).

3.2. Extraktion von EPS

Die Reinkultur-Biofilme von *P. putida* wurden mittels eines Metallspatels von den Agarplatten abgeschabt. Die Reinkultur-Biofilme von *A. pullulans* konnten durch leichtes Schütteln aus dem Erlenmeyerkolben entfernt werden. Zu Extraktionszwecken wurden die Biofilme zunächst in 0,14 M NaCl (bei der Kationenaustauscher-Methode in Phosphat-Puffer) für 30 min bei 400 rpm bei 4°C suspendiert. Dabei wurden 15 mL NaCl pro g Biofilm *P. putida* und 5 mL/g Biofilm *A. pullulans* verwendet, um eine Konzentration von ca. 10 g/L Biomasse (TM) zu erhalten.

Zur Extraktion von EPS aus Belebtschlammproben aus MBR wurde die Biomasse zunächst bei 6000 g für 15 min bei 4°C abzentrifugiert. Anschließend wurde das Biomasse-Pellet in 0,14 M NaCl resuspendiert und wie bei den Reinkultur-Biofilmen eine Konzentration von etwa 10 g/L Biomasse (TM) eingestellt. Der Überstand wurde zur Aufbereitung von SMP verwendet (Kapitel 3.3.1).

Extraktion mittels Ultrazentrifugation

Die homogenisierten Biofilmproben wurden für 10 min bei 10°C in 50 mL-Behältern zentrifugiert. Der EPS-reiche Überstand wurde kollektiert. Während die *P. putida*-Lösung bei 6000 g zentrifugiert wurde, wurde die *A. pullulans*-Lösung aufgrund des schlechteren Sedimentationsverhaltens der Pilz-Zellen bei 12000 g zentrifugiert. Die erhaltenen Zellpellets wurden in 0,14 M NaCl-Lösung bei 4°C mit einem Magnetrührer bei ca. 400 rpm für 30 min resuspendiert, so dass das Anfangsvolumen erreicht wurde. Den eigentlichen

Extraktionsschritt stellt bei der Ultrazentrifugationsextraktion ein Zentrifugationsvorgang bei 50000 g von 15 min bei 10°C dar. Die EPS-reichen Überstände wurden erneut kollektiert und mit denen der ersten Zentrifugation vereint.

Extraktion mit Formaldehyd und Natriumhydroxid

Pro 100 mL der homogenisierten Biofilm-Suspension wurden 0,6 mL Formaldehyd-Lösung (37 %) zugefügt. Die Probe wurde für eine weitere Stunde bei 4°C mit 400 rpm gerührt. Pro 100 mL Biofilm-Suspension wurden anschließend 4 mL 1 M NaOH zugefügt, was den eigentlichen Extraktionsschritt darstellt. Die Probe wurde für 3 h bei 4°C mit 400 rpm gerührt [Rode 2004].

Extraktion mit EDTA

Pro 100 mL Biofilm-Suspension wurde 1 g EDTA zugegeben. Anschließend wurde die Probe für 3 h bei 4°C mit 400 rpm gerührt [Brown and Lester 1980].

Extraktion mit Kationenaustauscher (CER-Methode)

Der Kationenaustauscher (CER, engl.: cation exchange resin) (Dowex 50 X 8, Na⁺-Form, stark sauer, Teilchengröße 20-50 Mesh) wurde vor der Verwendung 1 h in Phosphat-Isolierungspuffer (Tabelle 47, Anhang A) gewaschen. Der Isolierungspuffer wurde anschliessend dekantiert und das feuchte Harz zur EPS-Extraktion verwendet. Die Biofilmproben wurden wie oben beschrieben im Isolierungspuffer homogenisiert. Es wurden 40 g Dowex-CER (feuchtes Harz) pro g Biofilm-TM zur Probe hinzugegeben. Die Probe wurde anschließend für 2 h bei 4°C mit 400 rpm gerührt. Der Kationenaustauscher wurde mittels eines Siebs von der EPS-Lösung getrennt [Frølund et al. 1996].

Hitze-Extraktion

Die homogenisierte Biofilmprobe wurde in einem Autoklaven auf 80°C erhitzt und für 10 min bei 80°C gehalten [Goodwin und Forster 1985].

3.2.1. Aufbereitung der EPS-haltigen Lösungen

Nach dem Extraktionsschritt wurden die Biofilm-Suspensionen bei 6000 g für 15 min bei 10°C zentrifugiert. Der EPS-haltige Überstand wurde mit einem 0,45 µm Polyethersulfon (PES)-Membran (Pall, USA) filtriert, um Zellbruchstücke und Agglomerate zu entfernen.

Dialyse von EPS-Proben

Zur Abtrennung anorganischer Salze und niedermolekularer Substanzen wurden die EPS-haltigen Lösungen in Dialyseschläuche gefüllt und gegen demineralisiertes Wasser dialysiert. Für die Dialyse wurden Dialyseschläuche aus regenerierter Cellulose mit einem MWCO von

7000 g/mol und einer Breite von 1,6 cm verwendet (Membra-Cel, Serva Electrophoresis GmbH, Deutschland), welche mit 5 cm breiten Klemmen (Universal Closures, Spectrum Laboratories, USA) verschlossen wurden. Der im trockenen Zustand gelieferte Schlauch wurde in ca. 30 cm lange Stücke geschnitten und zur Vorbehandlung für 30 min in 10 mM EDTA-Lösung bei pH 7,5 gekocht, um Verunreinigungen zu entfernen. Vor der Verwendung wurden die Schläuche gut mit Milli-Q-Wasser gereinigt. Die Dialyse erfolgte in einer 10 L-Plastikwanne bei 10°C. Zum besseren Austausch wurde das Wasser leicht gerührt (ca. 15 rpm). Das Wasser wurde mehrmals gewechselt. Die Dialyse wurde beendet, wenn sich die elektrische Leitfähigkeit des Wassers im Laufe einer Stunde um nicht mehr als 10 $\mu\text{S}/\text{cm}$ änderte (nach mindestens 20 h). Nach der Dialyse wurden die Proben gefriergetrocknet.

Gefriertrocknung

Um die EPS- und SMP-Proben sowie die Biofilmpuben für weitere Analysen in fester Form zu haben, wurden diese unter Verwendung eines Alpha 2-4 (LOC 1m)-Gerätes (Christ, Deutschland) bei einem Druck von 0,2 mbar gefriergetrocknet.

3.3. Aufbereitung von SMP

3.3.1. Abtrennung von SMP

Die Trennung von SMP und Biomasse erfolgte durch Zentrifugation der Belebtschlammproben bei 6000 g für 15 min bei 4°C. Nach der Zentrifugation wurde der SMP-haltige Überstand in ein steriles Gefäß dekantiert und anschließend über einen 5 μm Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Filter (Pall, USA) und sukzessive über einen 0,45 μm PES-Filter (Pall, USA) filtriert, um Biomassebestandteile und Partikel abzutrennen. Die als Sediment vorliegende Biomasse wurde mit einem Metallspatel in Bechergläser überführt und für die Extraktion von eEPS verwendet.

3.3.2. Fraktionierung von SMP mittels mehrstufiger Ultrafiltration

SMP aus dem MBR Waldmössingen (siehe Kapitel 3.4.2) wurde mittels mehrstufiger Ultrafiltration (mst-UF) fraktioniert, wie in Abbildung 16 dargestellt ist. Die Membranfiltrationen erfolgte in 2 L-Rührzellen (Amicon, Millipore, USA) in der Dead-End-Filtrationsweise als Diafiltration. Der nötige Druck von maximal 5 bar wurde mit Stickstoffgas erzeugt. Vor Gebrauch wurden alle Membranen über Nacht in Milli-Q-Wasser eingelegt und vor der Filtration in der Rührzelle für 2 h mit Milli-Q-Wasser gespült, um die Glycerinschutzschicht zu entfernen.

Zur Fraktionierung wurde das Permeat der 0,45 μm Filtration verwendet. Das Permeat wurde nacheinander durch UF-Membranen aus regenerierter Cellulose mit nominellen Trenngrenzen von 100000, 10000, 1000 g/mol (YM 100, YM 10, YM 1, Millipore Corporation, USA)

filtriert. Die Filtrationen wurden jeweils bei einem Konzentratvolumen von 100 mL gestoppt. Das Permeat wurde mit der nächst kleineren Membran weiterfraktioniert.

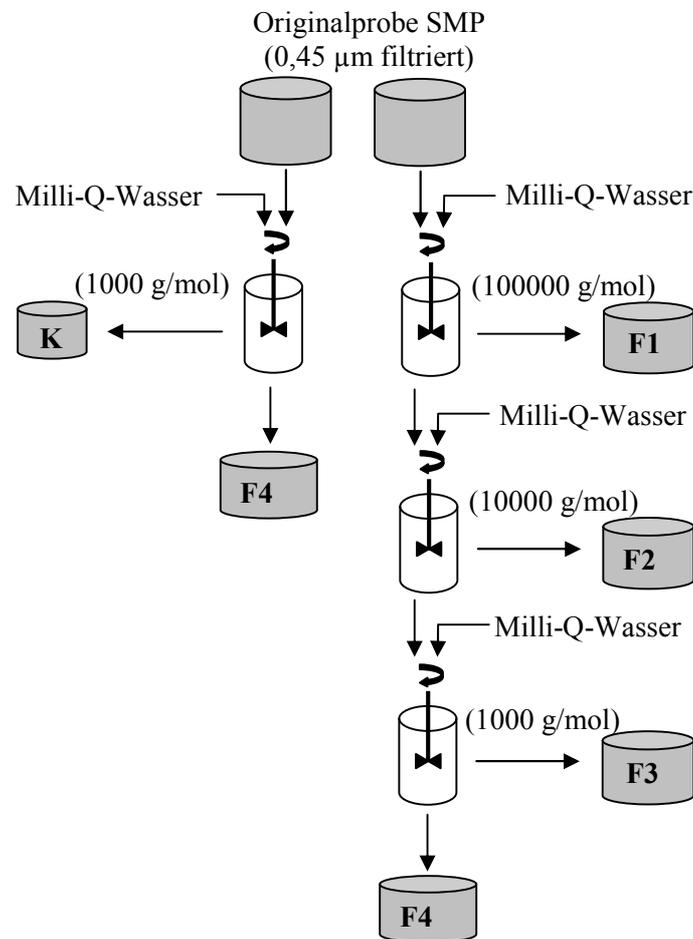


Abbildung 16: Fraktionierungsverfahren der SMP-Probe aus dem MBR WM.

Das Konzentrat wurde mit 1 L Milli-Q-Wasser verdünnt und wiederum bis zu einem Konzentratvolumen von 100 mL filtriert. Dieser Schritt wurde solange wiederholt bis die Leitfähigkeit des Permeats zwischen 25 und 35 $\mu\text{S}/\text{cm}$ lag, um zu gewährleisten, dass der Salzgehalt der Probe ausreichend klein für spätere Untersuchungen war. Zusätzlich wurde ein Teil der 0,45 μm filtrierten SMP-Lösung direkt mit der 1000 g/mol Membran filtriert, um eine Gesamtfraktion zu erhalten.

Durch die Fraktionierung wurden vier Proben mit folgenden nominellen Molmassen erhalten.

SMP F1:	0,45 μm – 100000 g/mol
SMP F2:	100000 g/mol – 10000 g/mol
SMP F3:	10000 g/mol – 1000 g/mol
SMP K:	0,45 μm – 1000 g/mol
(SMP F4:	< 1000 g/mol)

Die Proben wurden gefriergetrocknet und die Feststoffanteile gravimetrisch bestimmt. Das Ausgangsvolumen der SMP-Lösung für die Fraktionierung betrug 50 L und 20 L für die Aufkonzentrierung der Gesamt-SMP-Fraktion.

3.4. Membranbioreaktoren

Im Rahmen dieser Arbeit wurde Biomasse und EPS aus zwei MBR untersucht. Der MBR University of New South Wales (UNSW) stellt ein kleintechnisches System dar, in dem auch die Experimente zum Fouling von Membranen durchgeführt wurden. Die Versuche am kleintechnischen System wurden an der UNSW in Sydney, Australien, durchgeführt. Der MBR Waldmössingen (WM) wird zur Aufbereitung von kommunalem Abwasser verwendet.

3.4.1. Kleintechnischer MBR University of New South Wales (UNSW)

3.4.1.1. Anlagenschema und Inbetriebnahme

Der MBR UNSW mit einem Arbeitsvolumen von 30 L bestand aus einem Belüftungsbecken (a) und einem Membrantank (b), wie in Abbildung 17 dargestellt ist.

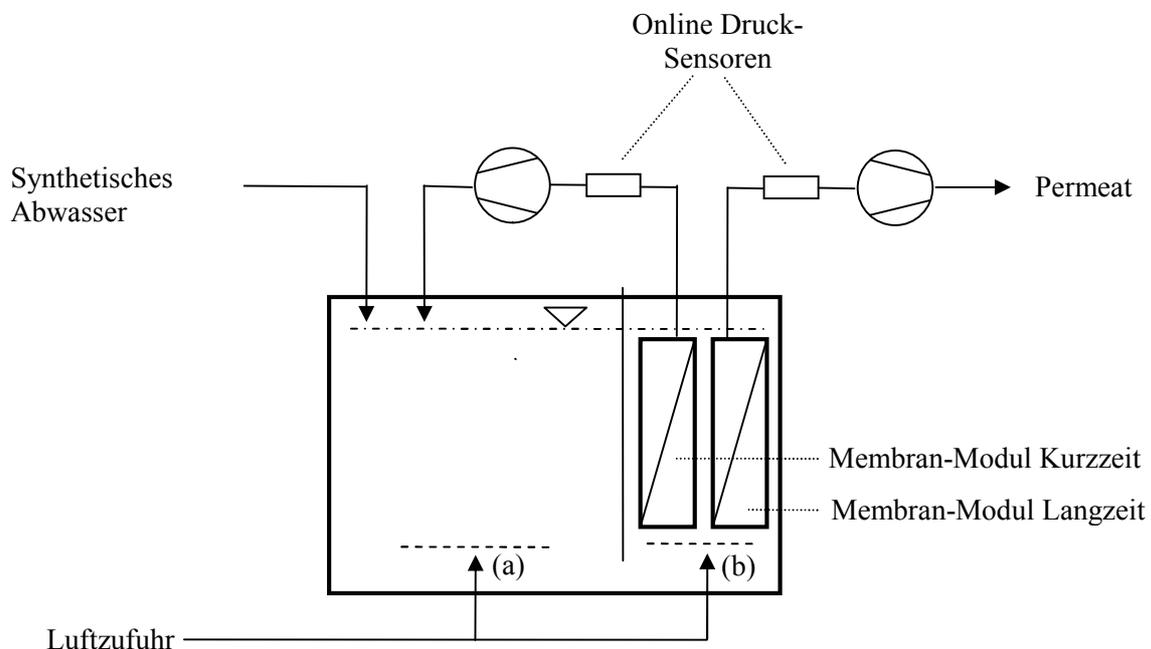


Abbildung 17: Schematische Darstellung des MBR UNSW ((a) Belüftungsbecken, (b) Membrantank).

Der Membrantank war mit vier getauchten Hohlfasermodule mit einer Gesamt-Membranfläche von etwa $0,2 \text{ m}^2$ ausgestattet (siehe Kapitel 3.4.1.2). Die Kenndaten der

Membranmodule sind in Tabelle 6 zusammengefasst. Zwei der getauchten Hohlfasermodule wurden für Kurzzeit- und zwei für Langzeit-Foulinguntersuchungen verwendet. Das Permeat der zwei Hohlfasermodule der Kurzzeit-Foulinguntersuchungen wurde in den MBR zurückgeführt und die HRT mit den Langzeitmodulen eingestellt. Die Belüftung des MBR wurde mittels poröser Membranen am Boden des MBR (A, B) sowie mit Belüftungsdüsen am Fuß der Membranmodule (C) gewährleistet. Die Luft-Volumenströme betragen 16,2 L/min für A und B und 30,0 L/min für C.

Der Reaktor wurde mit Biomasse einer kommunalen Kläranlage (St. Mary, Sydney, Australien) beimpft und mit einer sterilen synthetischen Abwasserlösung (Tabelle 48, Anhang A) betrieben. Bevor die Lösung in den Reaktor überführt wurde, wurde sie mittels eines Verdünnungssystems (Mixed Rite, Israel) 100-fach mit destilliertem Wasser verdünnt. Über einen Zwischentank, dessen Füllstand durch zwei Sensoren gesteuert wurde, um die Verweilzeit auf 3 – 5 h zu beschränken, wurde das verdünnte Abwasser mittels einer Peristaltikpumpe (Masterflex L/S, Cole-Parmer Instrument Company, USA) in den Reaktor geleitet. Über die Zulauf- und eine Permeatpumpe (Masterflex L/S, Cole-Parmer Instrument Company, USA) wurde die HRT auf 15 h eingestellt. Auf der Permeatseite des Systems waren Drucksensoren angebracht über die der TMP im System online gemessen wurde. Die Datenakquirierung wurde mit Labview 5.0 (National Instruments, USA) durchgeführt. Im Rahmen der Kurzzeit-Filtrationsversuche wurden zwischen 1 und 120 Datenpunkte pro min aufgezeichnet.

Der Reaktor wurde für drei Monate betrieben bis sich ein Gleichgewichtszustand im System eingestellt hatte, bevor die Fouling- und EPS-Extraktionsexperimente durchgeführt wurden. In Tabelle 5 sind die operationellen Gleichgewichtskonditionen im MBR dargestellt.

Tabelle 5: Operationelle Konditionen im MBR UNSW während der Extraktions- und Foulingexperimente.

Abwasser- und Biomasse-Kenndaten	
pH	7,3 - 8,2
Temperatur	24 - 26°C
HRT	15 h
SRT	50 d
COD(Synthetisches Abwasser)	534,5 mg/L
COD(Ablauf)	60 - 80 mg/L
COD Entfernung	97 %
ρ (Ammonium Synth. Abwasser)	9,6 mg/L
ρ (Ammonium Ablauf)	0,1 - 0,8 mg/L
Ammonium Entfernung	92 - 99 %
Trübung Ablauf	0,2 - 0,35 NTU
ρ (Biomasse)	5,5 \pm 0,2 g/L
ρ (Biomasse Protein)	3316 \pm 215 mg/L
ρ (Biomasse Kohlenhydrat)	1750 \pm 267 mg/L
ρ (SMP Protein)	3,3 \pm 0,5 mg/g Biomasse
ρ (SMP Kohlenhydrat)	1,2 \pm 0,8 mg/g Biomasse

3.4.1.2. Aufbau der Hohlfasermembranmodule

Für die Foulingexperimente wurden MF-Hohlfasermembranen aus PVDF (Memcor, Australien) verwendet. In Tabelle 6 sind die charakteristischen Kenndaten der Membranen dargestellt. Jeweils 100 Hohlfasermembranen mit einer Länge von 24 cm wurden zu einem Hohlfasermembranmodul zusammen gefügt. Die unteren und oberen Enden der Membranen wurden durch 2 cm lange Polypropylen-Schläuche fixiert. Die unteren Enden wurden mit Epoxidharz verschlossen. Am oberen Enden wurden die Membranzwischenräume mit Epoxidharz gefüllt und die Membranen sorgfältig abgeschnitten. Ein weiterer Polypropylen-Schlauch diente als Verbindung der Membranmodule mit der im MBR integrierten Membranhaltvorrichtung. Ein Foto eines neuen und eines gefoulten Hohlfasermembranmodul ist in Abbildung 10C dargestellt.

Tabelle 6: Charakteristische Kenndaten der Membranen im MBR UNSW.

Membran-Kenndaten	
Membranmaterial	PVDF
Nominelle Porengröße	0,20 µm
Innerer Durchmesser	0,39 mm
Äußerer Durchmesser	0,65 mm
Faserlänge	24 cm
Anzahl Hohlfasern im Modul	100
Membranoberfläche (Modul)	0,05 m ²
Betriebsweise (Fluss)	out/in

Bevor die Membranmodule in den MBR integriert wurden, wurden sie für 3 h mit 80 %-igem Ethanol gespült, um die Hydrophilität zu erhöhen und anschließend für weitere 2 h mit demineralisiertem Wasser gespült.

3.4.2. Kommunalen MBR Waldmössingen (WM)

3.4.2.1. Anlagenschema und Membranspezifikationen

Die Kläranlage Waldmössingen der Stadtwerke Schrammberg wurde 2004 in Betrieb genommen. Die Ausbaugröße der Kläranlage beträgt 2600 Einwohnerwerte. Der MBR funktioniert nach dem Verfahren der vorgeschalteten Denitrifikation und besteht aus zwei verbundenen Becken. Das Denitrifikationsbecken befindet sich vor dem Belebungsbecken (Nitrifikationsbecken). Im Belebungsbecken sind zwölf Membranpakete (Zenon, ZeeWeed®) mit einer Membranfläche von 4400 m² installiert. In Tabelle 7 sind die Kenndaten der Membranen und Abmessungen des MBR aufgeführt.

Tabelle 7: Membrantechnische Kennwerte der ZeeWeed-Membranen und Abmessungen des MBR WM.

Membran-Kenndaten und Abmessungen MBR WM	
Membranmaterial	PVDF
Nominelle Porengröße	0,04 µm
Äußerer Durchmesser	2 mm
Faserlänge	200 cm
Anzahl Membranpakete	12
Betriebsweise (Fluss)	out/in
Membranoberfläche (Gesamt)	4400 m ²
Volumen Denitrifikationsbecken	250 m ³
Volumen Nitrifikationsbecken	480 m ³

Vor dem Zulauf in den MBR erfolgt eine gründliche mechanische Vorreinigung. Der Zulauf in die mechanische Stufe erfolgt über drei Tauchmotorpumpen aus dem Vorlageschacht. Die mechanische Reinigung erfolgt durch den Einbau einer Kompaktanlage aus Rechen und Sandfang und zwei nachgeschalteten Trommelsieben. Der Rechen hat eine Spaltbreite von 5 mm, die nachgeschalteten Spaltsiebe von 0,5 mm. Die Membranstufe des MBR WM ist zweistrangig aufgebaut, wie in Abbildung 18 schematisch dargestellt ist. Im normalen Betrieb ist jeweils nur eine Permeatpumpe im Einsatz, die das Permeat durch die gesamte Membranfläche (beide Membranstufen) zieht. Jede Permeatpumpe ist in der Lage den gesamten Ablauf zu filtrieren. Um möglichst lange Standzeiten der Pumpen zu gewährleisten, wird in regelmäßigen Abständen zwischen den Pumpen umgeschaltet. Überschussschlamm wird aus dem MBR in einen Schlammstapelbehälter überführt, so dass der Feststoffgehalt im MBR konstant gehalten wird.

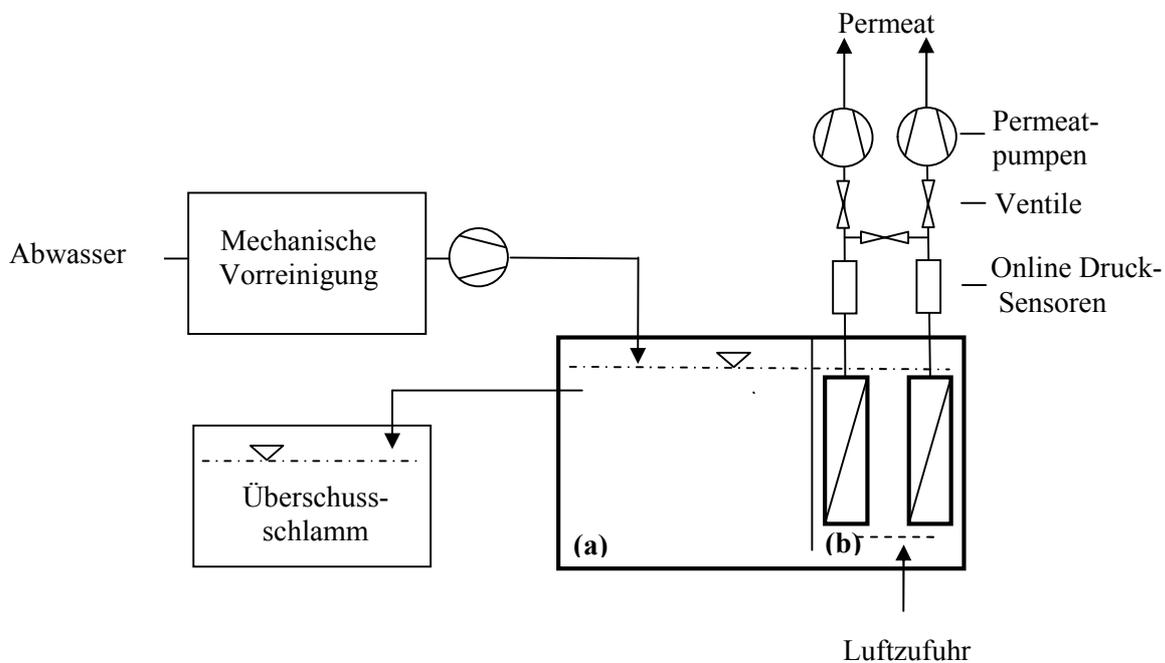


Abbildung 18: Schematische Darstellung des MBR Waldmössingen ((a): Denitrifikationsbecken, (b): Nitrifikationsbecken).

3.4.2.2. Prozessparameter MBR WM

Der Kläranlagenzufluss besteht aus ca. 30 % kommunalen Abwasser und 70 % Fremdwasser. Der maximale hydraulische Durchsatz liegt bei 25 L/s bei Regen- bzw. Tauwetter und der minimale Durchsatz bei 15 L/s zu trockenen Zeiten. Im Jahresdurchschnitt sind starke Schwankungen im Schlammalter festzustellen. Dabei lag das mittlere Schlammalter bei 103 Tagen. Besonders in den Wintermonaten und zu Zeiten der Schneeschmelze ergibt sich ein sehr hohes rechnerisches Schlammalter von bis zu 400 Tagen. Dies kann auf die geringen Zulauffrachten zurückgeführt werden, die lediglich eine geringe Überschussschlamm-

produktion ergeben. Zu Zeiten der Versuchsdurchführung lag das Schlammalter wesentlich niedriger bei ca. 40 bis 50 Tagen. In Tabelle 8 sind Abwasser- und Biomasse-Kenndaten während der durchgeführten Experimente dargestellt.

Tabelle 8: Abwasser- und Biomasse-Kenndaten des MBR WM.

Abwasser- und Biomasse-Kenndaten	
pH	7,3 - 8,2
HRT	8 - 14 h
SRT	103 d (min. 28, max. 444)
COD(Abwasser)	370 mg/L (min. 28, max. 1691)
COD(Ablauf)	11,3 mg/L (min. 2,3, max. 27,3)
COD Entfernung	97 %
ρ (Ammonium Abwasser)	14,4 mg/L (min. 0,5, max. 64,3)
ρ (Ammonium Ablauf)	0,05 mg/L (min. 0,0, max. 1,7)
Ammonium Entfernung	97 %
ρ (Biomasse)	~ 10 g/L

Verwendete Betriebsweise

Die Membranen werden im Rückspülmodus betrieben. Ein Zyklus setzt sich dabei aus einer Filtrationsphase von 500 s und einer anschließenden Rückspülphase (in/out) von 50 s zusammen. Der Rückspülfluss ist dabei jeweils um den Faktor 1,5 höher als der Brutto-Permeatfluss. Die Rückspül-Permeatmenge ist auf 160 m³/h begrenzt. Der durchschnittliche Permeatfluss beträgt 20 L/m²h, mit einem minimalen Permeatfluss von 10 L/m²h. Der Permeatfluss ist dabei von der zulaufenden Abwassermenge abhängig. Fließt der Anlage wenig Abwasser zu, wirkt die Anlage wie ein batch-Reaktor. Zunächst findet ein geringfügiger Aufstau des Abwassers statt, bis ein vorgegebener Füllstand erreicht ist. Dann wird mit minimalen Permeatfluss filtriert bis der untere Füllstand erreicht ist. Der durchschnittlich aufgebrachte TMP liegt bei 150 mbar [Krampe und Laufer 2006].

3.5. Versuche zum Fouling von Membranen

Die Laborversuche zum EPS-Fouling sollten im Wesentlichen die Wirkung der Betriebsweise auf das Fouling und die Zusammensetzung und den Aufbau der entstandenen Foulingschichten klären.

3.5.1. Prozessparameter der verwendeten Betriebsweisen

Im Rahmen der Arbeit wurden Foulingversuche bei vier verschiedenen Betriebsweisen durchgeführt und die hydraulische Leistung und Foulingeigenschaften untersucht. Die Permeatfluss-Produktivität war für alle Betriebsweisen identisch und ergab einen Netto-Permeatfluss von $20 \text{ L/m}^2\text{h}$. Nach der Filtration eines definierten Permeatvolumens von 480 L/m^2 wurde der Kurzzeit-Filtrationsprozess nach 24 h gestoppt. In Tabelle 9 sind die jeweiligen Brutto-Permeatflüsse und die verwendeten Filtrationszeiten angegeben.

Tabelle 9: Brutto-Permeatflüsse und Filtrationszeiten der verwendeten Betriebsweisen.

Betriebsweise	Permeatfluss in $\text{L/m}^2\text{h}$	Zeit in s
Kontinuierlich	20	Kontinuierlich
Relaxation	22 - 0	220 - 20
Rückspül	25 - (-34)	220 - 20
Mixed	40 - 20 - (-34)	80 - 340 - 30

Während bei der kontinuierlichen Betriebsweise keine physikalische Reinigung durchgeführt wurde, wurde der Permeatfluss bei den anderen Betriebsweisen nach einem definierten Zeitintervall unterbrochen (Relaxation) oder zum Rückspülen der Membranen umgekehrt (Rückspül, Mixed). Die Rückspülung mit Permeat äußert sich in einem negativen Permeatfluss. Beim Mixed-Modus wurde die Filtration zunächst mit hohem Permeatfluss und anschließend bei niedrigerem Permeatfluss weiter betrieben. Dies sollte zu einer schnellen „schützenden“ Deckschichtbildung führen, die Porenfouling verhindert. In Abbildung 19 ist der Verlauf des TMP innerhalb eines Filtrationszyklusses für die verschiedenen Betriebsweisen dargestellt.

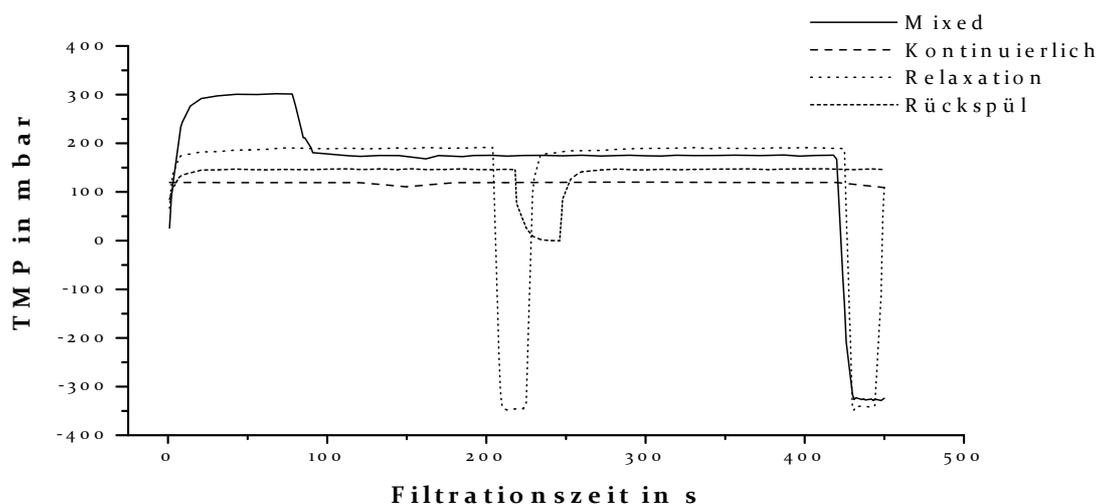


Abbildung 19: TMP-Verlauf der verschiedenen Betriebsweisen nach 20 h Filtrationszeit.

Für die Foulingexperimente wurden jeweils zwei neue Membranmodule in den MBR integriert. Vor dem Einbau der Membranmodule wurde die Permeabilität mittels eines Reinwasser-Tests bestimmt.

Neben den Kurzzeit-Untersuchungen wurden Langzeit-Experimente mit der Relaxations-Betriebsweise zwischen vier Tagen und drei Monaten durchgeführt. Zur Quantifizierung des Foulings wurde die Änderung des TMP verwendet und eine detaillierte Analyse des hydraulischen Widerstands auf Grundlage des Gesetzes von Darcy vollzogen (siehe Kapitel 2.4.6.3).

3.5.2. Fraktionierung der Foulingschichten

Um die Anteile des reversiblen und des irreversiblen sowie des Oberflächen- und des Porenfoulings am gesamten Fouling zu bestimmen, wurden die Membranen nach festgelegter Versuchsdauer aus dem MBR entfernt und die entstandene Deckschicht mittels verschiedener physikalischer und chemischer Reinigungsschritte fraktioniert (Abbildung 20).

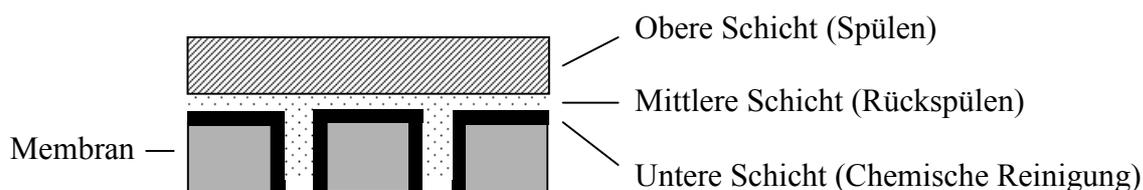


Abbildung 20: Fraktionierung der Membranfoulingschicht in eine obere, mittlere und untere Schicht.

Zunächst wurden die entnommenen Membranmodule gründlich mit 50 mL Milli-Q-Wasser gespült, um die locker gebundene oberflächliche Kuchenfoulingschicht (F_K) zu entfernen. Für die weitere Fraktionierung war es unabdingbar, dass sämtliche Belebtschlammflocken und anhaftendes kolloidales Material entfernt wurden. Das gespülte Membranmodul wurde anschließend mit 50 mL Milli-Q-Wasser bei einem Permeatfluss von $37 \text{ L/m}^2\text{h}$ zurückgespült, um die mittlere Schicht, die reversible Porenfoulingschicht (F_{RP}), zu erhalten. Als letzter Schritt wurde das Membranmodul in 50 mL 0,1 M NaOH-Lösung unter leichtem Rühren (30 rpm) bei 25°C für 24 h gespült, um die untere Schicht, die irreversible Foulingschicht (F_{IF}), zu erhalten. Zur Bestimmung des hydraulischen Widerstands der einzelnen Schichten wurde nach jedem Reinigungsschritt ein Reinwasser-Test durchgeführt.

3.5.3. Bestimmung des hydraulischen Widerstands

Der hydraulische Widerstand der einzelnen Schichten wurde wie folgt berechnet:

$$\text{Widerstand der gesamten Foulingschicht:} \quad R_{TF} = R_{Total} - R_m \quad (26)$$

$$\text{Widerstand der Kuchenfoulingschicht:} \quad R_K = R_{Total} - R_{Sp\u00fclung} \quad (27)$$

$$\text{Widerstand der reversiblen Porenfoulingschicht:} \quad R_{RP} = R_{Sp\u00fclung} - R_{R\u00fccksp\u00fclung} \quad (28)$$

$$\text{Widerstand der irreversiblen Foulingschicht:} \quad R_{IF} = R_{R\u00fccksp\u00fclung} - R_m \quad (29)$$

mit:

R_{Total} : Widerstand am Ende des Foulingexperiments

R_m : Widerstand des Membranmoduls

$R_{Sp\u00fclung}$: Widerstand nach dem 1. Reinigungsschritt

$R_{R\u00fccksp\u00fclung}$: Widerstand nach dem 2. Reinigungsschritt

Die untere Foulingschicht repr\u00e4sentiert das irreversible Fouling (R_{irrev}), w\u00e4hrend die mittlere reversible Porenfoulingschicht und die obere Kuchenfoulingschicht das reversible Fouling (R_{rev}) darstellen.

3.6. Physiko-chemische Charakterisierung von Biofilmen und EPS

3.6.1. Photometrische und gravimetrische Bestimmungen

Biochemisch-photometrische Bestimmungen

Die Protein- und die Kohlenhydrat-Konzentration der EPS wurde mittels photometrischer Methoden bestimmt. Die Analyse der Proteine erfolgt durch die von Fr\u00f6lund et al. (1996) modifizierte Methode von Lowry et al. (1951). Als Referenzstandard wurde das Protein BSA, verwendet. Die Analyse der Kohlenhydrate erfolgte nach der Methode von Dubois et al. (1956). Als Referenzstandard diente eine Mischung aus Glukose und Pullulan (50/50) (w/w). Die Analyse des intrazellul\u00e4ren Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase erfolgte nach der enzymatischen Methode von Ng and Dawes (1973) unter der Verwendung des Referenzzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase aus *Leuconostoc mesenteroides*.

Eine Anleitung der biochemischen Analysemethoden findet sich im Anhang A.

Gravimetrische Bestimmungen

Trockenmasse und Wassergehalt

Die Trockenmasse wurde nach der Verfahren der DIN EN 12880 (2000) bestimmt. Dazu wurden die Proben bis zur Gewichtskonstanz bei 95°C getrocknet. Die Trockenmasse wird in % angegeben. Der Wassergehalt wird als Massenverlust unter definierten Bedingungen nach dem festgelegten Trocknungsverfahren bestimmt. Er wird in % oder in g/kg angegeben [DIN EN 12880].

Aschegehalt

Der Aschegehalt bezeichnet den Anteil (mineralischer) Rückstände einer Substanz bei vollständiger Verbrennung (Veraschung) und gibt Auskunft über den Mineralstoffgehalt einer Probe. Die Bestimmung des Aschegehalts erfolgt gravimetrisch durch Veraschen im Muffelofen bei 550°C [DIN EN 12879 (2000)]. Der Aschegehalt wird in % angegeben.

Die Durchführung der gravimetrischen Methoden ist im Anhang A erläutert.

3.6.2. Elektrische Leitfähigkeit

Die elektrische Leitfähigkeit wurde mit einem temperaturkompensierten Leitfähigkeitsmessgerät vom Typ LF 318 und einem TetraCon 325 Messsensor (WTW, Deutschland) bestimmt. Die gemessenen Werte beziehen sich auf eine Referenztemperatur von 25°C.

3.6.3. Elementaranalyse

Zur Bestimmung der elementaren Zusammensetzung (C, N) von EPS-, SMP- und Biofilmproben wurden die gefriergetrockneten Proben bei 75°C erneut bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Elementaranalysen wurden als Doppelbestimmung durch das Institut für anorganische Chemie der Universität Karlsruhe (TH) durchgeführt.

3.6.4. Aminosäure-Analyse mittels HPLC

Die Aminosäurezusammensetzung ausgewählter EPS- und Standardproteine wurde chromatographisch bestimmt. Gefriergetrocknete EPS- bzw. Proteinproben wurden in Milli-Q-Wasser gelöst, so dass sich ein DOC-Wert von > 50 mg/L einstellte. Von der gelösten Probe wurden 2 mL mit 2 mL 6 M HCl gemischt und bei 120°C über Nacht in dickwandigen, verschlossenen Glasgefäßen inkubiert. Anschließend wurde die HCl mittels eines Stickstoffstroms bei 40°C evaporiert. Die zurückgebliebenen Pellets wurden in Milli-Q-Wasser gelöst und der Evaporationsschritt wiederholt. Die Pellets wurden wieder in Milli-Q-Wasser gelöst und für die HPLC-Analyse verwendet. Die Aminosäure-Analyse wurde mit

einer speziell für die Aminosäure-Analytik entwickelten HPLC, der Aminoquant (Agilent, USA), durchgeführt. Die Aminosäuren wurden mit diesem HPLC-System vollautomatisch durch eine zweistufige Vorsäulenderivatisierung in fluoreszierende Derivate umgesetzt. Die primären Aminosäuren reagieren in der ersten Stufe mit Ortho-Phthalaldehyd (OPA), die sekundären Aminosäuren in der zweiten Stufe mit Fluorenyl-methyloxycarbonylchlorid (FMOC). Die Derivate wurden mit einer Reversed-Phase-Säule mittels eines Lösungsmittelgradienten (polar nach unpolar) getrennt und mittels eines Fluoreszenz-Detektors analysiert. Eine Beschreibung der verwendeten Chemikalien und Parameter findet sich im Anhang (Tabelle 49, Anhang A).

3.6.5. Gelöster organischer Kohlenstoff (DOC)

Die Bestimmung des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC) wurde mit einem Shimadzu Total Carbon Analyser TOC-5000 (Shimadzu, Deutschland) durchgeführt. Das Messverfahren beruht auf einer thermisch-katalytischen Oxidation des organischen Kohlenstoffs zu CO₂. Dazu muss die Probe zunächst mit HCl (c = 2 mol/L) angesäuert werden, um den anorganischen Kohlenstoff durch Ausblasen mit Stickstoff in Form von CO₂ zu entfernen. Die thermisch-katalytische Oxidation der organischen Stoffe findet bei 650°C statt. Das entstandene CO₂ wird nach Kühlung und Trocknung mittels IR-Detektion quantifiziert.

3.6.6. Größenausschlusschromatographie

Zur Untersuchung der Molekülgrößenverteilung von eEPS und SMP wurden zwei verschiedene analytische SEC-Systeme (SEC, engl.: size exclusion chromatography) verwendet (Tabelle 10).

LC-UV/OCD

Zur Untersuchung der eEPS-Molekülgrößenverteilung wurde das LC-UV/OCD-System verwendet (LC; engl.: liquid chromatography) [Huber 1992, Huber und Frimmel 1996]. Das System enthält neben dem UV-Detektor einen organischen Kohlenstoff-Detektor. Vor der Detektion wird der organische Kohlenstoff durch eine Gel-Säule (Fractogel® TSK HW-50S) chromatographisch getrennt. Nach Austritt aus der Säule erfolgt die Bestimmung der UV-Absorption bei $\lambda = 254$ nm. Darauf folgt die Bestimmung des DOC durch photochemische Oxidation der organischen Stoffe in einem Dünnschichtreaktor (Grenzel-Reaktor) mit anschließender CO₂-Detektion in einem IR-Analysator. Durch vorherige Ansäuerung wird der anorganische Kohlenstoffanteil im oberen Teil des Reaktors als CO₂ mit Stickstoff ausgestrippt. Um den Verlust des auf der Säule verbleibenden Kohlenstoffs zu quantifizieren, wird die Probe zusätzlich im Bypass-Modus gemessen. Die auf der Säule verbleibende Fraktion des DOC wird als HOC (engl.: hydrophobic organic carbon) bezeichnet. Die

Ermittlung dieser Fraktion erfolgt durch Differenzbildung der über die Säulen- und die Bypass-Messung erhaltenen DOC-Konzentration. Eine Auswertung der Chromatogramme kann über die totale oder partielle Integration verschiedener Retentionsbereiche erfolgen.

Tabelle 10: Experimentelle Angaben zu den analytischen SEC-Systemen.

Parameter	LC-UV/OCD-System	LC-UV/OCD/OND-System
Säule	TSK HW 50 (S)	TSK HW-55 (S) TSK HW-65 (S)
Material	Copolymer aus Methacrylsäure und Ethylenglykol	Copolymer aus Methacrylsäure und Ethylenglykol
Porengröße (Å)	125	500 und 1000
Partikelgröße	20 - 40 µm	20 - 40 µm
Trennbereich	500 - 80000 g/mol (globuläre Proteine) 500 - 20000 g/mol (Dextrane)	1000 – 700000 g/mol und 40000 – 5000000 (globuläre Proteine) 1000 – 200000 g/mol und 10000 – 1000000 (Dextrane)
Dimensionen (Länge x Durchmesser)	250 x 20 mm	jeweils 250 x 20 mm
Säulenvolumen	79 mL	n. a.
Ausschlussvolumen (V_0)	28,7 mL	n. a.
Permeationsvolumen (V_p)	66,3 mL	n. a.
Injektionsvolumen (V_{inj})		
<i>Säulenmessung</i>	500 µL	4000 µL
<i>Bypassmessung</i>	50 µL	100 µL
Eluent	Phosphatpuffer $\rho(\text{Na}_2\text{HPO}_4 * 2 \text{H}_2\text{O}) = 1,5 \text{ g/L}$ $\rho(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 2,5 \text{ g/L}$ pH= 6,8, $\kappa = 2,8 \text{ mS/cm}$, $\mu = 0,04 \text{ mol/L}$	Phosphatpuffer $\rho(\text{Na}_2\text{HPO}_4 * 2 \text{H}_2\text{O}) = 1,5 \text{ g/L}$ $\rho(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 2,5 \text{ g/L}$ pH= 6,8, $\kappa = 2,8 \text{ mS/cm}$, $\mu = 0,04 \text{ mol/L}$
Detektion	UV (254 nm), DOC	UV (254 nm), DOC, DON

n.a. = nicht analysiert

LC-OCD/OND

Zur Untersuchung der SMP-Proben wurde das in Kapitel 2.3.3 beschriebene LC-OCD/OND-System mit einer Kombination von zwei Trennsäulen verwendet. Auf eine UV-Detektion bei 254 nm wurde verzichtet. Wie bereits erwähnt hat dieses System den Vorteil sowohl den organischen Kohlenstoff als auch den (organischen) Stickstoff im Anschluss an eine chromatographische Trennung detektieren und quantifizieren zu können. In Kombination mit den beiden chromatographischen Trennsäulen können so besonders gut hochmolekulare

organische Verbindungen wie Proteine, Polysaccharide, etc. hinsichtlich ihrer Molmasse und Konzentration charakterisiert werden.

3.6.7. ^{13}C CPMAS NMR-Spektroskopie

Die NMR-Messungen wurden am Spektrometer Bruker AVANCE 400 WB (9,4 T) (Bruker, Deutschland) in einem kommerziellen „wide bore“ CPMAS-Doppel-Resonanz-Probenkopf mit einem X-Kanal und einem Protonen-Kanal durchgeführt. Dieser war mit einem 4 mm MAS-System ausgestattet. Die Rotoren sind aus Zirconiumdioxid, die Rotorkappen aus fluoriertem Kunststoff (Kel-F). Die 4 mm Rotoren besitzen ein Fassungsvermögen von bis zu 100 mg EPS.

3.6.7.1. Pulsprogramme und Aufnahmeparameter

Die Aufnahmen der ^{13}C NMR-Spektren wurden mit einem CPMAS NMR-Pulsprogramm aufgenommen. Bei der CPMAS NMR wird die Magnetisierung von den Protonen auf die ^{13}C -Kerne übertragen, was die Empfindlichkeit gegenüber DPMAS-Messungen (DP, direkte Polarisation) deutlich verbessert. Das Pulsprogramm definiert eine Impulssequenz, in der die benötigten Impulse bzw. deren Abstände definiert werden. In Abbildung 21 ist das Standard-Pulsprogramm für die ^{13}C CPMAS NMR-Messungen mit dem Protonen- und dem ^{13}C -Kanal dargestellt. Mittels der Kreuzpolarisation werden die C-Atome in Abhängigkeit ihrer Bindungen zu H-Atomen in unterschiedlicher Stärke polarisiert [Pizzoferrato et al. 2000]. Um den Effekt zu minimieren wurde die Kreuzpolarisation in einer gerampten Weise mit abnehmender Intensität durchgeführt. Zu Beginn liegt die Leistungsamplitude des Pulses bei 100 % und am Ende bei 33 %.

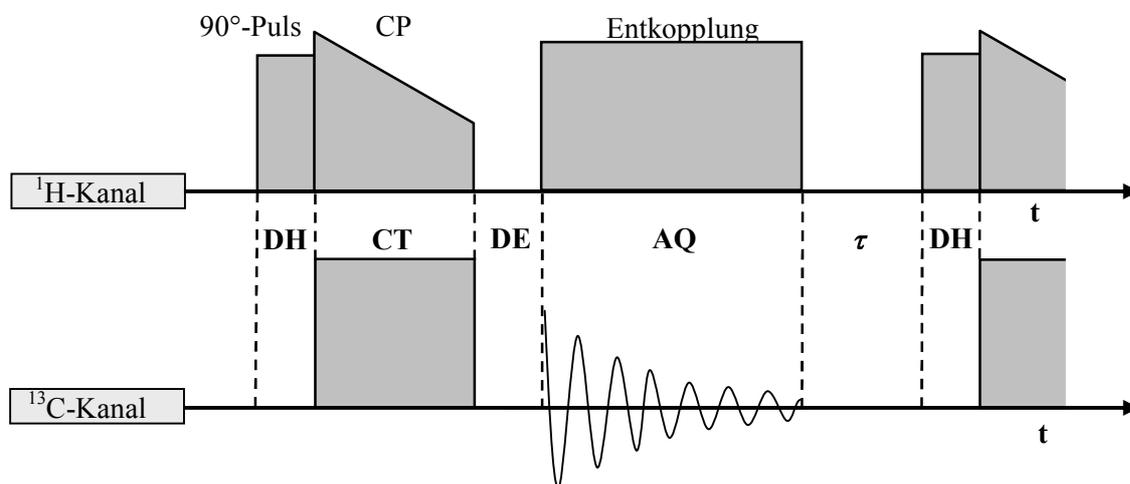


Abbildung 21: Standardpulsprogramm der ^{13}C CPMAS NMR-Messungen.

Die Zeitparameter können dem Pulsprogramm entnommen werden und werden im Folgenden erläutert:

Pulsabstand τ : Zeit zwischen zwei aufeinanderfolgenden Pulssequenzen. Sie soll mindestens fünfmal so groß sein wie die Relaxationszeit der Protonen T_{1H} .

Akquisitionsverzögerung DE: „Totzeit“ des Pulsexperiments, in der die durch Hochfrequenzimpulse induzierten Ströme in der Spule abklingen.

Akquisitionszeit AQ: Zeitintervall, in der der freie Induktionsabfall (FID, engl.: free induction decay) aufgezeichnet wird.

Kontaktzeit CT: Die Kontaktzeit (CT, engl.: contact time) ist die Zeit, in der der Magnetisierungstransfer von Protonen auf ^{13}C -Kerne stattfindet.

90°-Protonen-Puls DH: Dauer des Protonen 90°-Impuls. Während dieser Zeit wird die Magnetisierung der Protonen in die x-, y-Ebene gedreht.

In Tabelle 11 sind ausgewählte Aufnahmeparameter für die ^{13}C CPMAS NMR-Aufnahmen angegeben.

Tabelle 11: Ausgewählte NMR-Aufnahmeparameter bei ^{13}C CPMAS NMR-Messungen.

Aufnahmeparameter		^{13}C NMR
Sendefrequenz in MHz	SF	100,613
Anzahl der addierten Einzel-FIDs	NS	2000- 10000
Probenrotationsfrequenz in Hz	SR	12000
Spektrale Weite in kHz	SW	123,45
Anzahl der Datenpunkte des FIDs	TD	4120
Akquisitionszeit in ms	AQ	10
Pulsabstand in s	τ	6 -10
Acquisitionsverzögerung in μs	DE	20
Kontaktzeit in ms	CT	2,5
^1H 90° -Impuls in μs	DH	4

3.6.7.2. Auswertung der NMR-Spektren

Um ein NMR-Spektrum zu erhalten, müssen ausgehend vom FID verschiedene Rechenoperationen durchgeführt werden. Dazu wurde die Software XWIN-NMR 3.0 (Bruker, Deutschland) verwendet. Als erster Schritt wird der FID mit einer Exponentialfunktion ($LB = 20\text{Hz}$) multipliziert, wodurch Rauschteile am Ende des FID verkleinert werden. Nach einer anschließenden Fourier-Transformation (Überführung Zeit- in Frequenzdomäne) wird das Spektrum manuell phasenkorrigiert. Zur anschließenden Grundlinienkorrektur wird das Spektrum mit einer Polynomfunktion multipliziert. Bei geringem Signal/Rausch-Verhältnis (S/N, engl.: signal/noise) der Spektren sind die beiden letzten Operationen problematisch durchzuführen und können zu großen Fehlern der Integralwerte einzelner Signale führen.

Kalibrierung der Spektren

Die Kalibrierung der chemischen Verschiebungsskala erfolgt über einen externen Standard. In der ^{13}C Festkörper-NMR wird üblicherweise die Tetramethylsilan-(TMS)-Skala durch Kalibrierung der chemischen Verschiebung mit Glycin eingestellt. Das Carboxyl-Gruppen-Signal wird bei 176,03 ppm fixiert.

Integration

Die Spektren werden routinemäßig durch Integration ausgewertet. Bei vorheriger Optimierung der NMR-Parameter sind die Intensitäten der NMR-Signale proportional zur Anzahl der enthaltenen C-Atome einer Probe. Voraussetzung für eine quantitative Auswertung der Spektren ist dabei ein ausreichend hohes S/N-Verhältnis, wie in Kapitel 4.1.1.3 diskutiert wird.

Zur quantitativen Auswertung werden die C-Atome aus verschiedenen funktionellen Gruppen chemischen Verschiebungsbereichen zugeordnet. Die Auftrennung in chemische Verschiebungsbereiche ist für ^{13}C NMR-Spektren in Tabelle 12 angegeben. Die Integrationsbereiche und Zuordnungen basieren auf Literaturdaten [Kögel-Knaber 2002, Lankes 2001, Pizzoferrato et al. 2000, Nelson und Baldock 2005, Mao et al. 2007, Golchin et al. 1996] und sind an die Intensitätsverhältnisse in EPS angepasst.

Bei Überlappung zweier oder mehrerer Signale wird die Integration problematisch. Die Integrationsgrenze muss den Proben angepasst werden, um einen möglichen Fehler bei der Integration zu minimieren. Besonders in den Überlappungsregionen zwischen aliphatischen und O-Alkyl-Strukturen (45 bis 60 ppm) und zwischen O-Alkyl-Strukturen und Aromaten (90 bis 110 ppm) werden in der Literatur verschiedene Integrationsgrenzen gefunden. In ^{13}C NMR-Spektren von EPS treten bei den meisten Proben sehr intensive Signale im Kohlenhydrat-Bereich auf. Das Signal anomerer C-Atome ist bei 103 ppm deutlich zu erkennen. In den EPS ist der Anteil aromatischer Strukturen im Vergleich zu den O-Alkyl-Strukturen relativ gering, so dass die Integrationsgrenze von 110 ppm geeignet ist.

Tabelle 12: Chemische Verschiebungsbereiche und deren Zuordnung zu Strukturelementen in ^{13}C NMR-Spektren von EPS (TMS-Skala).

Chemische Verschiebung in ppm	Strukturelement	Polymer
0-50	Aliphaten sp ² Kohlenstoff in unverzweigten und verzweigten Ketten, Methylgruppen, primäre aliphatische Amine	Proteine, Lipide, KH
13, 14, 15	Terminale CH ₃ , CH ₂ an terminales CH ₃	
20, 21, 23, 25	CH ₃ in Acetyl-Gruppen, CH ₃ und CH ₂ in Seitengruppen von Peptiden	
30, 32	Alkyl-CH ₂	
43	CH ₂ in Glycin	
50 – 60	Überlappungs-Region Aliphaten + O-Alkyl-Kohlenstoff Quartärer aliphatischer Kohlenstoff α -C von Aminosäuren sekundäre aliphatische Amine	Proteine, KH
54, 55	NCH von Peptiden und N-acetylierten Zuckern	
56	Kohlenstoff in Amino-Gruppen	
60 - 100	O-Alkyl-Kohlenstoff sp ³ Kohlenstoff mit ein oder zweifacher O-/N-Substitution	KH
62	OCH ₂ Polysaccharide	
72	O-Alkyl C2, C3, C5 (Hexose), C2, C3 (Pentose)	
64	C6 (Hexose), C5 (Pentose)	
73, 83	OCH Signale von Polysacchariden	
85/89	C4 (Hexose)	
93	C1 in Glucopyranosid	
100 – 140	Un-/C-substituierter aromatischer und oelfinischer Kohlenstoff/ mehrfach O-/N-substituierter sp³ Kohlenstoff	KH, Lipide, Proteine
105	C1, anomeres C	
129	aromatische C oder mobile =C-H von Lipiden	
130	O substituierte Aromaten	
130	aromatische C von Phenylalanin und Tyrosin	
138	aromatische C von Phenylalanin und Tyrosin	
140 – 160	Aromaten/Heterozyklen sp ² Kohlenstoff in Ringen	Proteine, DNA
150	Substituierte aromatische C Atome, Phenolische C Atome	
157	C mit dreifacher N Substitution	
158	CN ₃ Arginin und C-OH Tyrosin	
160 – 190	Carboxyl-Gruppen, Ester, Amide	Proteine, KH
174, 175	NC=O Amid-C und COO Carboxyl-C	

Zur Quantifizierung von Proteinen mittels der NMR-Spektren ist es notwendig, den chemischen Verschiebungsbereich der α -C-Atome aus Proteinen zu definieren. Bei den untersuchten Biofilm- und EPS-Proben überlappen die Signale der α -C- und der O-Alkyl-C-Atome im Bereich zwischen 60 und 70 ppm deutlich. Zur Auswertung wurde die Integrationsgrenze zwischen den Bereichen auf 65 ppm festgelegt, um den Auswertungsfehler zu minimieren (siehe Kapitel 4.1.2.3).

Für eine quantitative Auswertung wurden die ^{13}C NMR-Spektren in sechs Hauptbereiche unterteilt, die in Tabelle 13 dargestellt sind. Zusätzlich wurden Indikatorsignale für n-Alkan- und DNA-Strukturen definiert.

Tabelle 13: Chemische Verschiebungsbereiche und Zuordnung zu chemischen Strukturen (P: Protein, KH: Kohlenhydrat).

Chemische Verschiebung in ppm	Chemische Struktur	Zuordnung	Abkürzung
Hauptbereiche			
200 - 160	Amid/Carboxyl-C	P, KH	I ₁
160 - 110	Aromaten-C	P	I ₂
110 - 90	anomeres C	KH	I ₃
90 - 65	O-Alkyl-C	KH	I ₄
65 - 45	α -C	P	I ₅
45 - 0	aliphatische C	P, Lipide	I ₆
Indikatorsignale			
155 - 140	Aromaten-C	DNA	I _{2a}
31 - 29	aliphatische C	Lipide	I _{6a}

3.6.7.3. Bestimmung von T_{1H} -Zeiten

Um den Pulsabstand τ möglichst gering zu halten, ohne magnetische Sättigungseffekte zu erhalten, muss die Relaxationszeit der Protonen (T_{1H} -Zeit) bestimmt werden. Die T_{1H} -Zeit wurde für zwei Biofilmproben von *Aureobasidium pullulans* (mit und ohne adsorbierte Cu^{2+} -Ionen) und für das Polysaccharid Pullulan mittels eines „inversion recovery“-Experiments bestimmt. Beim „inversion recovery“-Experiment wird eine Reihe von ^{13}C NMR-Spektren mit einer Impulsabfolge von 180° - τ -90° -FID aufgenommen, wobei der Pulsabstand τ zwischen 10 und 10000 ms variiert wurde. In Abbildung 22 ist das verwendete Pulsprogramm dargestellt.

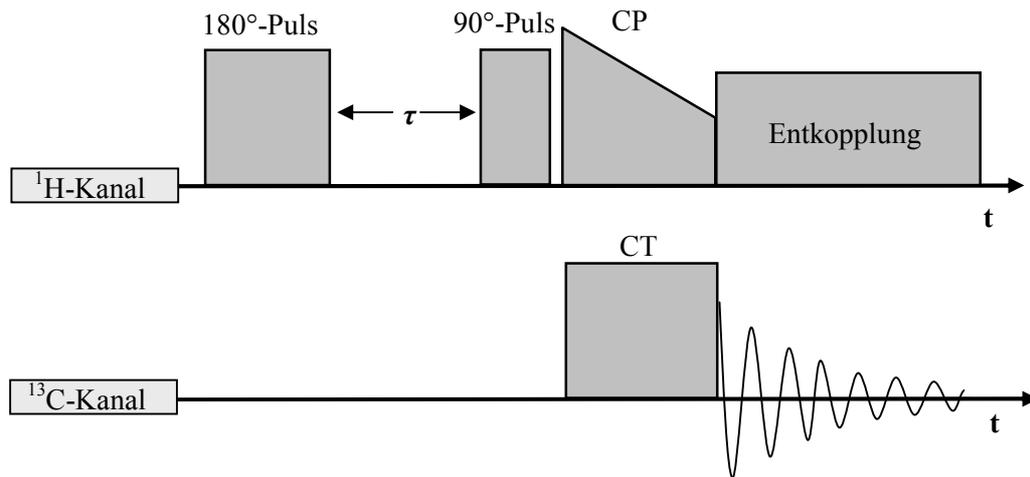


Abbildung 22: Pulsprogramm des „inversion recovery“-Experiments zur T_1 -Zeit-Bestimmung.

Die quantitative Auswertung der erhaltenen Spektren basiert auf der Blochschen Gleichung (Gleichung 12).

3.6.7.4. Bestimmung der Kontaktzeit

Während der Kontaktzeit findet der Polarisationstransfer von den Protonen auf die ^{13}C -Kerne statt. Zur Bestimmung der Kontaktzeit wurde das Standardpulsprogramm aus Abbildung 21 verwendet und die Kontaktzeit zwischen 0,1 und 5 ms variiert. Bei einer optimalen Kontaktzeit werden alle Signale mit gleicher Intensität erfasst.

3.6.7.5. Standardabweichung und Signal/Rausch-Verhältnis

Um Aussagen über die Güte der quantitativen Auswertung der ^{13}C CPMAS NMR-Spektren machen zu können, wurde die Standardabweichung der integralen Auswertung der chemischen Verschiebungsbereiche in Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses bestimmt. Dazu wurden Spektren des Biofilms *Aureobasidium pullulans* mit unterschiedlicher Anzahl von Aufnahmen (16, 128, 512, 1024, 2048, 4096) erstellt und jeweils fünfmal ausgewertet. Für die fünf erhaltenen Integrale der verschiedenen chemischen Verschiebungsbereiche wurde die durch die Auswertung verursachte relative Standardabweichung berechnet.

4. Ergebnisse und Diskussion

4.1. (NMR)-Untersuchungen an Modell-Biofilmen und -EPS

Die Untersuchungen von Biofilmen und EPS wurden mit dem Ziel einer Quantifizierung der strukturellen Hauptbestandteile (Kohlenhydrate und Proteine) durchgeführt. Dazu wurden umfangreiche Analysen mittels ^{13}C CPMAS NMR-Spektroskopie an Modell-Substanzen und Reinkultur-Biofilmen vollzogen. Die NMR-Untersuchungsmethode wurde für die Proben optimiert und spezifische Signalintensitätsverhältnisse in den NMR-Spektren für eine quantitative Auswertung erstellt. Die Genauigkeit der quantitativen Auswertung der ^{13}C CPMAS NMR-Spektren wurde anhand des S/N-Verhältnisses ermittelt. Aufbauend auf Ergebnissen der Untersuchung von Modell-Substanzen wurde die Zusammensetzung eines prokaryotischen und eines eukaryotischen Reinkultur-Biofilms bestimmt.

4.1.1. Optimierung der NMR-Parameter

Eine quantitative Analyse von ^{13}C CPMAS NMR-Spektren setzt voraus, dass jeder in der Probe enthaltene ^{13}C -Atomkern, unabhängig von der chemischen Umgebung des Atoms, mit gleicher Intensität erfasst wird. Dies setzt die Kenntnis der Relaxationszeiten und anderer, die Intensität beeinflussenden, Parameter voraus. Bei der Anwendung der NMR-Kreuzpolarisationstechnik ist die T_1 -Relaxationszeit der Protonen ($T_{1\text{H}}$) und die Kontaktzeit (CT), die Zeit in der ein Magnetisierungstransfer von H-Atomen auf C-Atome stattfindet, ausschlaggebend.

4.1.1.1. $T_{1\text{H}}$ -Zeit-Bestimmung

Um Sättigungseffekte durch zu kurze Pulsabfolgen zu vermeiden, ist es erforderlich einen Pulsabstand τ von mindestens fünfmal der längsten $T_{1\text{H}}$ -Zeit der Probe einzuhalten, um eine ausreichende Relaxation zu garantieren. Bei zu kurzen Pulsabfolgen kann es zu Sättigungseffekten kommen, welche die quantitative Auswertung der Spektren erschweren. Die $T_{1\text{H}}$ -Zeiten sind stark von der Zusammensetzung der Probe abhängig und wurden mittels eines „inversion recovery“-Experiments für folgende Modell-Systeme bestimmt:

- Biofilm *Aureobasidium pullulans*
- Biofilm *Aureobasidium pullulans* mit adsorbierten Cu^{2+} -Ionen
- Kohlenhydrat Pullulan

Da die Festkörper-NMR-Signale für Biopolymere in der Regel wenig aufgelöst sind, werden nicht die Relaxationszeiten einzelner H-Atome, sondern Gruppen-Relaxationszeiten

bestimmt. Eine Ausnahme stellt die Relaxationszeit des an das anomere C gebundene H-Atom dar, welches keine Überlappung mit anderen Signalen aufweist. Die T_{1H} -Zeiten variieren innerhalb einer Probe stark zwischen unterschiedlichen funktionellen Gruppen.

Zur Berechnung der T_{1H} -Zeiten für C-Atome von funktionellen Gruppen in verschiedenen chemischen Verschiebungsbereichen werden die Intensitäten der chemischen Verschiebungsbereiche gegen die Pulsabstände τ aufgetragen, wie in Abbildung 23 exemplarisch für die Probe Biofilm *A. pullulans* dargestellt ist.

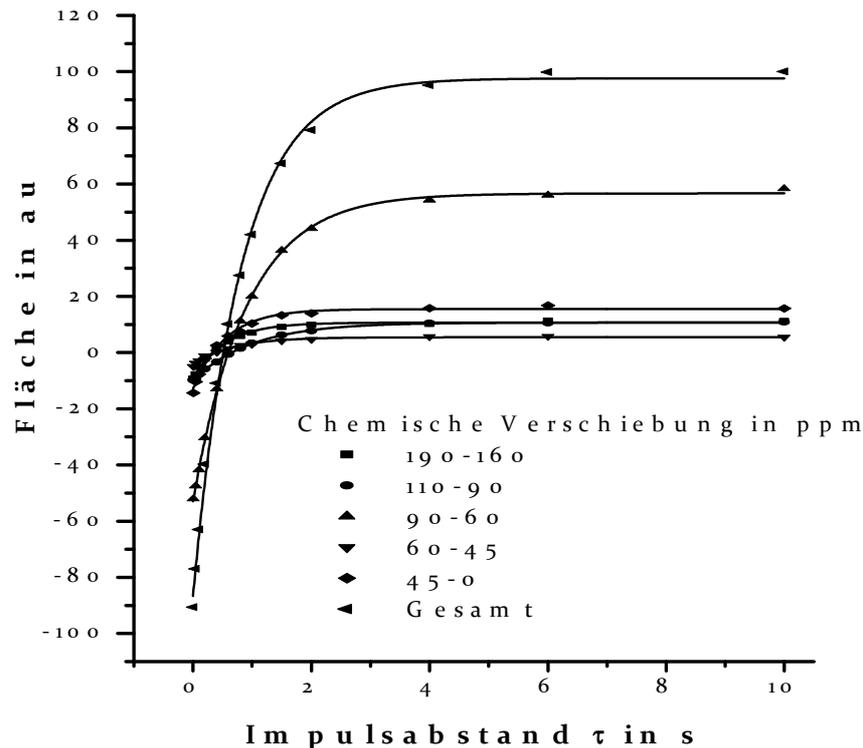


Abbildung 23: Bestimmung der Protonenrelaxationszeit T_{1H} (Probe: Biofilm *A. pullulans*).

Mittels der folgenden Exponentialfunktion lassen sich die Kurven anpassen und die T_{1H} -Zeiten berechnen (T_{1H} -Bestimmung Pullulan und *A. pullulans* mit Cu^{2+} , Abbildung 60, Anhang B):

$$I_M = I_0 + P \exp\left(\frac{\tau}{T_{1H}}\right) \quad (30)$$

mit:

I_M = gemessene Intensität [a. u.]

τ = Pulsabstand [s]

I_0 = Intensität bei $\tau = 0$ [a. u.]

T_{1H} = Relaxationszeit der Protonen [ms]

P = skalierungsabhängiger Parameter [a. u.]

Die durch Anpassung an die oben beschriebene Funktion erhaltenen T_{1H} -Zeiten der chemischen Verschiebungsbereiche der drei Proben unterscheiden sich deutlich voneinander (Tabelle 14).

Tabelle 14: T_{1H} -Zeiten verschiedener chemischer Verschiebungsbereiche für die Proben Biofilm *A. pullulans*, Biofilm *A. pullulans* + Cu^{2+} und Pullulan.

Chemische Verschiebung in ppm	Chemische Struktur	T_{1H} -Zeit in ms		
		<i>A. pullulans</i>	<i>A. pullulans</i> + Cu^{2+}	Pullulan
190 - 160	Amid/Carboxyl-C	543	311	--
160 - 110	Aromaten-C	--	--	--
110 - 90	anomeres C	993	597	1678
90 - 60	O-Alkyl-C	903	571	1586
60 - 45	α -C	656	397	--
45 - 0	aliphatische C	546	333	--
190 - 0	Gesamt C	807	535	1595

Das Kohlenhydrat Pullulan weist die längsten Relaxationszeiten von ca. 1600 ms auf. Im Gegensatz dazu zeigen Kohlenhydrat- und Protein-Strukturen in den Biofilmen kürzere Relaxationszeiten zwischen 543 und 993 ms. Dies ist insbesondere auf die Anwesenheit anorganischer Substanzen aus dem Nährmedium (z. B. Ca^{2+} , Cl^- , Mg^{2+}) zurückzuführen, die zu Wechselwirkungen und zur Verkürzung der Relaxationszeiten führen.

Durch Anwesenheit von Cu^{2+} -Ionen werden die Relaxationszeiten in allen Bereichen stark verkürzt und liegen zwischen 311 und 597 ms, was bei der Untersuchung von Umwelt-Biofilmpollen und einer möglichen Anwesenheit von paramagnetischen Ionen berücksichtigt werden muss. Ursache für die verkürzten Relaxationszeiten sind Wechselwirkungen mit ungepaarten Elektronen in paramagnetischen Verbindungen, was zu einer Linienverbreiterung im ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum führt. Da durch die Anwesenheit der Cu^{2+} -Ionen die T_{1H} -Zeiten aller chemischen Verschiebungsbereiche verkürzt werden, könnten intrazelluläre und extrazelluläre Bereiche anhand des Cu^{2+} -Gehalt unterschieden werden, falls Cu^{2+} überwiegend in extrazellulären Bereichen adsorbiert wird.

Innerhalb der Probe sind die T_{1H} -Zeiten stark von Dipol-Dipol-Wechselwirkungen abhängig und werden daher durch die Anzahl der H-Substitutionen der jeweiligen C-Atome beeinflusst. Je größer die Anzahl der H-Bindungen, desto kleiner sind die T_{1H} -Zeiten [Friebolin 2006]. Im chemischen Verschiebungsbereich der Aliphaten (0 bis 45 ppm) findet man daher im Vergleich zu den anderen Verschiebungsbereichen aufgrund einer ausgeprägten Dipol-Dipol-

Relaxation die kürzesten Relaxationszeiten in den Biofilmproben, während die Relaxationszeiten im chemischen Verschiebungsbereich der O-Alkyl-Strukturen (60 bis 110 ppm) (Kohlenhydrat-Strukturen) am längsten sind. Die kurzen Relaxationszeiten der Amid-Gruppen basieren auf Wechselwirkungen zwischen ^{14}N -Kernen und ^1H -Atomen.

Die Relaxationszeiten stimmen mit den Ergebnissen von Duquesnoy et al. (2008) und Mao et al. (2007) überein, welche für Kohlenhydrate in verschiedenen Molekülanordnungen $T_{1\text{H}}$ -Zeiten von 200 bis 1400 ms und für verschiedene Strukturen in Aminosäuren Relaxationszeiten kleiner 1000 ms analysierten.

Für Untersuchungen von Reinkultur- und Umwelt-Biofilmproben sowie deren EPS wurde im Weiteren ein Impulsabstand von 6 s gewählt. Bei Untersuchungen von EPS-Modell-Substanzen wurde ein minimaler Impulsabstand von 10 s verwendet.

4.1.1.2. Kontaktzeit-Bestimmung

Kontaktzeit (CT) wird die Zeit genannt in der Magnetisierungstransfer von den Protonen auf die C-Atome stattfinden kann. Um quantitative Aussagen treffen zu können, ist es wichtig, dass alle vorkommenden funktionellen Gruppen mit definierter Intensität erfasst werden. Von dem gefriergetrockneten Biofilm *A. pullulans* wurden ^{13}C CPMAS NMR-Spektren mit Kontaktzeiten zwischen 100 und 5000 μs aufgenommen. Die Integrale verschiedener chemischer Verschiebungsbereiche (Amid/Carboxyl-, Aromaten-, O-Alky-, α - und Alkyl-C) wurden gegen die Kontaktzeit aufgetragen (Abbildung 24).

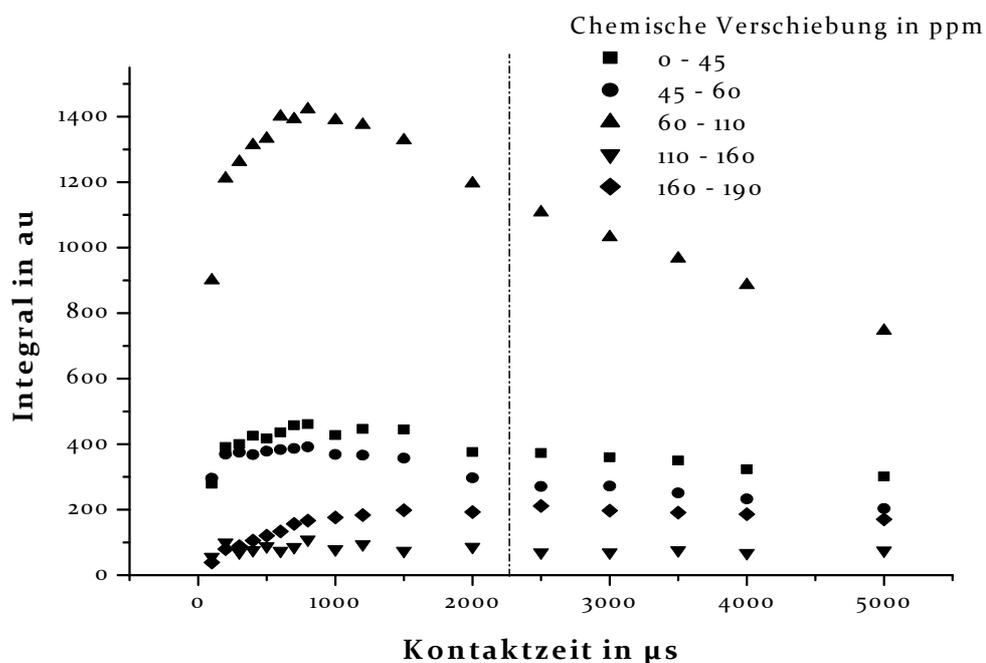


Abbildung 24: Integrale verschiedener chemischer Verschiebungsbereiche bei variierenden Kontaktzeiten (0- 5000 μs).

Die Flächenintensitäten der verschiedenen Signale variieren in Abhängigkeit der Kontaktzeit (siehe auch Abbildung 62, Anhang B). Für C-Atome mit starken Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Aliphaten, α -C, O-Alkyl-Strukturen) findet bei den verwendeten Rotationsfrequenzen von 12 kHz ein sehr guter Magnetisierungstransfer statt. Im Aliphaten-, α -C und O-Alkyl-Bereich ist schon nach etwa 600 μ s Kontaktzeit der Maximalwert der Kohlenstoffmagnetisierung erreicht. Bei C-Atomen mit schwachen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (Carboxy-/Amid-Signal) findet bei Rotationsfrequenzen größer 5 kHz nur ein unzureichender Magnetisierungstransfer statt.

Die ramp-Bedingungen und die Kontaktzeit muss so gewählt werden, dass die Intensität der C-Atome mit starken Dipol-Dipol-Wechselwirkungen aufgrund der $T_{1\rho H}$ -Zeit soweit abgenommen hat, dass sowohl das Amid/Carboxyl-Signal als auch die O-Alkyl-Kohlenhydrat-Signale gleichermaßen erfasst werden und keine Struktur über- bzw. unterrepräsentiert wird.

Bei langen Kontaktzeiten von 5000 μ s hat die Intensität der O-Alkyl-Strukturen um mehr als 50 % im Vergleich zu der maximalen Intensität abgenommen, während Strukturen mit schwachen Dipol-Dipol-Wechselwirkungen (C-Atome ohne kovalente Bindungen zu H-Atomen) nach wie vor hohe Intensität zeigen.

Die optimale Kontaktzeit für die zu untersuchenden Proben liegt bei 2500 μ s. Dies entspricht der maximalen Intensität der Amid/Carboxyl-Strukturen und einer in etwa 30 % reduzierten Intensität der O-Alkyl-Strukturen.

Zur Validierung der Kontaktzeit wurde ein Spektrum des Biofilm *A. pullulans* mit direkter Polarisation (^{13}C DPMAS NMR) aufgenommen und die Intensitäten der verschiedenen chemischen Verschiebungsbereiche mit denen eines ^{13}C CPMAS NMR-Spektrums von *A. pullulans* verglichen (Tabelle 15).

Tabelle 15: Vergleich der Integrale des ^{13}C CPMAS NMR- und des ^{13}C DPMAS NMR-Spektrums der Probe Biofilm *A. pullulans*.

Strukturelement	Chemische Verschiebung in ppm	Direkte Polarisation (DP)	Kreuzpolarisation (CP)
Amid/Carboxyl-C	200 - 160	14,7	14,1
aromatische C	160 - 110	7,7	8,3
O-Alky-C	110 - 45	48,0	52,5
aliphatische C	45 - 0	30,0	25,5

Die Integrale der verschiedenen Spektren stimmen gut überein. Maximale Abweichungen von 5 % (absolut) treten bei den Alkyl-C-Atomen auf, die einen relativ hohen Anteil an

Methylgruppen enthalten. Methylgruppen werden aufgrund ihrer Rotation nur schlecht in CP-Spektren erfasst. Die Abweichungen der Carboxyl- sowie des O-Alkyl-C-Atoms sind deutlich kleiner.

Des Weiteren wurden für die EPS-Modell-Substanzen (BSA, Pullulan, Dextran, Alginat) die Intensitäten des ^{13}C CPMAS NMR-Spektrums mit theoretisch ermittelten Intensitäten basierend auf deren Strukturmodellen verglichen. Die experimentellen und berechneten Intensitäten stimmen gut überein, so dass davon auszugehen ist, dass alle funktionellen Gruppen mit gleicher Intensität erfasst werden, wie in Kapitel 4.1.2 ausführlich dargestellt wird. Damit der Magnetisierungstransfer für die im Folgenden zu untersuchenden Proben immer mit gleicher Intensität stattfindet, müssen die Proben einen kleinen Gehalt an paramagnetischen Ionen und eine kleine Konzentration von Quadrupol-Kernen aufweisen. Des Weiteren müssen die Proben den gleichen Wassergehalt und eine möglichst hohe Konzentration der zu untersuchenden Biopolymere aufweisen. Dies setzt eine standardisierte Probenaufbereitung voraus.

4.1.1.3. Genauigkeit der Auswertung der ^{13}C NMR-Spektren

Die Genauigkeit der quantitativen Auswertung der ^{13}C CPMAS NMR-Spektren lässt sich anhand der Standardabweichung der integralen Auswertung in Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses bestimmen. Dazu wurden Spektren des Biofilms *A. pullulans* mit unterschiedlicher Anzahl von Aufnahmen erstellt und jeweils fünfmal ausgewertet. Das S/N-Verhältnis steht dabei über eine Wurzelfunktion im Zusammenhang mit der Anzahl der Aufnahmen (Abbildung 61, Anhang B).

Für die fünf Integrale der verschiedenen chemischen Verschiebungsbereiche wurde die durch die Auswertung verursachte relative Standardabweichung berechnet und gegen das S/N-Verhältnis des jeweiligen Integrals aufgetragen. Um einen möglichst äquidistanten Abstand zwischen den Punkten zu erlangen, wurden nahe beieinander liegende Punkte als Mittelwert dargestellt, so dass kein Bereich überproportional in der Anpassung dargestellt und somit eine zuverlässigere Anpassung der Funktion erhalten wird (Abbildung 25).

Bei einem S/N-Verhältnis größer als 60 beträgt die Standardabweichung der Integrationsflächen weniger als 5 %. Mit diesem Wert ist eine ausreichende Genauigkeit der zu bestimmenden Flächenanteile erreicht [Günther 1992, Berger und Braun 2004]. Für S/N-Verhältnisse kleiner als 10 ist die Standardabweichung größer als 10 %. Die Signale der NMR-Spektren mit einem S/N-Verhältnis kleiner als 10 wurden nicht zur quantitativen Auswertung herangezogen. Dies trifft besonders auf die aromatischen Signale in EPS- und Biofilm-Spektren zu.

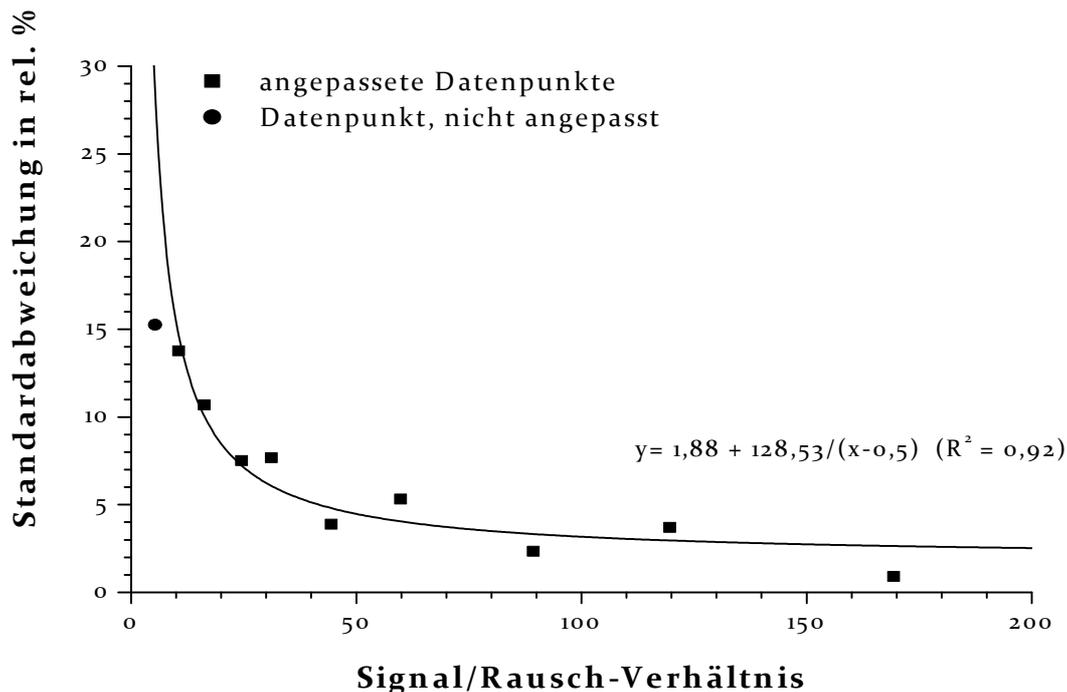


Abbildung 25: Relative Standardabweichung der Integrale in Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses.

4.1.2. NMR-Untersuchung von EPS-Modell-Substanzen

Biofilme und deren EPS bestehen hauptsächlich aus Proteinen und Kohlenhydraten [Liu und Fang 2003, Wingender et al. 1999]. Daher wurden strukturellen chemischen Gruppen dieser Substanzen Signalintensitäten in ^{13}C CPMAS NMR-Spektren zugeordnet und mit berechneten Intensitäten basierend auf deren Strukturformeln verglichen. Die Ergebnisse stellen die Grundlage für eine Quantifizierung von Proteinen und Kohlenhydraten in Biofilmen und EPS dar.

4.1.2.1. Kohlenhydrate

Kohlenhydrate haben die allgemeine Formel $[\text{C}_x(\text{H}_2\text{O})_y]$ und bestehen aus Monosacchariden, die durch glykosidische Bindungen miteinander verknüpft sind. Im ^{13}C NMR-Spektrum der Kohlenhydrate treten überwiegend Signale im O-Alkyl-C-Bereich (60 bis 110 ppm) auf, die zum Teil stark überlappen. Das Spektrum des Kohlenhydrats Pullulan ist in Abbildung 26 dargestellt. Eine Dekonvolution, d. h. eine Anpassung von mehreren Funktionen an das Spektrum, wurde durchgeführt. Dazu wurde das Spektrum mit vier Gaußkurven angepasst ($R^2 > 0,92$) und die Flächenintensitäten bestimmt. Zusätzlich ist ein Strukturmodell von Pullulan dargestellt, um die Zuordnung der Signale zu den verschiedenen C-Atomen zu verdeutlichen.

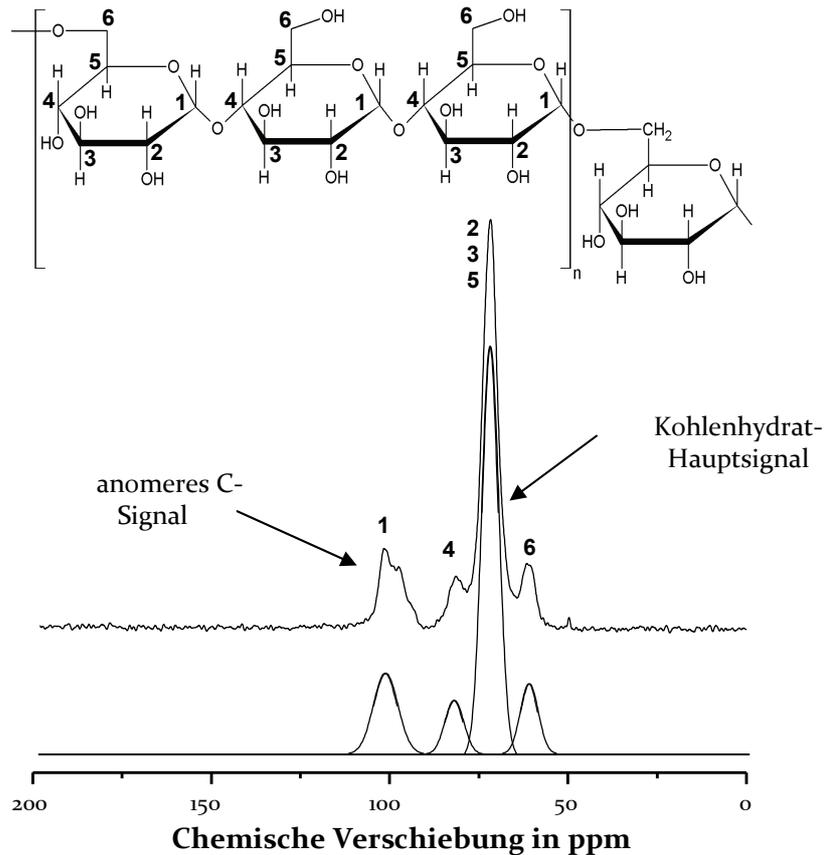


Abbildung 26: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum von Pullulan (oben) und vier an das Spektrum angepasste Gauß-Kurven (unten).

Das Signal im Bereich 90 bis 110 ppm stellt das anomere C-Atom dar und die Signale im Bereich 60 bis 90 ppm die übrigen Ring-C-Atome mit doppelter C-Substitution. Das Signal bei 73 ppm ist das Kohlenhydrat-Hauptsignal der drei Ring-C-Atome C2, C3 und C5. Die Signale bei 65 und 80 ppm werden durch die Ring-C-Atome C4 und C6 verursacht. Innerhalb der Maltotriose-Einheit sind die Monosaccharide über 1,4-glykosidische Bindungen verknüpft, während die einzelnen Maltotriose-Einheiten über 1,6-glykosidische Bindungen verknüpft sind. Daher ist die Intensität der C4- und C6-Atome im Vergleich zum anomeren C-Atom geringer.

Die Flächenintensitäten der Gaußkurven stimmen gut mit basierend auf der Strukturformel berechneten Intensitäten überein (Tabelle 16). Die Berechnung der Intensitäten basiert dabei auf der Zuordnung der verschiedenen C-Atome in Abhängigkeit derer chemischen Umgebung zu den verschiedenen chemischen Verschiebungsbereichen.

Tabelle 16: Integrale und Regressionskoeffizient der an das ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum von Pullulan angepassten Gaußkurven und basierend auf der Strukturformel berechnete Integralwerte der Signale.

	Chemische Verschiebung in ppm			
	100	82	72	62
Gemessene Integralintensität [%]	18	10	60	11
Regressionskoeffizient R^2	0,92	0,97	0,99	0,98
Berechnete Integralintensität [%]	17	11	61	11

Bei anderen Bindungsformen und der Anwesenheit substituierter Monosaccharide (z. B. mit Carboxyl-Gruppen) können die chemischen Verschiebungswerte für Kohlenhydrate variieren (Abbildung 27).

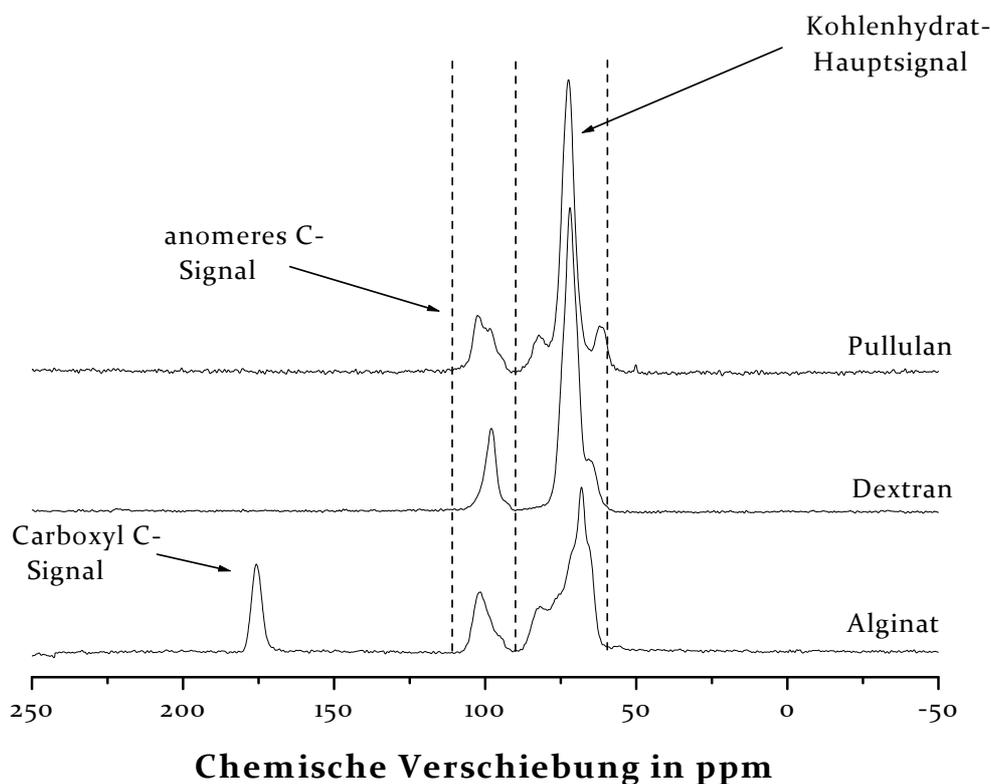


Abbildung 27: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Polysaccharide Pullulan, Dextran und Alginate.

Obwohl Pullulan und Dextran Homoglykane aus Glukose sind, stellen sich aufgrund des molekularen Aufbaus verschiedene Signalintensitäten im O-Alkyl-Bereich zwischen 60 und 90 ppm ein.

Pullulan ist ein langkettiges Molekül mit einheitlicher, periodischer Struktur. Im Gegensatz dazu stellt Dextran ein stark verzweigtes Molekül dar, in dem benachbarte Glukosemoleküle

über 1,6- und 1,4- und seltener auch über 1,3- und 1,2-glykosidische Bindungen verknüpft sind. Der heterogenere Aufbau führt zu stärkeren Überlagerungen der einzelnen Signale, was sich in einem breiteren Signal bei 73 ppm und der Signalschulter bei 65 ppm widerspiegelt.

Das Spektrum von Alginat weist neben den Signalen im O-Alkyl-Bereich ein Signal bei 170 ppm auf, das durch die Carboxyl-Gruppe der Uronsäure-Monomere α -L-Guluronsäure und β -D-Mannuronsäure verursacht wird. Die Monomere sind 1,4-glykosidisch in wechselndem Verhältnis zu linearen Ketten verbunden, was zu einem Signal bei 65 ppm, verursacht durch das C4-Atom, führt.

Neben den dargestellten funktionellen Gruppen können Kohlenhydrate, wie z. B. Chitin und Murein aus Zellwandstrukturen, zusätzlich N-Acetyl-Gruppen enthalten (siehe Abbildung 62, Anhang B). Hier ergeben sich zusätzliche Signale in Verschiebungsbereichen von proteinogenen Strukturen, wie im späteren Verlauf der Arbeit (Kapitel 4.2.2) diskutiert wird.

Tabelle 17: Vergleich der mittels ^{13}C CPMAS NMR-Spektren und auf Basis von Strukturmodellen berechneten Intensitäten in %.

Probe		Relative Intensität in %		
		Amid/ Carboxyl-C	O-Alkyl anomerer C	O-Alkyl Haupt-KH-C
		200-160 ppm	110-90 ppm	90-60 ppm
Pullulan	Gemessene Intensität [%]	--	18	84
	Berechnete Intensität [%]	--	17	83
Dextran	Gemessene Intensität [%]	--	17	83
	Berechnete Intensität [%]	--	17	83
Alginat	Gemessene Intensität [%]	16	16	68
	Berechnete Intensität [%]	17	17	67

Die Intensitätsverteilungen der NMR-Spektren stimmen gut mit den berechneten Anteilen basierend auf den Strukturmodellen der Kohlenhydrate überein (Tabelle 17). Unabhängig von der spezifischen molekularen Struktur konnte für alle Hexosen das theoretische Verhältnis anomeres C/Rest-KH-C von 0,20 verifiziert werden (0,21 für Pullulan, 0,20 für Dextran, 0,19 für Alginat).

Die quantitative Abschätzung von Kohlenhydraten kann bei ausreichendem S/N-Verhältnis über die Integration des anomeren C durchgeführt werden. Es wird das Strukturmodell von Hexosen zu Grunde gelegt, wobei sich ein theoretisches Verhältnis von fünf C-Atomen zwischen 60 und 90 ppm pro anomeren C ergibt. Bei einem S/N-Verhältnis des anomeren C-Signals von kleiner als 10 wird eine Integration des gesamten O-Alkyl-Bereichs durchgeführt.

Die Anwesenheit von anderen funktionellen Gruppen, wie z. B. Carboxyl-Gruppen aus Uronsäuren, wird bei der Auswertung nicht berücksichtigt. In anderen Studien wurde lediglich ein kleiner Anteil von Uronsäuren in EPS im Bereich von 1 bis 3 % analysiert [Frølund et al. 1996, Leppard et al. 2003], so dass der auftretende Fehler gering ist. Auch die Anwesenheit von Peptidoglykanen, wie z. B. Murein, in den EPS ist aufgrund der Lokalität in den Zellwänden als unwahrscheinlich zu betrachten.

Bei den zu untersuchenden EPS-Proben ergaben sich gute Übereinstimmungen für die beiden Auswertungsmethoden (siehe Tabelle 53, Anhang D). Dies verifiziert die Auswertung und unterstützt die Annahme, dass ein Großteil der Kohlenhydrate aus Hexosen besteht. Die größten Abweichungen zwischen den Auswertungsmethoden traten bei den Biofilmpuben auf, was auf die Anwesenheit von zellwandspezifischen Kohlenhydraten mit zusätzlichen funktionellen Gruppen zurückzuführen ist (siehe Kapitel 4.2.2).

4.1.2.2. Proteine

Proteine bestehen aus Aminosäuren, die in für jedes Protein spezifischer Menge und Sequenz über Peptidbindungen miteinander verknüpft sind. Spezifische C-Atome der Peptidbindung sind das Amid-C-Atom und das α -C-Atom, die ein konstantes Verhältnis in natürlichen Proteinen aufweisen. Die Seitenketten der Aminosäuren unterscheiden sich dagegen stark in ihrem strukturellen Aufbau. C-Atome liegen in den Seitenketten überwiegend sp^3 -hybridisiert in aliphatischen Strukturen und sp^2 -hybridisiert in Aromaten und Carboxyl-Gruppen vor. Des Weiteren treten N-substituierte und heterozyklische C-Atome in den Aminosäure-Seitenketten auf. Die verschiedenen Strukturen der Aminosäuren resultieren in unterschiedlichen chemischen Verschiebungs-Wechselwirkungen. Daher ist das Intensitätsmuster der ^{13}C CPMAS NMR-Spektren stark von der jeweiligen Aminosäurezusammensetzung abhängig. Tabelle 18 gibt einen Überblick über die chemischen Verschiebungsbereiche der C-Atome der 20 häufigsten Aminosäuren [SDBSweb 2009].

Tabelle 18: Chemische Verschiebungsbereiche der Kohlenstoffatome der 20 häufigsten Aminosäuren [SDBSweb 2009].

Aminosäure	Anzahl von C-Atomen					
	200 - 160 ppm	160 - 110 ppm	110 - 90 ppm	90 - 60 ppm	60 - 45 ppm	45 - 0 ppm
L-Alanin	1				1	1
L-Arginin	1	1			1	3
L-Asparagin	2				1	1
L-Asparaginsäure	2				1	1
L-Cystein	1				1	1
L-Glutamin	2				1	1
L-Glutaminsäure	2				1	2
Glycin	1					1
L-Histidin	1	3			1	1
L-Isoleucin	1				1	4
L-Leucin	1				1	4
L-Lysin	1				1	4
L-Methionin	1				1	3
L-Phenylalanin	1	4			1	1
L-Prolin	1			1	1	2
L-Serin	1			1	1	
L-Threonin	1			1	1	1
L-Tryptophan	1	7	1		1	1
L-Tyrosin	1	4			1	1
L-Valin	1				1	3
Summe	24	19	1	3	19	36

In Abbildung 28 ist exemplarisch das ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum des Proteins BSA und das Strukturmodell einer Peptidkette dargestellt. Charakteristische Signale des α - und des Amid-C sind durch Pfeile gekennzeichnet.

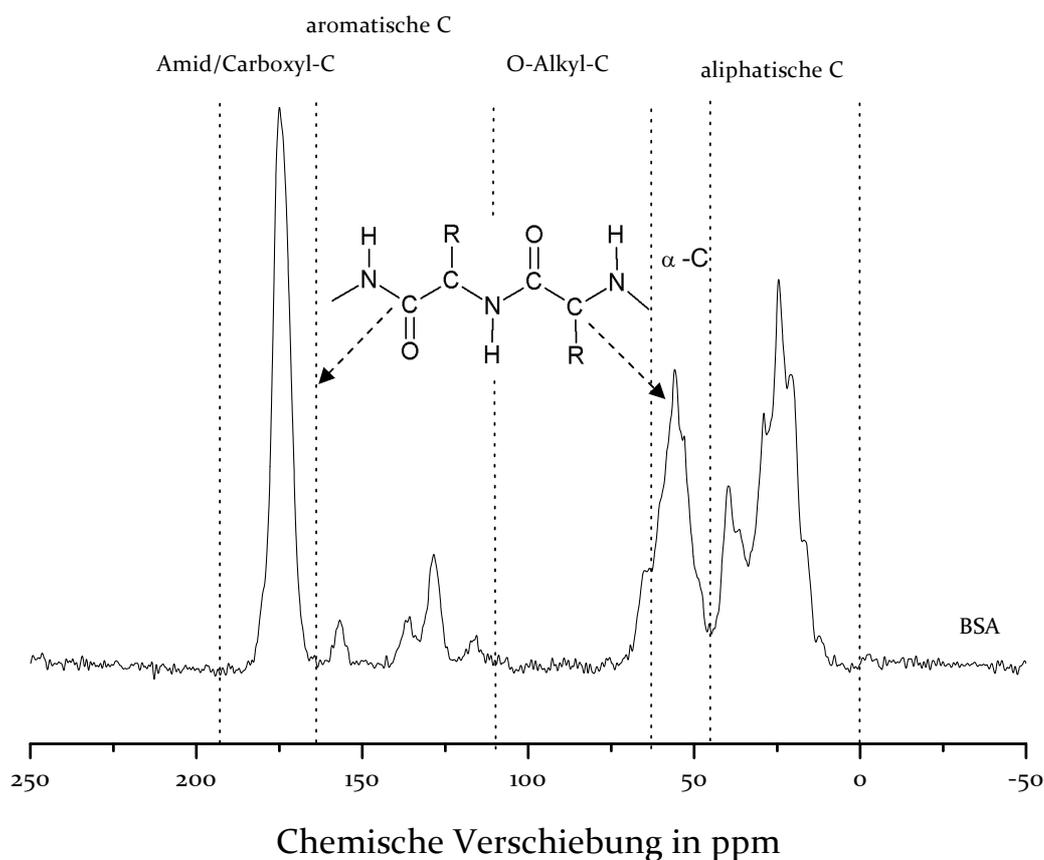


Abbildung 28: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum von BSA und Strukturmodell einer Peptidbindung (Pfeile weisen den C-Atomen die korrespondierenden Signale zu).

Das Signal der Amid-C-Atome liegt im chemischen Verschiebungsbereich von 160 bis 190 ppm und überlagert das deutlich kleinere Signal der Carboxyl-C-Atome der Aminosäuren Glutamin, Glutaminsäure, Asparagin und Asparaginsäure (siehe Tabelle 18). Das korrespondierende Signal der α -C-Atome liegt im Bereich zwischen 45 und 60 ppm und überlappt mit dem Signal der Seitenketten-C-Atome von Threonin (-COHC-), Prolin (-CHHN-) und Serin (-CHOH-), das die Signalschulter bei 65 ppm darstellt. Seitenketten-C-Atome von Alkyl-C-Strukturen stellen den größten Anteil und somit die größte Signalintensität im aliphatischen Verschiebungsbereich (0 bis 45 ppm) dar. Geringere Intensitäten treten im aromatischen Verschiebungsbereich (110 bis 160 ppm) auf, verursacht durch die vier Aminosäuren Histidin, Phenylalanin, Tryptophan und Tyrosin. Dabei sind die Signale im chemischen Verschiebungsbereich von 140 bis 160 ppm O- bzw. N-substituierten C-Atomen und die Signale im Bereich von 110 bis 140 ppm H- bzw. C-substituierten C-Atomen zuzuordnen.

Anhand der Aminosäureverteilung von BSA (Tabelle 52, Anhang C) und der Intensitätsverteilung aus Tabelle 18 wurde ein theoretisches Intensitätsmuster berechnet.

Tabelle 19: Vergleich der mittels ^{13}C CPMAS NMR-Spektroskopie erhaltenen und berechneter Intensitäten anhand der Aminosäureverteilung von BSA.

	Relative Intensität in %					
	200-160 ppm	160-110 ppm	110-90 ppm	90-60 ppm	60-45 ppm	45-0 ppm
Berechnete Intensität [%]	25	9	0	4	20	42
Gemessene Intensität [%]	26	10	1	6	17	40

Die berechneten Intensitäten für BSA stimmen gut mit den gemessenen Intensitäten überein (Tabelle 19). Die größten Abweichungen treten im Bereich von 45 bis 60 ppm auf, welche auf die Auswahl der Integrationsgrenze zurückzuführen sind. Werden die Bereiche 60 bis 90 ppm und 45 bis 60 ppm zusammengefasst, tritt eine gute Übereinstimmung der Intensität auf.

Im Vergleich zu BSA zeigen mikrobielle Proteine einige Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung [Hirayama et al. 1990, Kachlany et al. 2001, Dignac et al. 1998], was durch eigene Messungen bestätigt wurde (Tabelle 50, Anhang C). Während BSA einen größeren Anteil der Aminosäuren Phenylalanin, Histidin, Tryptophan, Arginin, Leucin und Lysin aufweist, haben die untersuchten mikrobiell gebildeten Proteine einen höheren Anteil an Glycin sowie leicht erhöhte Anteile an Alanin, Serin und Threonin. Dies führt zu kleinen Abweichungen bei der Berechnung der Intensitätsmuster in ^{13}C CPMAS NMR-Spektren. In Tabelle 20 sind berechnete Intensitätsmuster für verschiedene Proteine (BSA [Hirayama et al. 1990], Lysozym, Flagellin [Kachlany et al. 2001], Protein EPS Belebtschlamm [Dignac et al. 1998], Protein EPS *P. putida*, Protein EPS *A. pullulans*, Protein EPS MBR UNSW, Protein MBR WM) basierend auf deren Aminosäureverteilung dargestellt.

Tabelle 20: Berechnete chemische Verschiebungsintensitäten anhand der Aminosäureverteilung verschiedener Proteine.

Protein	Relativer Kohlenstoffanteil in %					
	200-160 ppm	160-110 ppm	110-90 ppm	90-60 ppm	60-45 ppm	45-0 ppm
EPS UNSW F-NaOH	31	6	0	5	21	37
EPS WM F-NaOH	30	7	0	5	20	38
EPS P F-NaOH	30	3	0	5	21	41
EPS A F-NaOH	29	7	0	6	21	37
Flagellin	30	5	0	4	21	40
BSA	26	9	0	3	20	42
Lysozym B	27	8	0	3	20	41
EPS Belebtschlamm	26	9	0	3	19	42

Da der Bereich der α -C und O-Alkyl-C-Atome für Proteine und Kohlenhydrate aufgrund starker Überlappungen nicht klar differenziert werden konnte, wurde die Integrationsgrenze zwischen dem O-Alkyl- und dem α -C-Bereich auf 65 ppm gelegt. Dies lässt eine quantitative Bestimmung von Kohlenhydraten und Proteinen in EPS zu, wie im folgenden Kapitel erläutert wird. Aufbauend auf den berechneten Intensitätsmustern ergeben sich folgende Anteile der verschiedenen proteinogenen Strukturen, die zur Quantifizierung von Proteinen anhand von ^{13}C CPMAS NMR-Spektren verwendet werden:

$$\alpha\text{-C} = 25 \% \pm 2$$

$$\text{Amid/Carboxyl-C} = 29 \% \pm 2$$

$$\text{Aliphaten-C} = 39 \% \pm 2$$

Daraus ergeben sich folgende Verhältnisse zwischen den einzelnen Signalintensitäten:

$$\text{Amid-C}/\alpha\text{-C} = 1,2 \pm 0,04$$

$$\text{Aliphaten-C}/\text{Amid-C} = 1,4 \pm 0,16$$

$$\text{Aliphaten-C}/\alpha\text{-C} = 1,6 \pm 0,2$$

Die aromatischen Strukturen wurden nicht in das Auswertungsmuster integriert, da sie die niedrigsten Intensitäten und somit in verschiedenen Spektren ein S/N-Verhältnis kleiner als 10 aufweisen. Die quantitative Abschätzung der Protein-Konzentration erfolgt somit über die angegebenen Verhältnisse, wie auch in Tabelle 22 dargestellt wird.

4.1.2.3. Kohlenhydrat-Protein-Gemisch

Die Durchführung der Integration für protein- und kohlenhydratspezifische chemische Verschiebungsbereiche ist problematisch, wenn Signalgruppen von Proteinen und Kohlenhydraten überlappen und die Breite der Signale stark variiert. Davon betroffen ist der chemische Verschiebungsbereich zwischen 60 und 70 ppm in dem sowohl Signalintensitäten der O-Alkyl-C-Atome mit doppelter C-Substitution von Kohlenhydraten als auch Signale der proteinogenen α -C-Atome sowie der Seitenketten-C-Atome von Prolin, Serin und Threonin auftreten.

Im Folgenden werden zwei Fälle mit verschiedenen Anteilen von Proteinen und Kohlenhydraten am Beispiel von BSA und Dextran diskutiert.

Tabelle 21: Integrale der chemischen Verschiebungsbereiche verschiedener BSA/Dextran-Mischungen (bezogen auf C-Gehalt von BSA und Dextran).

BSA/Dextran-Mischungsverhältnis	Relativer Kohlenstoffanteil in %					
	200-160 ppm	160-110 ppm	110-90 ppm	90-65 ppm	65-45 ppm	45-0 ppm
Fall 1: 75/25	19,5	6,7	4,5	21,5	18,6	28,7
Fall 2: 45/55	12,9	4,7	9,0	42,0	13,3	17,0

Fall 1: BSA/Dextran (75/25)

Wie aus der Literatur [Liu und Fang 2003] sowie aus Ergebnissen der Arbeit hervorgeht, sind Proteine die dominierenden EPS. Die Konzentration der beiden Substanzen wurde daher an ein typisches Konzentrationsverhältnis in EPS angepasst (BSA 75 %, Dextran 25 %, bezogen auf C). In Abbildung 29 ist das ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum des BSA/Dextran-Gemischs (75/25) dargestellt. Die Problematik der Integration von überlappenden Signalen unterschiedlicher Breite und Intensität ist anhand des Beispiels gut zu erkennen. In etwa 6 % der C-Atome von BSA (α -C- und O-Alkyl-C-Atome der Seitenketten) geben ein Signal im O-Alkyl-Bereich (45 bis 60 ppm). Dies führt zu einer Überschätzung des Kohlenhydrat-Hauptsignals bei einer Integrationsgrenze von 60 ppm. Daher wurde die Integrationsgrenze zwischen dem O-Alkyl-Bereich und dem α -C-Bereich auf 65 ppm angepasst. Bei dieser Integrationsgrenze überlappen 5 bis 7 % der Kohlenhydrat-Signale der untersuchten Kohlenhydrate (Pullulan, Dextran, Alginat) mit dem α -C-Signal der Proteine und etwa 2 bis 3 % der Protein-Signale mit dem O-Alkyl-Bereich. Bei einem deutlich größeren Anteil von Proteinen um den Faktor 2 bis 3 gleichen sich die Signalüberlappungen daher annähernd aus. In Abbildung 29 haben die Überlappungsbereiche von Kohlenhydraten und Proteinen annähernd die gleiche Intensität (1,6 für Kohlenhydrate und 1,3 für Proteine). Eine Berechnung der Kohlenhydrate kann in diesem Fall sowohl durch Multiplikation des anomeren C als auch durch Addition der O-Alkyl-Bereiche (O-Alkyl-C + anomeres C) durchgeführt werden.

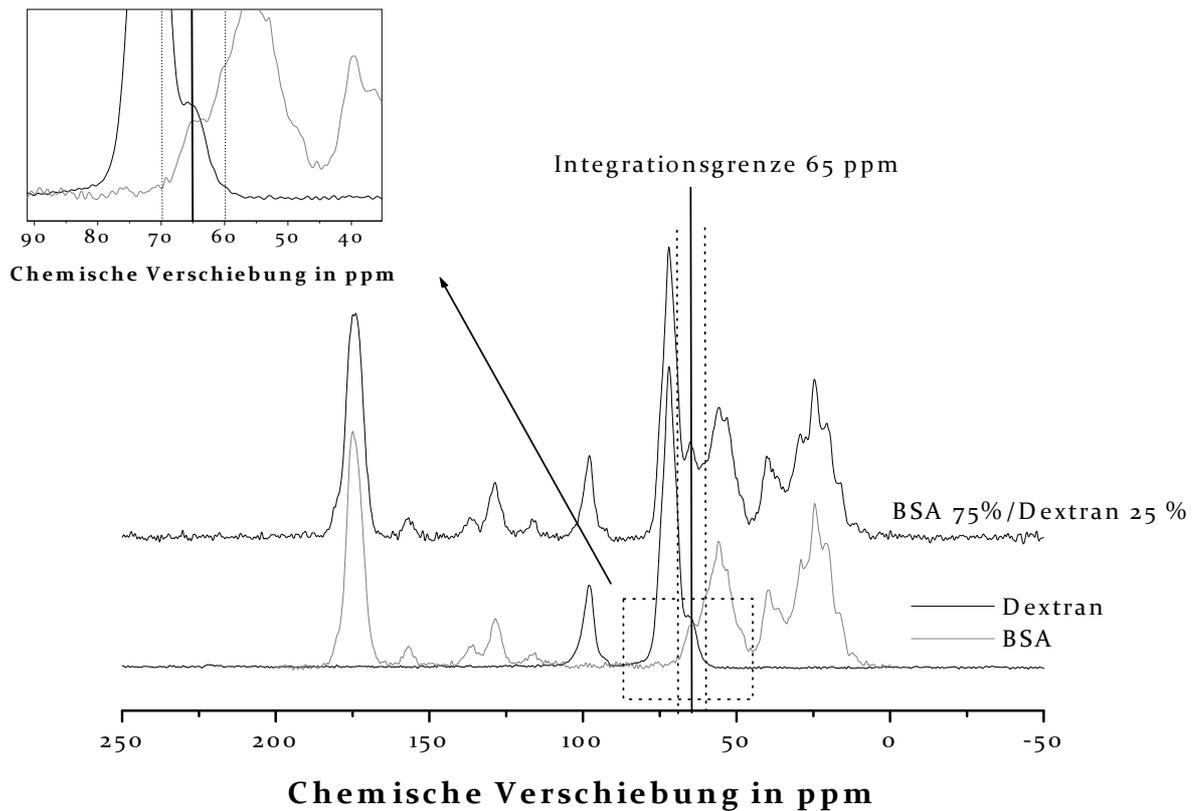


Abbildung 29: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum eines Kohlenhydrat/Protein-Gemischs (75 % BSA, 25 % Dextran, bezogen auf C-Anteil).

Fall 2: BSA/Dextran (45/55)

Bei Anwesenheit ähnlicher Anteile von Kohlenhydraten und Proteinen wird die Intensität des α -C-Bereichs bei einer Integrationsgrenze von 65 ppm aufgrund der Überlappung mit dem Kohlenhydrat-Signal deutlich überschätzt (Abbildung 30). Im Gegensatz dazu zeigt der O-Alkyl-Bereich eine zu geringe Intensität. In diesem Fall lassen sich Kohlenhydrate nur über das anomere C berechnen, während die Summe der O-Alkyl-Bereiche zu geringe Werte liefert. Der Protein-Gehalt lässt sich ausgehend vom Amid- und den aliphatischen C-Signalen berechnen. In der vorliegenden Arbeit kam es nur in vereinzelten Fällen zu einer ähnlichen Konzentrationsverteilung zwischen Kohlenhydraten und Proteinen, so dass die Integrationsgrenze von 65 ppm beibehalten wurde.

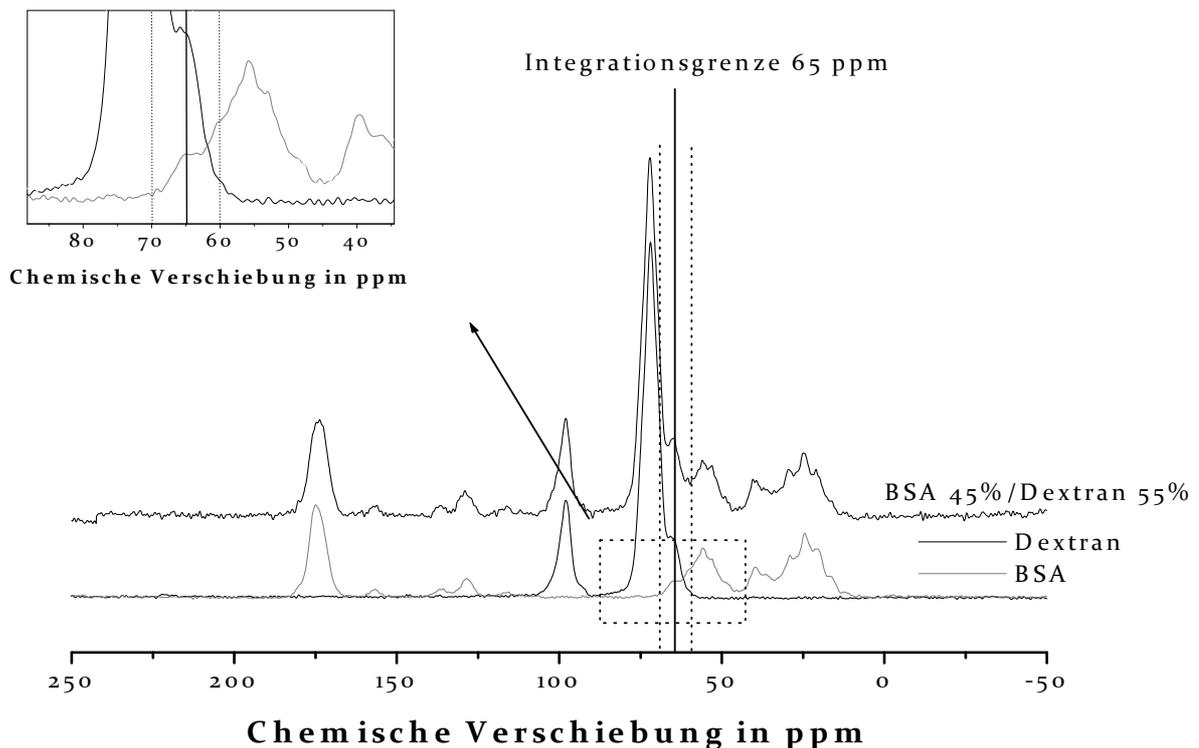


Abbildung 30: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum eines Kohlenhydrat/Protein-Gemischs (45 % BSA, 55 % Dextran, bezogen auf C-Anteil).

4.1.2.4. Nukleinsäuren und Lipide

Nukleinsäuren und Lipide stellen nur einen geringen Teil der organischen Substanz in EPS dar. In verschiedenen Studien wurden zwischen 1 und 3 % Fettsäuren [Al-Halbouni et al. 2009, Dignac et al. 1998] analysiert. Zur Analyse von Nukleinsäuren wurde das Modell von DNA zu Grunde gelegt, während die Struktur von RNA nicht differenziert betrachtet wurde. Der Anteil an DNA ist in der überwiegenden Anzahl der Studien zwischen 0,1 und 0,4 % DNA [Liu und Fang 2002, Liu und Fang 2003, Comte et al. 2006], während in einzelnen Studien höhere DNA-Konzentrationen zwischen 0,5 und 5,5 % analysiert wurden [Guibaud et al. 2005].

DNA besteht aus Desoxyribose, Phosphorsäure und vier verschiedenen Basen; zwei Purinbasen (Adenin und Guanin) und zwei Pyrimidinbasen (Cytosin und Thymin). Jeweils eine Base, eine Desoxyribose-Einheit und Phosphorsäure bilden ein Nukleotid, die zu langen Nukleinsäuren verknüpft sind. Sowohl die Basen als auch Desoxyribose geben Signale im ^{13}C NMR-Spektrum, die sich klar zuordnen lassen (Abbildung 31).

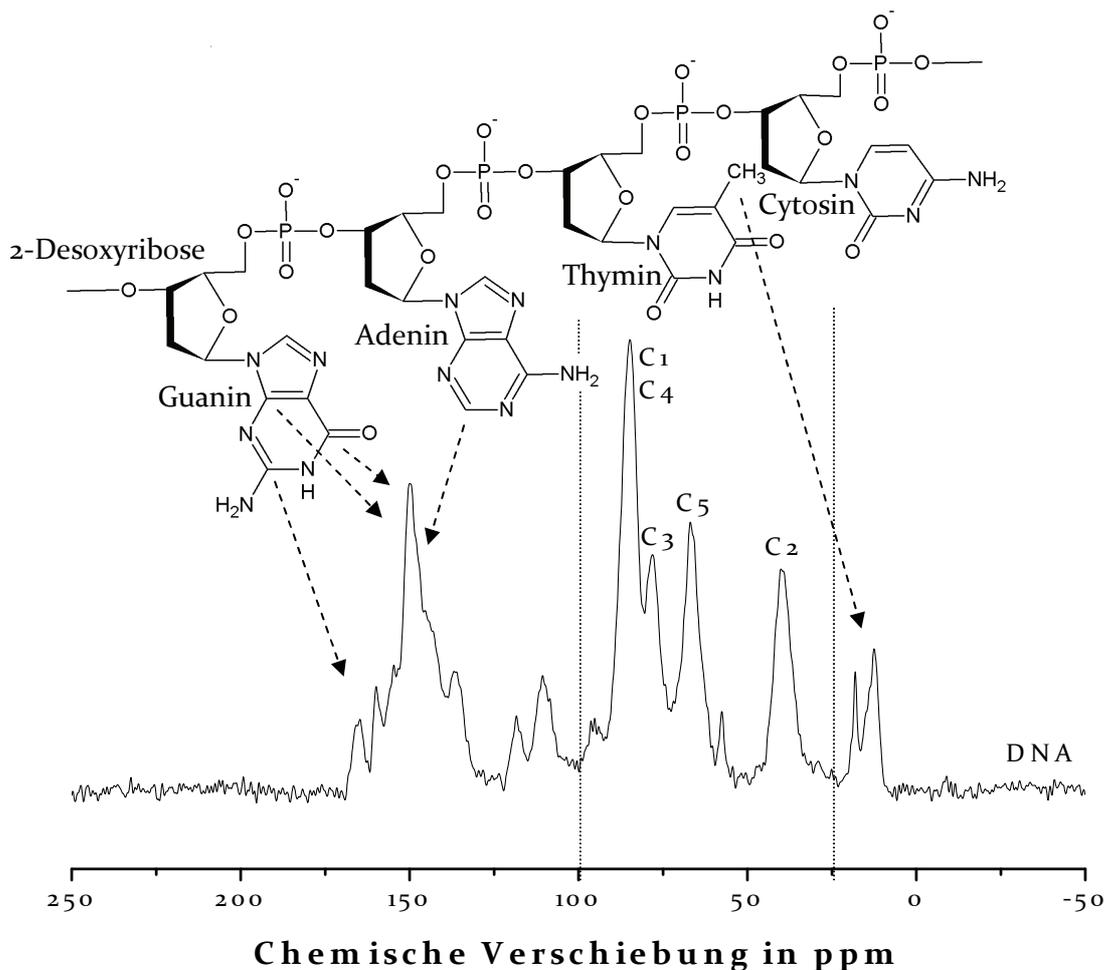


Abbildung 31: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum von DNA und Strukturmodell von DNA (Pfeile weisen den C-Atomen die korrespondierenden Signale zu).

Die Signale zwischen 25 und 100 ppm können dem Desoxyribose-Rückgrat der DNA zugeordnet werden. Dabei stellt das Signal bei 85 ppm das Kohlenhydrat-Hauptsignal der C1 und C4-Atome dar. Die Signale bei 77, 66 und 40 ppm stammen von den C-Atomen C3, C5 und C2. Die Signale zwischen 100 bis 175 ppm basieren auf den Purin- und Pyrimidinbasen der DNA und die Signale im aliphatischen Bereich (< 25 ppm) auf der CH_3 -Gruppe der Pyrimidinbase Thymin. Das Hauptsignal im aromatischen Bereich bei 150 ppm stammt von zweifach N-, und den O-/N-substituierten C-Atomen, die 40 % des Kohlenstoffs der Basen ausmachen.

Da sowohl Desoxyribose als auch drei der vier Basen fünf C-Atome enthalten, sollten die Signalintensitäten der chemischen Verschiebungsbereiche von Desoxyribose und den Basen annähernd gleich sein. Das leicht erhöhte Intensitätsverhältnis von 55 zu 45 % ist auf die Pyrimidinbase Cytosin, die nur 4 C-Atome enthält, zurückzuführen. In Tabelle 21 sind die Signalintensitäten der verschiedenen Nukleotide angegeben.

Die Abschätzung des DNA-Gehalts in EPS-Proben ist schwierig, da die Signale sowohl mit aromatischen und aliphatischen Signalen der Aminosäure-Seitenketten als auch mit Kohlenhydrat-Signalen überlappen. Daher kann lediglich ein maximaler Gehalt ausgehend von den Signalen im aromatischen Bereich (140 bis 155 ppm) abgeschätzt werden, die in etwa 20 % der Signalintensität von DNA ausmachen und wenige Überlappungen mit den Signalen von Kohlenhydraten und Proteinen aufweisen.

Tabelle 21: Chemische Verschiebungsbereiche der DNA-Komponenten.

DNA-Komponente	Relativer Kohlenstoffanteil in %					
	200-160 ppm	160-110 ppm	110-90 ppm	90-65 ppm	65-45 ppm	45-0 ppm
Adenin-Desoxyribose	0	50	10	30	0	10
Thymin- Desoxyribose	10	30	10	30	0	20
Cytosin- Desoxyribose	11	33	11	33	0	11
Guanin- Desoxyribose	10	40	10	30	0	10
DNA	8	38	10	31	0	13

Reine Lipidproben wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht, da sie aufgrund ihrer viskosen bis flüssigen Struktur der ^{13}C Festkörper-NMR-Messmethode nicht zugänglich sind. Die chemischen Verschiebungsbereiche wurden daher anhand von Literaturdaten erhoben. Lipide treten in Mikroorganismen überwiegend als Phospholipide oder als Lipopolysaccharide auf. Der hydrophobe Rest tritt gesättigt oder ungesättigt auf und besteht aus n-Alkan-Strukturen. Die gesättigten n-Alkan-Strukturen geben je nach Länge und Verzweigungsgrad spezifische Signale im aliphatischen Bereich des NMR-Spektrums zwischen 45 und 20 ppm, während die terminalen Methyl-Gruppen Signale zwischen 20 und 15 ppm geben [Kögel-Knaber 2002]. Ein maximaler Gehalt langkettiger gesättigter Lipide lässt sich über die Dekonvolution des Signals bei 30 ppm durch eine Gaußkurve abschätzen. Ungesättigte Fettsäuren geben ein Signal bei etwa 130 ppm [Mao et al. 2007] und überlagern mit aromatischen Signalen, wie z. B. aus Aminosäure-Seitenketten, was deren Quantifizierung erschwert.

Für die beiden Substanzklassen Nukleinsäuren und Lipide wurde jeweils ein Indikatorsignal eingeführt. Für Nukleinsäuren liegt dieses bei 150 ppm und für Lipide bei 30 ppm. Sind diese Signale deutlich in den EPS- und Biofilmspektren vorhanden, ist das bei der Auswertung und der Diskussion der Ergebnisse zu berücksichtigen.

4.1.2.5. Berechnung der EPS-Zusammensetzung

Die einzelnen Signale im ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum lassen sich bis auf wenige Überlappungsbereiche eindeutig verschiedenen biologischen Makromolekülen zuordnen. Eine quantitative Bestimmung von Proteinen und Kohlenhydraten sowie maximaler Anteile an DNA und langkettigen n-Alkan-Strukturen kann nach folgendem Schema aus Tabelle 23 durchgeführt werden.

Tabelle 22: Theoretische Vorgaben zur quantitativen Interpretation der NMR-Daten von Biofilmen und EPS (Eine Zuordnung der Signale I₁-I₆ findet sich auch in Tabelle 13).

Biologische Struktur	Charakteristische NMR Signale	Berechnung	Bemerkung
Kohlenhydrate	anomeres C (I ₃) O-Alkyl-C (I ₄)		Basierend auf Strukturmodell Hexose
		$6 * I_3$	wenn $(S/N)I_3 > 10$
		$I_3 + I_4$	wenn $(S/N)I_3 < 10$
Proteine	Amid/Carboxyl-C (I ₁) Aromaten (I ₂) α -C (I ₅) Aliphaten (I _{6b})		Basierend auf berechneten Intensitätsmustern verschiedener Proteine
		$I_1 + I_2 + I_5 + I_{6b}$	wenn $I_1 = I_5 * 1,2$ $I_5 = I_{6b} / 1,6$ $I_{6b} = I_1 * 1,4$
		$I_5 \geq I_{5\alpha C} = I_{6b} / 1,6$	α -C basierend auf aliphatischen C
		$I_5 \geq I_{5\alpha C} = I_1 / 1,2$	α -C basierend auf Amid-C
		$I_{6b} = I_6 - I_{6a}$	
Lipide	Aliphaten (I _{6a})		Basierend auf langkettigen n-Alkanen
		$I_{6a} = \text{Dekonvolution von Signal}$ 30 ppm	Basierend auf Indikatorsignal bei 30 ppm
DNA	Aromaten (I ₂) anomeres C (I ₃) O-Alkyl-C (I ₄) Aliphaten (I ₆)		Basierend auf Indikatorsignal zwischen 140 und 155 ppm
		$I_{2a} = \text{Integral 140-155 ppm}$	
		$I_{2a} * 5$	

4.1.3. (NMR)-Untersuchung von Modell-Biofilmen

Unter Laborbedingungen gezüchtete Reinkultur-Biofilme eignen sich als Untersuchungssysteme, da sie überwiegend aus mikrobiell gebildeten Strukturen bestehen und keine aus der Umwelt sorbierten Substanzen, wie z. B. Huminstoffe, oder größere Mengen an anorganischen Stoffen enthalten. Die Reinkultur-Biofilme der prokaryotischen Spezies *P. putida* und der eukaryotischen Spezies *A. pullulans* wurden unter definierten Bedingungen gezüchtet, gefriergetrocknet und mittels ^{13}C CPMAS NMR-Spektroskopie untersucht.

4.1.3.1. Biofilm Anzucht

Der *P. putida* Biofilm wurde auf *Pseudomonas* Isolierungsagar gezüchtet. Innerhalb von 24 h entwickelte sich ein konfluenter, hautartiger Biofilm auf dem Agar. Der Biofilm (ca. 0,4 g) ließ sich leicht mit einem Metallspatel vom Agar lösen, so dass Verschleppungen des Agars ausgeschlossen werden konnten.

Der *A. pullulans* Biofilm wurde unter zwei verschiedenen Bedingungen gezüchtet. Dabei wurden die längeren Generationszeiten von Eukaryonten im Vergleich zu Prokaryonten berücksichtigt. Zum einen wurde der *A. pullulans* Biofilm in einem durchströmten Festbettreaktor gezüchtet. Umfangreiche Studien zum Monitoring des Wachstums mittels Magnet Resonanz Tomographie im Festbettreaktor sind in der Literatur beschrieben [Metzger et al. 2006]. Nach anfänglicher lag-Phase konnte eine exponentielle Wachstumsphase beobachtet werden. Der Biofilm wurde dem System in der anschließenden stationären Phase entnommen und für die Optimierung der NMR-Parameter (vgl. Kapitel 1.1) verwendet. Das Biofilmwachstum und dessen Zusammensetzung waren stark von den Strömungsbedingungen im Festbettreaktor abhängig, so dass sich der Biofilm nicht einwandfrei reproduzieren ließ. Für die vergleichenden Extraktionsstudien wurde der Biofilm daher im Erlenmeyerkolben unter reproduzierbaren Bedingungen gezüchtet. Nach fünf Tagen konnte ein zusammenhängender Biofilm (ca. 3,5 g) entnommen werden.

Tabelle 23: Trockenmasse(TM), Aschegehalt und elementare Zusammensetzung von Modell-Biofilmen.

Parameter	<i>A. pullulans</i>		<i>P. putida</i>
	Erlenmeyerkolben	Festbettreaktor	
Trockenmasse [%]	3,3 ± 0,3	8,0 ± 0,5	14,9 ± 0,5
Aschegehalt [% TM]	5 ± 0,1	4,1 ± 0,1	6,3 ± 0,3
C [%]	44,2	--	44,9
N [%]	8,7	--	9,0

Im Vergleich zum *P. putida* Biofilm (14,9 % (w/w)) wiesen die *A. pullulans* Biofilme eine geringere Trockenmasse von 3,4 bis 8,0 % (w/w) auf, was auf eine ausgeprägtere Hydratisierung, hervorgerufen durch die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen und EPS-Zusammensetzungen, hinweist. Sowohl der C-Gehalt von etwa 45 % (w/w) als auch der Aschegehalt beider Biofilme zwischen 4 und 6 % (w/w) deuten auf einen hohen Anteil organischer Substanz hin. Die Proben eignen sich daher besonders für den Einsatz als Modell-Biofilme bei NMR-Messungen. Für die Extraktionsversuche wurden die Biofilm-Ausbeuten mehrerer Agarplatten und/oder Erlenmeyerkolben kombiniert.

4.1.3.2. Zusammensetzung von Modell-Biofilmen

Die ^{13}C CPMAS NMR-Spektren besitzen eine gute Auflösung und ein hohes S/N-Verhältnis (Tabelle 52, Anhang D). Die Spektren der Biofilmproben (Abbildung 32) zeigen eine heterogene Verteilung der Signalintensitäten. Die an den Modell-Substanzen beschriebenen Signalmuster finden sich in unterschiedlicher Ausprägung wieder und sind eindeutig zuzuordnen.

Alle Biofilm-Spektren zeigen hohe Signalintensitäten im chemischen Verschiebungsbereich zwischen 160 und 190 ppm, die vor allem auf Amid-C-Atomen und zu kleineren Anteilen auf Carboxyl-C-Atomen basieren. Korrespondierende Signale von α -C-Atomen der Peptidbindung sind im Bereich von 45 bis 60 ppm gut aufgelöst zu erkennen. Die Signale im chemischen Verschiebungsbereich der Aromaten von 110 bis 160 ppm stammen überwiegend von aromatischen Aminosäure-Seitenketten-C-Atomen. Zusätzlich sind kleine Intensitäten verschiedener sp^2 -hybridisierter C-Atome aus Purin- und Pyrimidin-Gruppen von DNA wahrscheinlich. Große Anteile von DNA in den Biofilmen können aufgrund der geringen Intensitäten des Indikatorsignals bei 150 ppm ausgeschlossen werden. Ausgehend vom DNA-Indikatorsignal kann ein maximaler DNA-Gehalt von ca. 5 % berechnet werden. Aufgrund von Überlappungen kann jedoch davon ausgegangen werden, dass dadurch der DNA-Gehalt zu hoch eingeschätzt ist. Von einer DNA-Quantifizierung ist daher im weiteren Verlauf der Arbeit abgesehen worden.

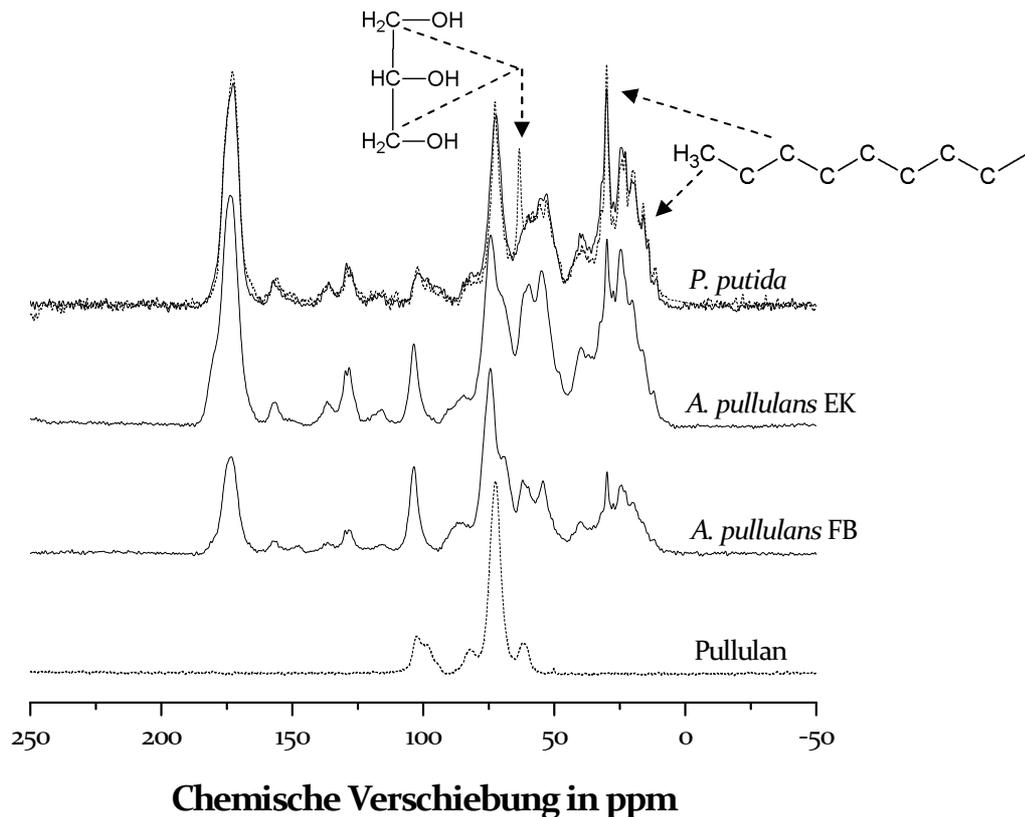


Abbildung 32: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren von Biofilm *A. pullulans* gezüchtet in Erlenmeyerkolben (EK) und im Festbettreaktor (FB), Biofilm *P. putida* sowie das Spektrum von Pullulan (Die Biofilm-Spektren wurden auf die gleiche Intensität des Kohlenhydrat-Hauptsignals bei 74 ppm skaliert).

Signale im chemischen Verschiebungsbereich der O-Alkyl-C-Atome (60 bis 110 ppm) werden den Kohlenhydrat-Strukturen zugeordnet. Zum Vergleich ist das Spektrum von Pullulan dargestellt, welches von *A. pullulans* als extrazelluläres Kohlenhydrat je nach Umgebungsbedingungen in unterschiedlichen Mengen synthetisiert wird [Lee et al. 2001, Seo et al. 2004, Gibson und Coughlin 2002]. Im Festbettreaktor bildet der Pilz eine deutlich größere Menge an Pullulan als im Erlenmeyerkolben, so dass sich die spezifischen Signale von Pullulan besonders im Spektrum *A. pullulans* FB in guter Auflösung wiederfinden. Die Pullulan-Produktion des Pilzes ist stark abhängig von der Sauerstoffkonzentration und die auf den Organismus wirkenden Scherkräfte [Roukas und Mantzouridou 2001, Gibbs und Seviour 1998], welche im Festbettreaktor stärker ausgeprägt sind. Dies führt zu einem Kohlenhydrat-C-Gehalt im Biofilm *A. pullulans* FB von ca. 41 % und im Biofilm *A. pullulans* EK von ca. 24 %.

Der Kohlenhydrat-C-Gehalt im *P. putida* Biofilm ist mit 20 % geringer. Im Kohlenhydratbereich tritt ein zusätzliches Signal bei 63 ppm auf (gestrichelt dargestellt), welches der Kohlenstoffquelle Glycerin (C1 und C3) des Nähragars zugeordnet werden kann. Ein weiteres

Signal vom C2-Atom des Glycerins bei 78 ppm [Mayer et al. 2001] überlagert mit dem Kohlenstoff-Hauptsignal. Während der Wachstumsphase ist Glycerin aus dem Agar in den Biofilm diffundiert. Durch Homogenisieren des Biofilms in 0,14 M NaCl-Lösung wird es aufgrund seiner guten Wasserlöslichkeit jedoch entfernt, so dass keine Verunreinigungen der EPS während der Extraktion auftreten.

Im Bereich der aliphatischen Strukturen von 0 bis 45 ppm überlappen verschiedene Signale. Dennoch sind einzelne Signale gut aufgelöst und lassen sich spezifischen Strukturen zuordnen. Im chemischen Verschiebungsbereich von 45 bis 20 ppm treten überwiegend Methylen(CH₂)- und Methin(CH)-Gruppen aus Amino- und Fettsäuren auf und im Bereich kleiner 20 ppm Methyl(CH₃)-Gruppen-Signale. Der Hauptanteil kann den aliphatischen Seitenketten-Strukturen von Aminosäuren zugeschrieben werden [Mao et al. 2007].

Sowohl im prokaryotischen (*P. putida*) als auch im eukaryotischen (*A. pullulans*) Biofilm-Spektrum tritt das Indikatorsignal der Lipide bei 30 ppm deutlich hervor. Der mikrobielle Ursprung der langkettigen CH₂-Strukturen liegt in Bausteinen der Membranen und bakteriellen Zellwände. Das Signal ist im bakteriellen Biofilm stärker ausgeprägt als im eukaryotischen Biofilm, was auf den unterschiedlichen Aufbau prokaryotischer und eukaryotischer Zellen bzw. deren Zellwände zurückzuführen ist. Zusätzlich ist der Anteil von Zellwänden bezogen auf die Zellmasse in prokaryotischen Biofilmen aufgrund der kleineren Zellgröße höher als in eukaryotischen Biofilmen. Daher sind auch die Signale bei 19 und 14 ppm bei *P. putida* stärker ausgeprägt, welche auf terminalen C-Atomen in Methyl-Gruppen langkettiger Fettsäuren basieren. Neben dem Signal bei 30 ppm ist das Signal bei 23 ppm in allen Proben gut aufgelöst, welches von Methylen-Gruppen überwiegend aus verzweigten Aminosäure-Seitenketten-C-Atomen stammt. Nach Golchin et al. (1996) liegen bei hoher Intensität des Signals bei 23 ppm im Vergleich zum Signal bei 30 ppm die Mehrheit der Alkyl-C-Atome in verzweigten oder kurzen Fettsäuren vor. Dies ist bei der Biofilmprobe *A. pullulans* EK der Fall.

Der Gehalt an n-Alkan-Strukturen lässt sich durch Dekonvolution mit einer Gaußkurve bei 30 ppm auf maximal 4 % für *P. putida* und 3 % für *A. pullulans* abschätzen.

Das Intensitätsmuster des Biofilms *P. putida* zeigt einen deutlich höheren Protein- und einen niedrigeren Kohlenhydrat-Gehalt. Anhand des Schemas aus Tabelle 22 lässt sich ein maximaler Protein-Anteil von 68 % und Kohlenhydrat-Anteil von 20 % berechnen. Dies ist konform zu der Studie von Jahn et al. (1998), die eine Akkumulation von Proteinen in der Biofilm-Matrix feststellten. Für *A. pullulans* lassen sich je nach Umgebungsbedingungen ein maximaler Kohlenhydrat-Gehalt von 24 und 41 % sowie ein Protein-Gehalt von 64 und 48 % berechnen. Die im weiteren Verlauf der Arbeit zur Extraktion von EPS verwendeten Biofilme bestehen somit hauptsächlich aus Protein- und zu einem kleineren Anteil aus Kohlenhydrat-Strukturen.

4.1.4. Zusammenfassung und Ausblick

In diesem Kapitel wurden die optimalen Bedingungen für die quantitative Analyse von Biopolymeren in Biofilmen mittels ^{13}C CPMAS NMR-Spektroskopie bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass es mit der angewendeten ^{13}C CPMAS NMR-Methode möglich ist, Biofilm-Komponenten ohne vorherige Isotopen-Anreicherung zu quantifizieren.

Die $T_{1\text{H}}$ -Zeit ist stark von der Umgebung der Biopolymere abhängig. Liegt das Biopolymer als Reinsubstanz vor, erhöhen sich die $T_{1\text{H}}$ -Zeiten signifikant. Treten Wechselwirkungen mit paramagnetischen Ionen in der direkten Umgebung auf, wird die $T_{1\text{H}}$ -Zeit verkürzt. Ausgehend von einer $T_{1\text{H}}$ -Zeit von 1 s wurden die Experimente mit einem Impulsabstand von 6 s durchgeführt, um Sättigungseffekte zu verhindern. Die Kontaktzeit wurde auf 2500 μs festgelegt. Bei dieser Kontaktzeit ist eine quantitative Erfassung der C-Atome aller chemischen Verschiebungsbereiche möglich.

Gegenüber der DP-Methode bietet die CP-Methode den Vorteil eines größeren S/N-Verhältnisses bei gleicher Versuchszeit und somit einer höheren Genauigkeit. Der Nachteil besteht darin, dass die Parameter auf die verwendeten Proben angepasst und die Richtigkeit der Spektren überprüft werden muss. Eine quantitative Auswertung der Spektren ist ab einem S/N-Verhältnis von größer als 10 sinnvoll: es ergibt sich eine Standardabweichung bei der Signalintegration von kleiner als 10 %.

Kohlenhydrate und Proteine unterscheiden sich deutlich in ihrem chemischen Aufbau und somit in ihren Intensitätsmustern der NMR-Spektren. Anhand der Intensitäten spezifischer Verschiebungsbereiche und deren Intensitätsverhältnisse lassen sich die Spektren auswerten und Kohlenhydrate und Proteine quantifizieren. Nukleinsäuren und Lipide liegen zu deutlich geringeren Anteilen vor und liefern Indikatorsignale in den NMR-Spektren, die eine Abschätzung deren Gehalte ermöglichen.

Biofilme zeigen in Abhängigkeit der Aufzuchtbedingungen und der Mikroorganismen deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung. Sowohl für das Bakterium *P. putida* als auch für den Pilz *A. pullulans* wurden definierte Wachstumsbedingungen etabliert, die es ermöglichen einen reproduzierbaren Biofilm für Extraktionsversuche zu erhalten.

Die Ergebnisse liefern eine gute Grundlage für die Auswertung der Spektren komplexerer Systeme, wie sie in Biofilmen aus MBR vorliegen. Aufgrund einer möglichen Anlagerung organischer Substanzen aus der Umwelt und einer heterogenen Mikroorganismen-Population ist hier von heterogeneren Spektren auszugehen, die eine aufwendigere Auswertung verlangen.

4.2. EPS(-Extraktion) aus Modell-Biofilmen

Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) werden mit verschiedenen Extraktionsmethoden von Biofilmen isoliert, um deren Zusammensetzung zu charakterisieren. Dabei ist eine Verunreinigung der EPS durch die verwendeten Extraktionshilfsmittel zu vermeiden. Eine optimale Extraktionsmethode ermöglicht große EPS-Ausbeuten bei minimaler Zelllyse [Wingender et al. 1999]. Die Untersuchungen dieses Kapitels sollten klären, welchen Einfluss verschiedene Extraktionsmethoden auf die Ausbeute und die strukturelle Zusammensetzung von EPS aus Reinkultur-Biofilmen haben. Dazu wurden EPS aus Reinkultur-Biofilmen von *P. putida* (P) und *A. pullulans* (A) mit verschiedenen Extraktionsmethoden isoliert. Die Zusammensetzung wurde mit der in Kapitel 1 beschriebenen ^{13}C CPMAS NMR-Methode, einer Elementanalyse von C und N sowie mit biochemischen Verfahren zur Protein- und Kohlenhydrat-Bestimmung untersucht. Die Ergebnisse liefern detaillierte Informationen über die Effektivität verschiedener Extraktionsmethoden (Ultrazentrifugation, Kationenaustauscher, F-NaOH, EDTA, Hitze) und einer selektiven Anreicherung von EPS-Bestandteilen durch die einzelnen Methoden.

4.2.1. EPS-Ausbeuten und Zellaufschluss

Bei der Extraktion von EPS findet ein Übergang der EPS vom festen (gebundenen) in den gelösten Zustand statt. Ungelöste Anteile, wie z. B. Zellbruchstücke, werden durch Filtration (0,45 μm) entfernt. Niedermolekulare gelöste Substanzen, wie z. B. Peptide, Oligosaccharide und Mineralstoffe aus dem Nährmedium sowie niedermolekulare Extraktionshilfsmittel (NaOH, Formaldehyd, EDTA), werden mittels Dialyse aus den Proben entfernt. Zur weiteren Analyse und zur gravimetrischen Ausbeute-Bestimmung werden die EPS-Proben gefriergetrocknet. Zellaufschluss in Folge der Extraktion wird anhand der Aktivität des Cytoplasma-Enzyms Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) bestimmt [Platt et al. 1985].

Tabelle 24: EPS-Ausbeuten (n=3) für *P. putida* und *A. pullulans* Biofilme für verschiedene Extraktionsmethoden in Massenprozent der Biofilm-Trockenmasse und Nachweis des Cytoplasma-Enzyms G6PDH.

Extraktionsmethode	<i>A. pullulans</i>		<i>P. putida</i>	
	[%]	G6PDH	[%]	G6PDH
Ultrazentrifugation (UZ)	16,6 ± 1,9	+	5,8 ± 0,9	+
Formaldehyd-NaOH (F-NaOH)	25,8 ± 4,0	-	16,9 ± 1,3	-
EDTA	(31,5 ± 1,1)*	+	(14,4 ± 2,0)*	-
Kationenaustauscher (CER)	11,5 ± 4,5	-	8,8 ± 0,7	-
Thermisch/Hitze	n.a.	n.a.	11,4 ± 0,5	-

n.a. = nicht analysiert, (*) = in Kapitel 4.2.2.3 diskutiert

Die EPS-Ausbeuten der verschiedenen Extraktionsverfahren sowie der beiden untersuchten Biofilme *P. putida* und *A. pullulans* unterscheiden sich deutlich (Tabelle 24). Für *P. putida* werden im Vergleich zu *A. pullulans* niedrigere EPS-Ausbeuten erzielt. Die F-NaOH- und die EDTA-Methode weisen für beide Biofilme die größten Ausbeuten auf, was auch für andere Reinkultur-Biofilme [Sheng et al. 2005, Tapia et al. 2009] und heterogenere Belebtschlammproben [Liu und Fang 2002, Auguilera et al. 2008] festgestellt wurde. Die Ausbeuten der EDTA-Methode sind in Klammern dargestellt, da Verunreinigungen mit EDTA festgestellt werden konnten. Die Ergebnisse werden in Kapitel 4.2.2.3 diskutiert.

Wingender et al. (1999) führen die hohen Ausbeuten der F-NaOH-Methode auf die Dissoziation von sauren Gruppen bei steigendem pH-Wert zurück. Die daraus resultierende Abstoßung negativ geladener EPS führt zu erhöhter Wasserlöslichkeit und somit zu hohen Extraktionsausbeuten. Im Gegensatz dazu werden durch den Einsatz von Kationenaustauscher und EDTA Kationen gebunden und somit Vernetzungen zwischen EPS gelockert, was deren Wasserlöslichkeit erhöht [Wingender et al. 1999]. Für die CER-Methode führt das zu vergleichsweise niedrigen Ausbeuten.

In der Probe EPS A EDTA konnte G6PDH nachgewiesen werden (Tabelle 24). Die Zellwand von *A. pullulans* ist somit nach den vorliegenden Ergebnissen im Vergleich zu *P. putida* anfälliger gegenüber zelllytischen Chemikalien, wie EDTA. Durch hohe Zentrifugalkräfte und die resultierenden Scherkräfte kommt es auch bei dem UZ-Verfahren bei vergleichsweise niedrigen EPS-Ausbeuten bei beiden Organismen zu Zellwandbeschädigungen basierend auf dem Nachweis mit G6PDH (Tabelle 24).

Die Hitze-Methode wurde ausschließlich am bakteriellen Biofilm angewendet und zeichnet sich durch hohe EPS-Ausbeuten aus, was in Übereinstimmung mit anderen Untersuchungen an Reinkultur- und Belebtschlammproben ist [Sheng et al. 2005, Bura et al., 1998, Brown und Lester 1980]. Nach Comte et al. (2006) wird die Biofilmstruktur durch den thermischen Energieeintrag zerstört, was den Übergang der EPS in die wässrige, gelöste Phase unterstützt. Der Einsatz von G6PDH stellt bei der F-NaOH- und der Hitze-Methode kein geeignetes Verfahren dar, um Informationen auf einen Zellaufschluss zu bekommen. Das Enzym ist nur bei pH-Werten zwischen pH 6 und 9 aktiv [Mc Swain et al. 2005] und wird somit durch die Anwesenheit von NaOH hemmend beeinflusst. Auch im Rahmen der thermischen Extraktion kann von einer Denaturierung des Enzyms ausgegangen werden.

4.2.2. Zusammensetzung der EPS aus Modell-Biofilmen

Bei den extrahierten EPS aus den Reinkultur-Biofilmen handelt es sich ausschließlich um Material mikrobiellen Ursprungs. Daher stellen sie ein geeignetes Modell-System dar, um die in Kapitel 1 etablierte NMR-Methode an komplexen biologischen Systemen anzuwenden und

die Ergebnisse mit den aus konventionellen Analyseverfahren gewonnenen Ergebnissen zu vergleichen. Die Ergebnisse der EPS-Zusammensetzung der EDTA-Methode werden in Kapitel 4.2.2.3 diskutiert, da mittels der NMR-Methode Verunreinigungen der EPS festgestellt werden konnten.

4.2.2.1. Elementaranalytische Untersuchungen der EPS

Die dialysierten EPS-Proben der Reinkultur-Biofilme haben einen C-Gehalt zwischen 35 und 43 % (w/w) und weisen wie die Biofilmprouben einen hohen Anteil organischer Materie und einen kleinen Aschegehalt auf. Im Gegensatz dazu wurden in EPS aus Reinkultur-Biofilmen bei Vernachlässigung des Dialyseschlrittes niedrigere C-Gehalte zwischen 15 und 26 % gefunden [Guibaud et al. 2005], was auf die Anwesenheit großer Mengen anorganischer Komponenten hinweist und die Notwendigkeit des Dialyseschlrittes für nachfolgende Analysen verdeutlicht. Der N-Gehalt der Proben zwischen 9 und 11 % (w/w) führt zu hohen N/C-Verhältnissen und deutet auf einen hohen Anteil proteinogener Substanzen hin.

Tabelle 25: Elementaranalytische Daten der Biofilm- und EPS-Proben von *P. putida* und *A. pullulans*.

Probe	Massenanteil in %		Elementverhältnis N/C (mol/mol)
	N	C	
Biofilm <i>P. putida</i>	9,0	44,9	0,17
EPS P F-NaOH	10,6	38,6	0,24
EPS P CER	9,9	38,6	0,22
EPS P UZ	11,0	38,0	0,25
EPS P Hitze	10,8	43,1	0,21
EPS P EDTA	(8,9)	(35,2)	(0,22)
Biofilm <i>A. pullulans</i>	8,7	44,2	0,17
EPS A F-NaOH	9,0	41,0	0,19
EPS A CER	9,9	41,4	0,21
EPS A UZ	9,7	39,1	0,21
EPS A EDTA	(9,1)	(37,6)	(0,21)

() = in Kapitel 4.2.2.3 diskutiert

EPS-Proben haben einen niedrigeren C-Gehalt und einen höheren N-Gehalt als die Biofilmprouben, was auf eine Anreicherung proteinogener Substanzen in den EPS deutet. In den bakteriellen EPS sind deutliche Unterschiede im N/C-Verhältnis zwischen den Proben festzustellen, was eine selektive EPS-Anreicherung mittels der verschiedenen Verfahren widerspiegelt. Der größte C-Gehalt wurde mit der Hitze-Methode bei *P. putida* erhalten. Die eukaryotischen EPS weisen einen höheren C-Gehalt und ein niedrigeres N/C-Verhältnis als

die entsprechenden prokaryotischen Proben auf. Dies lässt auf einen größeren Anteil proteinogener Substanzen oder weiterer N-haltiger Substanzen in den prokaryotischen EPS und auf eine selektive Anreicherung mittels verschiedener Extraktionsmethoden schließen.

4.2.2.2. ^{13}C NMR-spektroskopische Charakterisierung der EPS

Die hohen C-Gehalte der Proben erlauben die Aufnahme von gut aufgelösten ^{13}C NMR-Spektren, so dass die Spektren zuverlässige Informationen über die den Proben zuzuordnenden chemischen Strukturen liefern. Die meisten Signale der NMR-Spektren haben ein hohes S/N-Verhältnis zwischen 30 und 120 (Tabelle 52, Anhang D). Dies erlaubt eine Abschätzung der maximalen Kohlenhydrat- und Protein-Gehalte nach Tabelle 22. Die Integrationsdaten der NMR-Spektren sind in Tabelle 26 angegeben, die berechneten maximalen Kohlenhydrat- und Protein-Gehalte in Tabelle 27.

Tabelle 26: Integrationsdaten der Spektren von *P. putida* und *A. pullulans* Biofilm- und EPS-Proben.

Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %						
	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆	I _{6a}
	200-160 ppm	160-110 ppm	110-90 ppm	90-65 ppm	65-45 ppm	45-0 ppm	31-29 ppm
BF <i>P. putida</i>	19,3	5,8	3,7	17,9	17,4	35,7	4,4
EPS P F-NaOH	22,0	4,2	3,7	18,2	20,8	31,0	2,8
EPS P CER	24,2	1,3	2,8	16,6	21,1	33,9	3,5
EPS P UZ	23,9	1,2	2,2	14,0	23,0	35,7	2,8
EPS P Hitze	26,2	2,4	2,8	15,2	19,8	33,6	3,0
EPS P EDTA	(32,8)	(0,6)	(1,4)	(8,9)	(39,1)	(18,4)	(1,8)
BF <i>A. pullulans</i>	17,4	5,6	5,2	17,9	17,7	36,0	3,0
EPS A F-NaOH	21,0	4,2	2,2	14,6	24,3	33,6	3,0
EPS A CER	23,4	2,2	2,3	13,3	23,4	35,1	3,2
EPS A UZ	20,3	5,2	5,4	16,1	19,0	33,9	2,6
EPS A EDTA	(28,6)	(1,5)	(2,9)	(12,9)	(36,0)	(18,0)	(1,5)

() = in Kapitel 4.2.2.3 diskutiert

Tabelle 27: Berechnete Protein-, Kohlenhydrat und n-Alkan-Anteile von *P. putida* und *A. pullulans* Biofilm und EPS.

Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %		
	Protein	Kohlenhydrate	n-Alkan-Strukturen
Biofilm <i>P. putida</i>	72	22	4,4
EPS P F-NaOH	70	22	2,8
EPS P CER	72	17	3,5
EPS P UZ	74	13	2,8
EPS P Hitze	74	17	3,0
EPS P EDTA	(41)	(8)	(1,8)
Biofilm <i>A. pullulans</i>	64	31	3,0
EPS A F-NaOH	76	13	3,0
EPS A CER	75	14	3,2
EPS A UZ	71	21*	2,6
EPS A EDTA	(40)	(18)	(1,5)

* basierend auf O-Alkyl-Bereich; () = in Kapitel 4.2.2.3 diskutiert

Pseudomonas putida

Die ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der gefriergetrockneten Biofilm- und EPS-Proben von *P. putida* sind in Abbildung 33 dargestellt.

Die NMR-Spektren der EPS zeigen ein ähnliches Intensitätsmuster wie das NMR-Spektrum des Biofilms und die charakteristischen Signale für Kohlenhydrate und Proteine. Spezifische Unterschiede zwischen den EPS-Proben und der Biofilmprobe lassen sich durch Differenzspektren darstellen (Abbildung 34). Dazu wird das Biofilm-Spektrum vom jeweiligen EPS-Spektrum abgezogen. Alle Spektren wurden zuvor auf die gleiche Fläche von 100 % skaliert.

Im Vergleich zum Biofilm-Spektrum liegen die von proteinogenen Strukturen stammenden Amid-/Carboxyl-C und α -C-Strukturen in den EPS angereichert vor.

Der höhere Proteinanteil in den EPS wird auch durch die Zunahme des Signals bei 42 ppm ersichtlich. Das Signal lässt sich dem α -C-Signal der Aminosäure Glycin zuordnen [Mao et al. 2007], die zu großen Anteilen in mikrobiellen Proteinen zu finden ist [Kachlany et al. 2001, Dignac et al. 1998] (siehe auch Tabelle 50 und Tabelle 51).

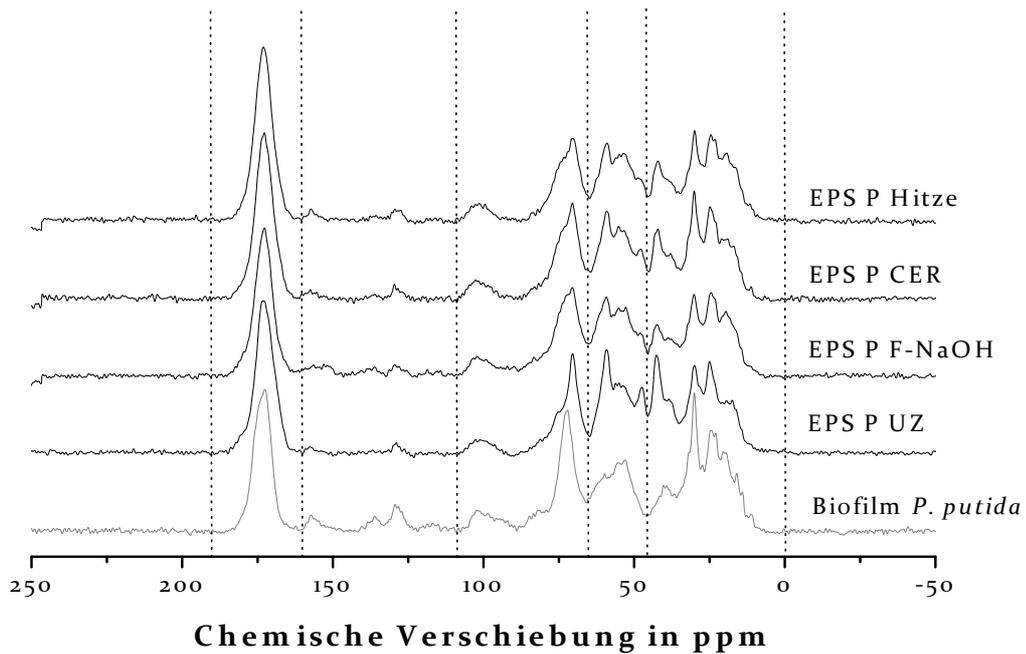


Abbildung 33: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Biofilm- und der verschiedenen EPS-Proben von *P. putida* (Die Flächen der Spektren wurden jeweils auf die gleiche Fläche von 100 % skaliert).

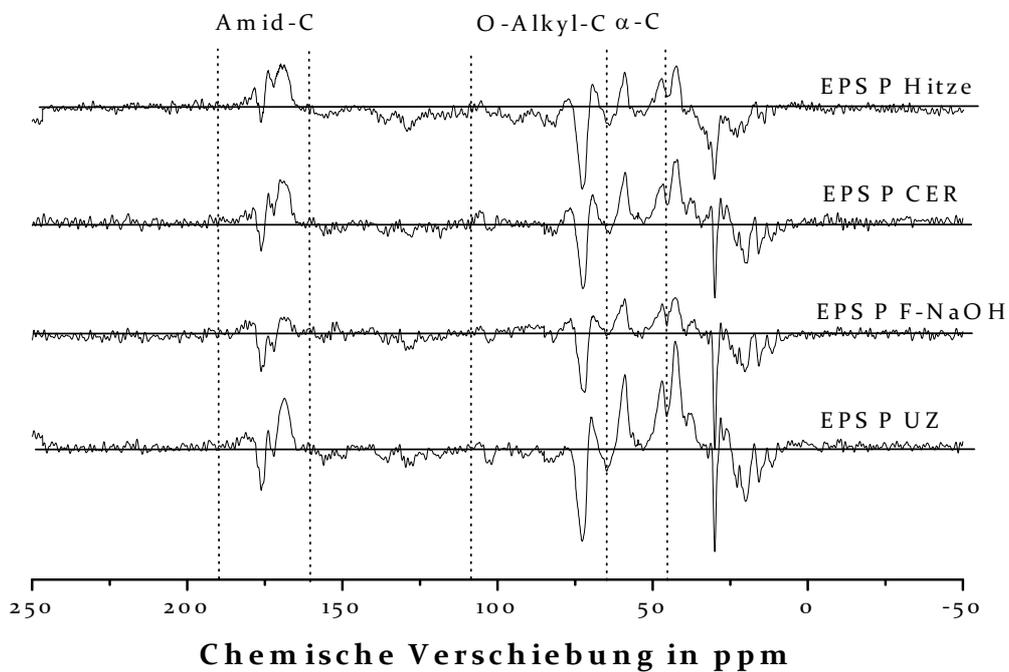


Abbildung 34: ^{13}C CPMAS NMR Differenzspektren. Das Biofilm-Spektrum von *P. putida* wurde von dem jeweiligem EPS-Spektrum abgezogen (Alle Spektren wurden zuvor auf die gleiche Fläche skaliert).

Kohlenhydrat-Signale (O-Alkyl-Bereich) liegen abgereichert vor. Das Signalmaximum in den EPS-Spektren (70 ppm) hat sich gegenüber dem Biofilm-Spektrum (73 ppm) verschoben. Dies resultiert aus einer Überlagerung mehrerer schmaler Signale im Biofilm-Spektrum und einer selektiven Anreicherung spezifischer Kohlenhydrate in den EPS, was sich in einer Schulter im Kohlenhydrat-Hauptsignal der EPS-Spektren widerspiegelt. Kohlenhydrat-Strukturen in mikrobiellen Zellen können Seitenketten, wie z. B. N-Acetyl- und/oder Carboxyl-Gruppen, die z. B. in Murein (Peptidoglykan) oder Chitin vorkommen, enthalten [Jacob et al. 1985]. Die Abreicherung des Signals bei 176 ppm lässt sich somit auch in Zusammenhang mit den Kohlenhydrat-Strukturen bringen. Es kann vermutet werden, dass es sich um Carboxyl-Gruppen aus komplexen Zellwand-Kohlenhydrat-Strukturen handelt. Die Anwesenheit von N-Acetyl-Gruppen in den Kohlenhydraten würde zusätzlich zur Abnahme der Signalintensität im aliphatischen Bereich führen. Aufgrund von Überlagerungen mit aliphatischen Protein-Signalen können diese Signale jedoch nicht identifiziert und somit keine zuverlässigen Aussagen getroffen werden.

Dennoch sind deutliche Intensitätsabreicherungen im Bereich der aliphatischen Signale zu erkennen. Die Abreicherung des Signals bei 30 ppm deutet auf eine effektive Entfernung von langkettigen, gesättigten Fettsäuren aus Zellwandstrukturen mittels der verschiedenen Extraktionsverfahren hin.

Tendenziös kommt es auch zu einer Abreicherung der Signale im aromatischen Verschiebungsbereich. Neben einigen Aminosäure-Gruppen geben ungesättigte Fettsäuren ein Signal bei etwa 130 ppm und heterozyklische C-Atome in DNA ein ausgeprägtes Signal bei 150 ppm. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass sowohl DNA als auch ungesättigte Fettsäure-Strukturen abgereichert werden. Große Mengen an DNA in EPS können somit ausgeschlossen werden, wie bereits in früheren Studien festgestellt wurde [Liu und Fang 2003, Liu und Fang 2002, Guibaud et al. 2005, Comte et al. 2006].

Anhand der Integrationsdaten und des Auswertungsschemas aus Tabelle 22 lassen sich 70 bis 74 % der C-Atome Proteinen zuordnen. Basierend auf der Intensität des anomeren C-Signals wurde ein Kohlenhydrat-C-Gehalt von 13 bis 22 % berechnet. Zum Vergleich wurde der Kohlenhydrat-C-Gehalt anhand des O-Alkyl-C-Bereichs berechnet (16 bis 22 %, (Tabelle 53, Anhang D)). Für alle Proben treten gute Übereinstimmungen auf, was auf einen großen Anteil von Aldosen zurückzuführen ist und auf die Abwesenheit anderer O-Alkyl-Strukturen, wie z. B. aus Polyhydroxyalkanoaten, hindeutet. Der Anteil an n-Alkan-Strukturen wurde durch Integration des Signals bei 30 ppm zwischen 3 und 4 % abgeschätzt. Ähnliche Anteile von langkettigen Fettsäuren (1 bis 3 %) wurden von Al-Halbouni (2008) nach Verseifung und anschließender Lösungsmittelextraktion in EPS analysiert. Die Biofilmprobe weist den größten Anteil an n-Alkan-Strukturen auf, was auf die Anwesenheit von Zellwandstrukturen zurückzuführen ist (Tabelle 27).

Die relative Abnahme von Kohlenhydrat- und aliphatischen Strukturen sowie die relative Zunahme von Proteinen führen zu höheren N/C-Verhältnissen in den EPS im Vergleich zu der Biofilmprobe. Die Probe EPS P UZ weist das größte N/C-Verhältnis auf, was auf die größte relative Proteinanreicherung zurückzuführen ist. Es kann vermutet werden, dass die Proteinanreicherung durch intrazelluläre Proteine hervorgerufen wird, da es im Rahmen der Extraktion zu Zellwandbeschädigungen gekommen ist (siehe Kapitel 4.2.1).

Aureobasidium pullulans

Die ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der gefriergetrockneten Biofilm- und EPS-Proben von *A. pullulans* sind in Abbildung 35 dargestellt, die Differenzspektren zur Verdeutlichung der spezifischen Unterschiede zwischen den EPS-Proben und der Biofilmprobe in Abbildung 36. Mit Ausnahme des Spektrums EPS A UZ weisen die Spektren ausreichend hohe S/N-Verhältnisse (Tabelle 52, Anhang D) für eine quantitative Auswertung auf.

Im Vergleich zu der Biofilmprobe nehmen die Intensitäten der Amid/Carboxyl-Strukturen sowie der $\alpha\text{-C}$ Strukturen in EPS zu, während die aromatischen, aliphatischen und O-Alkyl-Strukturen abnehmen. Die Integrationsdaten weisen somit die gleichen Tendenzen wie die Proben von *P. putida* auf, was auf ähnliche Anreicherungseffekte der verschiedenen Extraktionsmethoden hinweist.

Anhand der Integrationsdaten wurde ein Protein-C-Gehalt zwischen 64 und 74 % und ein Kohlenhydrat-C-Gehalt zwischen 18 und 31 % berechnet (Tabelle 27). Durch Addition der Signalintensitäten der O-Alkyl-Verschiebungsbereiche wurde ein Kohlenhydrat-C-Gehalt zwischen 16 und 23 % berechnet (Tabelle 53, Anhang D). Die größte Abweichung zwischen den beiden Kohlenhydrat-Berechnungen trat für die Biofilmprobe auf. Dies lässt sich auf die Anwesenheit komplexer Zellwandkohlenhydrate zurückführen, die neben O-Alkyl-Signalen weitere Signale im Carboxyl- und im aliphatischen Verschiebungsbereich (O/N-Acetyl-Strukturen) aufweisen. Diese Signale werden bei der Additionsmethode nicht erfasst, was die niedrigeren Konzentrationen durch Addition der O-Alkyl-Bereiche erklärt.

Der Gehalt an n-Alkan-Strukturen der Proben wurde anhand des Signals bei 30 ppm auf etwa 3 bis 4 % geschätzt. Die höhere Signalintensität im Biofilm bei 23 ppm gegenüber 30 ppm deutet darauf hin, dass die Mehrzahl der Alkyl-C-Strukturen in verzweigten oder kurzen Ketten vorliegt [Golchin et al. 1996].

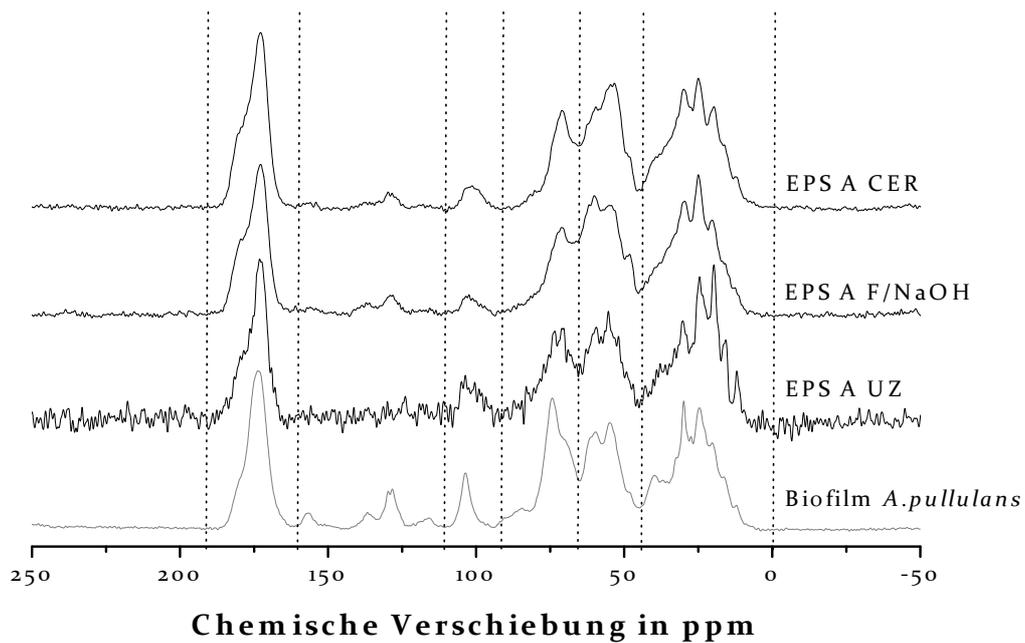


Abbildung 35: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Biofilm- und der verschiedenen EPS-Proben von *A. pullulans* (Die Flächen der Spektren wurden jeweils auf die gleiche Fläche von 100 % skaliert).

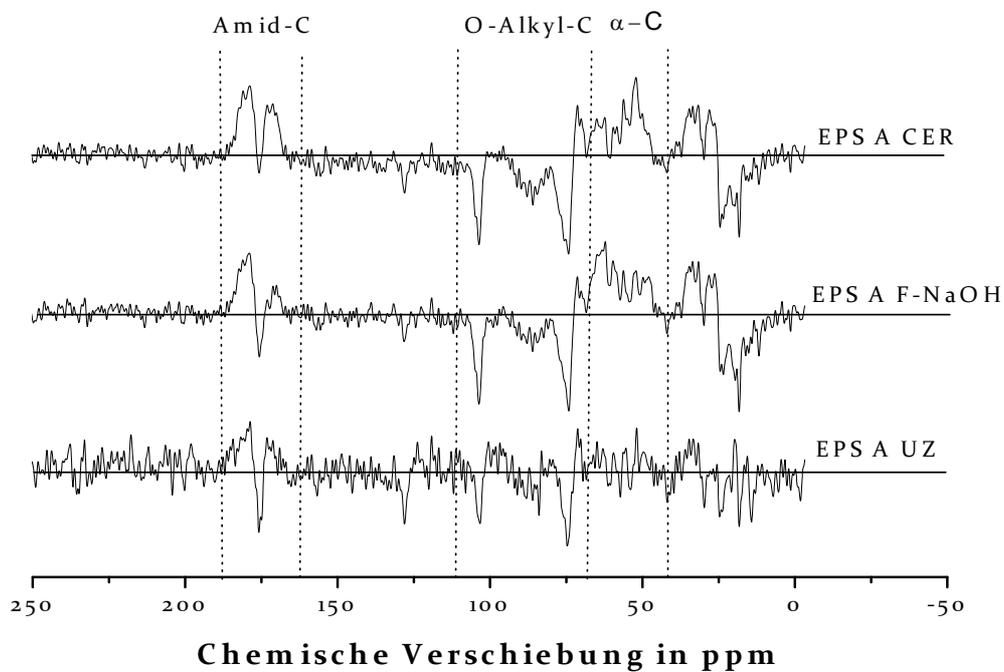


Abbildung 36: ^{13}C CPMAS NMR-Differenzspektren. Das Biofilm Spektrum von *A. pullulans* wurde von dem jeweiligen EPS-Spektrum abgezogen (Alle Spektren wurden auf die gleiche Fläche normiert).

Wie bei den *P. putida* EPS-Proben zeigen die Differenz-Spektren von *A. pullulans* eine relative Zunahme der Protein-Strukturen in EPS, was sich in der relativen Anreicherung des α -C-Signals sowie des Amid-C-Signals widerspiegelt. Bei der Probe EPS A CER ist die Zunahme deutlicher ausgeprägt als bei der Probe EPS A F-NaOH.

In allen Spektren ist eine deutliche Signalschulter im Amid-Signal zu erkennen, die durch die Anwesenheit zwei überlagernder Signale verursacht wird. Die Schulter ist in den EPS-Spektren deutlicher ausgeprägt und weist auf die An- bzw. Abreicherung spezifischer Strukturen hin. Im Gegensatz zu den *P. putida* EPS ist eine deutliche Abreicherung des anomeren C-Atoms (105 ppm) zu erkennen. Es kann davon ausgegangen werden, dass die Abreicherung z. T. auf komplexe Kohlenhydrat-Strukturen mit verschiedenen Seitengruppen zurückzuführen ist, da die Abreicherung des Kohlenhydrat-Hauptsignals nicht das für Aldosen typische Verhältnis von 1:5 aufweist. Die gleichzeitige Abnahme der Signale bei 175, 75 und 20 ppm könnte durch die Abnahme von Murein aus der Zellwand erklärt werden. Im Gegensatz zum Biofilm werden in den EPS-Kohlenhydrat-Strukturen ohne Seitenketten, wie z. B. Pullulan, angereichert.

Im Vergleich zu den bakteriellen EPS-Proben ist keine Verminderung der Signale bei 30 ppm zu erkennen. Wie bereits in Kapitel 4.1.3.2 beschrieben stellen n-Alkan-Strukturen einen kleineren Masseanteil im *A. pullulans* Biofilm als im *P. putida* Biofilm dar. Im Gegensatz dazu weist der *A. pullulans* Biofilm einen größeren Anteil ungesättigter und verzweigter Strukturen auf, was sich in der Abnahme des Signals bei 130 ppm widerspiegelt. Zusätzlich kann die Abreicherung im aliphatischen Bereich bei Signalen kleiner 25 ppm Seitenketten-Methylgruppen aliphatischer Zellwandstrukturen zugeschrieben werden [Kögel-Knaber 2002].

Aufgrund des niedrigen S/N-Verhältnisses der Signale in den Differenzspektren im aromatischen Bereich können keine zuverlässigen Aussagen über An- und Abreicherungen getroffen werden. Anhand der Integrationsdaten lässt sich jedoch eine Tendenz zur Abreicherung erkennen, was auf eine relative Abnahme von DNA und ungesättigter Fettsäuren zurückzuführen sein könnte. Die relative Abnahme der aliphatischen und der O-Alkyl-Strukturen sowie die relative Zunahme der proteinogenen Strukturen haben auch in den EPS von *A. pullulans* ein höheres N/C-Verhältnis gegenüber der Biofilmprobe zur Folge.

4.2.2.3. Charakterisierung der EPS EDTA-Proben

In Abbildung 37 sind die Spektren der EPS EDTA-Proben von *P. putida* und *A. pullulans* sowie ein Strukturmodell von EDTA abgebildet. Die beiden Spektren zeigen ein ähnliches Intensitätsmuster und unterscheiden sich deutlich von den anderen untersuchten EPS-Proben. Die ausgeprägten Signale bei 172, 55 und 51 ppm können dem Extraktionshilfsmittel EDTA zugeordnet werden, wie in Abbildung 37 durch Ziffern (1-3) markiert ist. EDTA wurde von

Comte et al. (2006) in einer ähnlichen EPS EDTA-Probe mittels FTIR-Spektroskopie nachgewiesen; der Anteil konnte jedoch nicht bestimmt werden.

Der EDTA-Anteil in den EPS-Proben lässt sich anhand des Schemas in Tabelle 28 auf mindestens 40 bzw. 46 % für *P. putida* bzw. *A. pullulans* abschätzen. Für eine genaue Quantifizierung ist die Überprüfung der Relaxationszeiten T_{1H} der EDTA-C-Atome notwendig, da es bei den auf die Biofilmproben angepassten Impulsabständen τ zu Sättigungseffekten bei EDTA kommen kann.

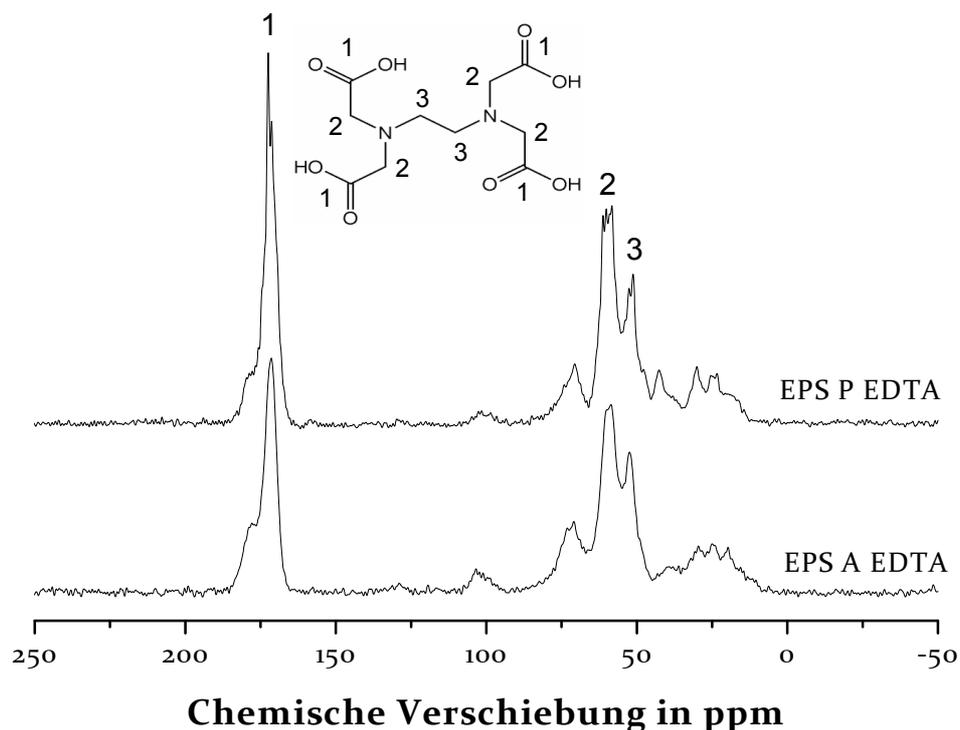


Abbildung 37: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der EPS EDTA-Proben von *P. putida* und *A. pullulans* (skaliert auf die gleiche Fläche) und Strukturmodell von EDTA.

Tabelle 28: Berechnungsschema zur Quantifizierung von EDTA aus ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der EPS EDTA-Proben.

Struktur	Charakteristische NMR Signale	Berechnung	Bemerkung
EDTA	$I_{1 \text{ EDTA}}$ (172 ppm) $I_{5 \text{ EDTA}}$ (55 u. 51 ppm)	$1.5 * I_{5 \text{ EDTA}}$ $I_5 - I_{5\alpha\text{C}} \geq I_{5 \text{ EDTA}}$ $= (I_1 - 1.1 * I_{5\alpha\text{C}}) / 0.67$	EDTA Berechnung basiert auf dem Verhältnis $I_{1 \text{ EDTA}} / I_{5 \text{ EDTA}} = 0.67$ $I_{5\alpha\text{C}} = I_{6b} * 1,6$

Im Vergleich zur EDTA-Extraktionsmethode weist die CER-Methode bis zu 50 % niedrigere Ausbeuten auf, obwohl beide Methoden auf einem ähnlichen Prinzip basieren. Vergleichbare Tendenzen zwischen den Ausbeuten der Verfahren wurden von Aguilera et al. (2008) und Liu und Fang (2002) festgestellt. Liu und Fang (2002) konnten einen Großteil der EPS-Komponenten von 34 bis 39 % aus EPS-EDTA nicht identifizieren und vermuteten Verunreinigungen mit EDTA.

Die NMR-Ergebnisse haben erhebliche Konsequenz für die Beurteilung der Methode. Nach Subtraktion des EDTA-Gehalts werden ähnliche EPS-Ausbeuten wie bei der physikalisch-chemischen CER-Extraktionsmethode festgestellt. EDTA wechselwirkt nicht nur mit den vorhandenen Kationen, sondern auch mit den zu extrahierenden EPS und führt somit zu scheinbar hohen Extraktionsausbeuten in einer Vielzahl von Studien [Sheng et al. 2005, Aguilera et al. 2008, Liu und Fang 2002, Tapia et al. 2009]. Die niedrigen C-Gehalte in den EPS EDTA-Proben im Vergleich zu den anderen EPS-Proben sind auf die Anwesenheit von EDTA mit seinem geringeren C-Gehalt zurückzuführen.

4.2.2.4. Vergleich der ^{13}C NMR-spektroskopischen, elementaranalytischen und biochemischen Ergebnisse

Um einen Vergleich der ^{13}C CPMAS NMR-spektroskopischen Ergebnisse mit elementaranalytischen und biochemischen Ergebnissen zu ermöglichen, wurden die anhand der NMR-Methode ermittelten Kohlenhydrat- und Protein-C-Gehalte in Masse-Konzentrationen umgerechnet. Dazu wurde basierend auf den EPS-Modell-Substanzen ein durchschnittlicher C-Gehalt von 50 % (w/w) für Proteine und 44 % (w/w) für Kohlenhydrate zu Grunde gelegt. Zusätzlich wurde die Protein-Konzentration anhand der N-Gehalte der Proben (Tabelle 25) abgeschätzt, unter Annahme eines N-Gehalts von 16 % (w/w) für Proteine. Die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden sind in Tabelle 29 zusammengestellt.

Pseudomonas putida

Für die *P. putida* Biofilm- und EPS-Proben wurden anhand der C-Gehalte und der NMR-spektroskopischen Daten Protein-Konzentrationen zwischen 54 und 65 % (w/w) bzw. 29 % (w/w) für die EPS P EDTA-Probe berechnet. Die berechneten Protein-Konzentrationen werden durch die hohen N-Gehalte der Proben unterstützt. Mit Ausnahme der Biofilmprobe liegt die Protein-Konzentration für alle Proben unter der basierend auf dem N-Gehalt berechneten maximalen Protein-Konzentration. Die mittels der NMR-Methode überschätzte Protein-Konzentration in der Biofilmprobe kann auf die Anwesenheit von Zellwandkomponenten und intrazellulären Substanzen (DNA, Fettsäuren, etc.) zurückgeführt werden. Die Substanzen wurden durch die Extraktion entfernt, wie in Kapitel 4.2.2.2 beschrieben wird. Durch Anpassung der Integrationsgrenzen auf die einzelnen Proben und Anwendung von Dekonvolutions-Methoden könnte der Fehler minimiert werden.

Tabelle 29: Protein (P)- und Kohlenhydrat (KH)-Gehalt der biochemischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen sowie P/KH-Verhältnisse und auf Grundlage des N-Gehalts abgeschätzte maximale Protein-Gehalte.

Probe	Relativer Anteil in %						
	Biochemisch			NMR			N-Gehalt
	P	KH	P/KH	P	KH	P/KH	P
Biofilm <i>P. putida</i>	48	12	4,0	65	20	3,2	56
EPS P F-NaOH	36	15	2,4	54	19	2,8	66
EPS P CER	43	14	3,1	56	17	3,3	62
EPS P UZ	39	11	3,5	57	14	4,1	69
EPS P Hitze	38	15	2,5	62	18	3,5	68
EPS P EDTA	18	5	3,6	29	8	3,5	56
Biofilm <i>A. pullulans</i>	42	16	2,6	55	23	2,4	54
EPS A F-NaOH	41	19	2,2	62	16	4,0	57
EPS A CER	51	12	4,3	61	15	4,2	62
EPS A UZ	39	14	2,8	(56)	(19)	(2,9)	60
EPS A EDTA	18	9	2,0	30	14	2,2	57

() = aufgrund des niedrigen S/N-Verhältnis der EPS A UZ-Probe werden die Werte nicht diskutiert

Die großen Abweichungen zwischen den Ergebnissen der EPS EDTA-Proben der beiden Untersuchungsmethoden sind auf die Anwesenheit von EDTA (N-Gehalt 10 % (w/w)) zurückzuführen und zeigen deutlich die Schwachstelle der Abschätzung des Protein- anhand des N-Gehalts.

Für Kohlenhydrate lassen sich anhand der Integrationsdaten der NMR-Spektren und des C-Gehalts Konzentrationen von 14 bis 20 % (w/w) bzw. 8 % (w/w) für EPS P EDTA berechnen (Tabelle 29). Die niedrigen Protein- und Kohlenhydrat-Gehalte der EPS P EDTA-Proben beruhen auf der Anwesenheit von EDTA.

Im Vergleich zu den NMR-spektroskopischen Ergebnissen liegen die biochemischen Ergebnisse niedriger. Während die Abweichungen der Kohlenhydrat-Bestimmungen im Bereich von 15 bis 20 % liegen, resultieren für die Protein-Bestimmungen Abweichungen von etwa 30 %. Die Abweichungen zwischen den Untersuchungsmethoden haben verschiedene Ursachen und werden am Ende des Kapitels ausführlich diskutiert.

Sowohl die NMR-spektroskopischen als auch die biochemischen Analysen ergeben ähnliche Protein/Kohlenhydrat-(P/KH)-Verhältnisse der Proben (außer EPS P Hitze) und zeigen die gleichen Tendenzen zwischen den Proben. Die Probe EPS P UZ zeigt jeweils das größte und die Probe EPS P F-NaOH das niedrigste P/KH-Verhältnis, was eine selektive Anreicherung der EPS in Abhängigkeit der Extraktionsmethode zeigt. Im Vergleich zu den biochemischen Ergebnissen liegen die mittels NMR ermittelten P/KH-Verhältnisse (außer EPS EDTA) für

alle Proben höher, da mittels der NMR-spektroskopischen Methode höhere Protein-Konzentrationen erhalten werden.

Aureobasidium pullulans

Für *A. pullulans* werden anhand der C-Gehalte und der NMR-Spektren Protein-Konzentrationen zwischen 55 und 62 % (w/w) und 30 % (w/w) für EPS A EDTA berechnet. Die Protein-Konzentrationen basierend auf dem N-Gehalt der Probe liegen im ähnlichen Bereich (Tabelle 25). Aufgrund des niedrigen S/N-Verhältnisses des Spektrums EPS A UZ kann es zu einer fehlerhaften Auswertung kommen, so dass die Ergebnisse (in Klammern dargestellt) nicht weiter diskutiert werden.

In der EPS A F-NaOH- und der Biofilmprobe wird die Protein-Konzentration mittels der NMR-Methode überschätzt. Die Ergebnisse liegen über den basierend auf dem N-Gehalt abgeschätzten maximalen Protein-Konzentrationen. Durch die Anwesenheit großer Mengen Pullulan und anderer Kohlenhydrate kommt es zu Überlappungen zwischen dem O-Alkyl- und dem α -C-Bereich und zu einer Überschätzung des α -C-Bereichs. Für die *A. pullulans* Proben wurden Kohlenhydrat-Gehalte von 15 bis 23 % (w/w) und 14 % (w/w) für die EPS A EDTA-Probe berechnet.

Die anhand der NMR-Spektren und des N-Gehalts berechneten Protein-Gehalte liegen über den biochemischen Ergebnissen. Gleiches gilt für die Kohlenhydrat-Gehalte mit Ausnahme der F-NaOH-Probe. Wie bei den prokaryotischen Proben lässt sich dies z. T. auf eine eingeschränkte Löslichkeit der gefriergetrockneten EPS-Proben zurückführen.

Ein Vergleich der P/KH-Verhältnisse der biochemischen und der NMR-spektroskopischen Ergebnissen zeigt die gleichen Tendenzen wie bei den Untersuchungen von *P. putida* (Tabelle 29). Die Ergebnisse beider Untersuchungsmethoden zeigen, dass die Probe EPS A F-NaOH das niedrigste und die Probe EPS A CER das höchste P/KH-Verhältnis aufweist. Im Vergleich zu den Proben von *P. putida* weisen die Proben von *A. pullulans* jeweils ein kleineres P/KH-Verhältnis (Ausnahme EPS A CER) für die biochemischen Bestimmungen auf. Im Gegensatz dazu werden anhand der NMR-Spektren höhere P/KH-Verhältnisse berechnet, da mittels der NMR-Auswertungsmethode jeweils maximale Protein-Gehalte berechnet werden und in einzelnen Fällen, wie z. B. bei EPS A F-NaOH, zu hoch liegen können.

Die Unterschiede zwischen den NMR-spektroskopischen und den biochemischen Ergebnissen haben verschiedene Ursachen:

Ein generelles Problem bei der Analyse von gefriergetrockneten organischen Proben stellt deren eingeschränkte Löslichkeit nach der Gefrierdrying dar. Auch für andere organische Proben wurde eine verminderte Löslichkeit nach der Gefrierdrying festgestellt [Lankes et al. 2009]. Anhand von DOC-Bestimmungen nach der Auflösung der Proben und der elementar-analytischen C-Gehalte konnten je nach Probe Verluste zwischen 5 und 20 % des

DOC nach der Wiederauflösung festgestellt werden. Die eingeschränkte Löslichkeit stellt somit nicht die alleinige Ursache für abweichende Ergebnisse dar.

Mit Hilfe der angewendeten Algorithmen wird mittels der NMR-spektroskopischen Methode ein maximaler Protein-Gehalt abgeschätzt. Neben den Proteinen werden sämtliche Aminosäuren und Peptidstrukturen erfasst, die in der Zellwand und in anderen für die biochemische Methode schwer zugänglichen Bereichen lokalisiert sind. Im NMR-Spektrum kann es zur Überlappung von Proteinsignalen mit Signalen anderer Strukturen, wie z. B. DNA und Fettsäuren, kommen [Santos et al. 1989, Mao et al. 2007]. Diese Effekte sind besonders bei den Biofilmproben ausgeprägt. In den EPS wurden größere Mengen an DNA und Zellwandkomponenten ausgeschlossen. Daher können gute Annäherungen des maximalen Protein-Gehaltes mittels der NMR-Methode erzielt werden, was durch elementaranalytische Ergebnisse verifiziert wurde.

Im Gegensatz zu der NMR-Methode neigt die Lowry-Methode zur Unterschätzung des Protein-Gehalts in EPS und Biofilmproben [Jernejc et al. 1986, Michell et al. 1991, Ras et al. 2008]. Die Lowry-Methode basiert auf der Bildung eines Kupferkomplexes, der spezifisch für die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin, Cystin und Histidin gebildet wird [Peterson 1979]. Aufgrund der Aminosäurezusammensetzung reagieren verschiedene Proteine unterschiedlich auf die Lowry-Methode [Ras et al. 2008]. In BSA, dem Proteinstandard bei der Lowry-Methode, finden sich größere Mengen der reaktionsspezifischen Aminosäuren als in den untersuchten Proteinen von *P. putida* und *A. pullulans*. Die Benutzung eines Standards stellt somit immer eine Limitierung der kolorimetrischen Methoden dar [Dignac et al. 1998, Berges et al. 1993].

Ähnliches gilt für die Kohlenhydrat-Bestimmung. Während mittels der NMR-Methode sämtliche O-Alkyl-Strukturen auch aus strukturbildenden Zellwand-Kohlenhydraten, wie z. B. Murein, erfasst werden, sind der biochemischen Methode nur die reduzierenden Gruppen von Mono-, Oligo-, oder Polysacchariden zugänglich. Daher sind vor allem Unterschiede bei den Biofilmproben zu erwarten. Des Weiteren ist davon auszugehen, dass besonders bei Biofilmproben eine unvollkommene Hydrolyse der Polysaccharide aus Zellaggregaten stattfindet, welche somit der Reaktion mit Phenol nicht zugänglich sind.

Beide Methoden zeigen jedoch die gleichen Trends in der EPS-Zusammensetzung der verschiedenen Extraktionsmethoden auf und beweisen eindeutig, dass Protein der Hauptbestandteil der Biofilme *P. putida* und *A. pullulans* und deren EPS ist. Für weitere Untersuchungen wurde soweit möglich auf die Gefriertrocknung der Proben vor den biochemischen Bestimmungen verzichtet.

4.2.3. Zusammenfassung und Beurteilung der Extraktionsmethoden

Der Einsatz der NMR-Spektroskopie in Kombination mit der N- und C-Analyse bietet tiefere Einblicke in die Zusammensetzung der EPS und lässt spezifische An- und Abreicherungen als Folge der Extraktion erkennen. Mittels der verwendeten Algorithmen ist es möglich, die Kohlenhydrat- und Protein-Konzentrationen anhand der NMR-Spektren zu berechnen.

Die verschiedenen EPS-Proben (außer EPS EDTA-Proben) der jeweiligen Biofilme unterscheiden sich nur wenig hinsichtlich der strukturellen Zusammensetzung basierend auf den NMR-Spektren und den Ergebnissen der Elementaranalyse. Berücksichtigt man die Extraktionsausbeuten wird ersichtlich, dass eine Erhöhung der Ausbeute eine Abnahme des P/KH-Verhältnisses der entsprechenden EPS-Probe zur Folge hat, was sowohl mit den biochemischen als auch der NMR-spektroskopischen Methode verifiziert wurde. Mittels der F-NaOH-Methode wurden für beide Biofilme die größte Ausbeute und das niedrigste P/KH-Verhältnis erzielt.

Im Gegensatz dazu wurde beim *A. pullulans* Biofilm die niedrigste Ausbeute mit der CER-Methode und bei *P. putida* mit der UZ-Methode erzielt, was jeweils zum größten P/KH-Verhältnis führt. Proteine scheinen in den untersuchten Reinkultur-Biofilmen somit schwächer gebunden zu sein und werden bevorzugt extrahiert. Bezieht man die EPS-Ausbeuten auf die EPS-Zusammensetzung wird ersichtlich, dass mit der F-NaOH-Methode eine deutlich größere Menge an Kohlenhydraten und Proteinen im Gegensatz zu der CER- und UZ-Methode extrahiert wird. Beim bakteriellen Biofilm werden zusätzlich große Ausbeuten mit der thermischen Methode erzielt werden, was mit Ergebnissen anderer Untersuchungen übereinstimmt [Sheng et al. 2005, Bura et al. 1998].

Die NMR-Spektren aller EPS weisen auf eine effektive Entfernung von Zellwandstrukturen mittels der verschiedenen Extraktionsverfahren hin. Diese Ergebnisse werden durch die Elementaranalyse der Proben unterstützt. Besonders in den bakteriellen EPS-Proben ist eine DNA-Abreicherung in den EPS bei allen Methoden festzustellen. Eine Freisetzung größerer Mengen DNA in die EPS in Folge von Zellwandbeschädigungen durch EDTA bzw. Ultrazentrifugation [Wingender et al. 1999] konnte mittels der NMR-Methode nicht verifiziert werden. Bei der F-NaOH- und der Hitze-Methode, die der Messung der G6PDH-Aktivität nicht zugänglich sind, konnte keine Anreicherung von DNA festgestellt werden.

Mittels NMR-Spektroskopie wurde festgestellt, dass die EPS EDTA-Proben von *P. putida* und *A. pullulans* Biofilmen mit EDTA kontaminiert waren. Die Verunreinigung erklärt die scheinbar hohen Ausbeuten der Methode und die niedrigen Protein- und Kohlenhydrat-Gehalte der extrahierten EPS verschiedener Studien.

Die UZ-Methode führte sowohl bei *P. putida* als auch *A. pullulans* zu Zellyse. Eine Verunreinigung mit intrazellulären Proteinen kann nicht ausgeschlossen werden und stellt eine Erklärung für den hohen Protein-Gehalt in der EPS P UZ-Probe dar. Aufgrund der zusätzlich vergleichsweise niedrigeren Ausbeuten stellt das UZ-Verfahren somit keine geeignete Methode dar.

Die CER-Methode ist zur Extraktion von EPS aus Reinkultur-Biofilmen aufgrund geringer Ausbeuten nicht geeignet, findet jedoch verbreitet Anwendung bei der EPS-Extraktion aus Belebtschlammproben. Die höheren EPS-Ausbeuten aus Belebtschlammproben im Vergleich zu anderen Methoden können auf die Anwesenheit größerer Mengen bivalenter Kationen in Umweltproben zurückgeführt werden.

Wie von Wingender et al. (1999) und Zhang et al. (1999) erkannt wurde, stellt eine Kombination verschiedener Verfahren die aussichtsreichste Möglichkeit dar, die EPS-Ausbeuten zu erhöhen.

Für weitere Versuche wurden die F-NaOH- und die thermische Methode ausgewählt, da die Methoden bei ähnlicher chemischer EPS-Zusammensetzung und gleicher Anreicherungscharakteristik wie bei den anderen EPS-Proben, z. B. CER-EPS, die höchsten Ausbeuten und keine nachzuweisenden Verunreinigungen durch Extraktionshilfsmittel aufwiesen.

4.3. Charakterisierung von EPS aus Membranbioreaktoren

In Untersuchungen zu EPS aus MBR werden diese in extrahierbare EPS (eEPS) und in die Fraktion der gelösten mikrobiellen Produkte (SMP; engl.: soluble microbial products) unterteilt. Sowohl eEPS als auch SMP stehen in Verdacht zum Membranfouling beizutragen [Jang et al. 2007, Bin et al. 2008, Nuengjamnong et al. 2005], wobei SMP aufgrund seiner gelösten Form einen besonders großen Beitrag zum Fouling liefert. In den letzten Jahren ist daher ein zunehmendes Interesse an SMP in wissenschaftlichen Publikationen festzustellen [Lyko et al. 2007, Meng et al. 2006, Reid et al. 2008, Wang et al. 2009].

In der durchgeführten Studie werden eEPS aus zwei MBR einer detaillierten Strukturaufklärung basierend auf SEC- und NMR-spektroskopischen Methoden unterzogen. MBR WM ist eine kommunale Kläranlage, während der MBR UNSW ein kleintechnisches Laborsystem darstellt, welches im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit (Kapitel 4.4) zu Foulingexperimenten verwendet wird. Des Weiteren findet eine detaillierte Untersuchung von SMP aus dem MBR WM statt und Gemeinsamkeiten sowie Unterschiede zu den eEPS werden herausgestellt. Somit können die Ergebnisse die Grundlage für ein tiefergehendes Verständnis zur Herkunft sowie zur Akkumulation von SMP in MBR liefern, was für das Verständnis einer entstehenden Foulingschicht im MBR von entscheidender Bedeutung ist.

4.3.1. Charakterisierung von extrahierbaren EPS aus MBR

Zur Extraktion von eEPS aus der Biomasse der MBR werden die F-NaOH- sowie die Hitze-Methode verwendet. Beide Methoden zeichnen sich durch hohe Extraktionsausbeuten an Modell-Biofilmen aus (Kapitel 4.2.1). Anorganische Substanzen und niedermolekulare organische Moleküle werden zur weitergehenden Charakterisierung der eEPS mittels Dialyse entfernt. Der Dialyseschritt ist ein verbreitetes Verfahren zur Aufreinigung der eEPS [Liu und Fang 2002, Rode 2004, Zhou et al. 2001, Bin et al. 2007, Comte et al. 2007] und ist für nachfolgende Analysen der strukturellen Zusammensetzung basierend auf biochemischen und NMR-spektroskopischen Methoden unerlässlich. Während der Dialyse kommt es zu erheblichen Verlusten an DOC in den jeweiligen eEPS-Proben, wie in Kapitel 4.3.1.2 ausführlich beschrieben wird.

4.3.1.1. Extraktionsausbeute von eEPS

Die Hitze-Methode liefert für beide MBR-Systeme größere Ausbeuten als die F-NaOH-Methode (Tabelle 30). Im Vergleich zu den Reinkultur-Biofilmen akkumulieren in der Biomasse aus MBR WM deutliche größere Mengen an anorganischer Materie aus der Umwelt, was zu einem Aschegehalt von ca. 45 % führt. Im Gegensatz dazu liegt der

Aschegehalt von MBR UNSW nur leicht über dem der Reinkultur-Biofilme, was auf den Betrieb mit synthetischem Abwasser zurückzuführen ist.

Tabelle 30: Ausbeute der EPS-Extraktion aus MBR WM und MBR UNSW in Massenprozent der organischen Biofilm-Trockenmasse (TM) (Der Gehalt an anorganischen Substanzen (Aschegehalt: WM: ca. 45 %, UNSW: ca. 8 %) wurde herausgerechnet.)

Extraktionsmethode	Ausbeute in % organische TM	
	MBR WM	MBR UNSW
F-NaOH	5,1 ± 0,7	5,1 ± 1,5
Hitze	7,1 ± 0,5	7,5 ± 0,9

Bezogen auf den organischen Anteil der Trockenmasse stimmen die Ausbeuten der zwei Extraktionsmethoden in den beiden Systemen gut überein und liegen in einem zu anderen Studien ähnlichen Bereich [Liu und Fang 2002, Ramesh et al. 2007]. Ein umfangreicher Vergleich verschiedener Studien gestaltet sich jedoch schwierig, da in verschiedenen Studien eine Vielzahl von Extraktions-, Reinigungs-, und Analysemethoden verwendet werden. Daher ist ein Vergleich nur sinnvoll, wenn die eEPS-Proben nach dem gleichen Verfahren (Extraktion, Filtration und Dialyse) aufbereitet werden.

4.3.1.2. Dialyse von eEPS

Die Dialyse von eEPS-Proben führte zu erheblichen Verlusten an DOC. Die Probe eEPS WM F-NaOH wies nach der Extraktion eine vergleichsweise hohe DOC-Konzentration von 1020 mg/L auf, was auf die Anwesenheit von Formaldehyd zurückzuführen war. Im Gegensatz dazu hatte die EPS WM Hitze-Probe eine DOC-Konzentration von 260 mg/L. Um die Ergebnisse der beiden eEPS vergleichbar zu machen, wurde der DOC-Anteil von Formaldehyd (ca. 704 mg/L) subtrahiert. Nach der Dialyse waren in der eEPS WM Hitze- und der eEPS WM F-NaOH-Probe nur noch 38 % bzw. 21 % des ursprünglichen DOC-Gehalts enthalten (Tabelle 31), was auf einen großen Anteil niedermolekularer organischer Substanzen in den undialysierten eEPS-Proben hinweist. Bei den Untersuchungen am MBR UNSW war keine DOC-Analyse verfügbar.

Tabelle 31: Einfluss der Dialyse auf die eEPS-Ausbeute in mg/L gelöster organischer Kohlenstoff (DOC).

Probe	DOC in mg/L		Verlust an DOC in %
	Vor Dialyse	Nach Dialyse	
eEPS WM F-NaOH	316*	66	79
eEPS WM Hitze	260	99	62

* Der DOC-Anteil von Formaldehyd (ca. 704 mg/L) wurde subtrahiert.

Mittels Größenausschlusschromatographie (SEC, engl.: size exclusion chromatography) mit DOC- und UV₂₅₄-Detektion wurde untersucht, ob durch die Dialyse ein strukturelektiver oder ein unselektiver Verlust von DOC verursacht wird. Dazu wurde die eEPS WM Hitze-Probe vor und nach der Dialyse mittels SEC untersucht. Das DOC-Chromatogramm der undialysierten eEPS WM F-NaOH-Probe liefert aufgrund des hohen Formaldehyd-Anteils keine Information über die EPS-Zusammensetzung und wird daher nicht diskutiert. Nach der gelchromatographischen Trennung lagen die Wiederfindungsraten für DOC lediglich zwischen 50 und 60 %. Auf diese Problematik wird in Kapitel 4.3.1.3 näher eingegangen. Der Einfluss der Dialyse auf die eEPS-Zusammensetzung wird daher im Folgenden nur an den wiedergefundenen eEPS-Bestandteilen diskutiert.

In Abbildung 38 sind die DOC- und UV-Chromatogramme der undialysierten und dialysierten eEPS WM Hitze-Probe dargestellt. Die Flächen der Chromatogramme wurden auf die vor und nach der Dialyse enthaltenen DOC-Konzentrationen der Fraktionen normiert.

Anhand der DOC-Chromatogramme ist ein größenspezifischer Verlust an DOC über den Dialyseschlauch für die eEPS WM Hitze-Probe zu erkennen, der eine deutliche Änderung der Molekülgrößenverteilung der eEPS-Fraktion zur Folge hat. Im Gegensatz dazu treten kleinere Änderungen in den Chromatogrammen der UV-Absorption der Probe vor und nach der Dialyse auf. Alle Chromatogramme weisen einen schmalen Peak bei ca. 29 mL auf. Dieser Peak entspricht hochmolekularen Molekülen, die aufgrund ihres hydrodynamischen Radius vom Porensystem des Trenngels ausgeschlossen werden (Ausschlussvolumen $V_0 = 28,7$ mL). In diesem Bereich eluieren hochmolekulare Biopolymere. Diese Substanzen weisen eine auffallend hohe UV-Absorption auf, was auf einen großen Anteil von UV-aktiven Biopolymeren, wie z. B. Proteinen und DNA, hindeutet. In diesem Bereich ist weder im DOC- noch im UV-Chromatogramm eine Änderung vor und nach der Dialyse erkennbar.

Bei der Dialyse werden überwiegend Substanzen im dynamischen Trennbereich der SEC-Säule ($V_0 - V_p$) (Permeationsvolumen $V_p = 66,7$ mL) und hier besonders im Bereich der niedermolekularen Neutralstoffe ($>> 57$ min) entfernt. Letztere haben einen Größenbereich von < 350 Da und sind nach außen hin neutral, d. h. es handelt sich um ungeladene oder amphiphile Moleküle. In diesem Bereich eluieren Substanzen wie Aldehyde, Alkohole und Ketone, aber auch Mono- und Oligosaccharide sowie niedermolekulare Säuren. Diese Stoffe weisen generell nur eine geringe UV-Absorption auf, was die kleinen Unterschiede in den Chromatogrammen der UV-Absorption vor und nach der Dialyse in diesem Bereich erklärt. Bis auf kleine Mengen UV-aktiver Stoffe, wie z. B. Peptide und/oder Aminosäuren, werden überwiegend niedermolekulare Substanzen mit geringer oder keiner UV-Aktivität entfernt.

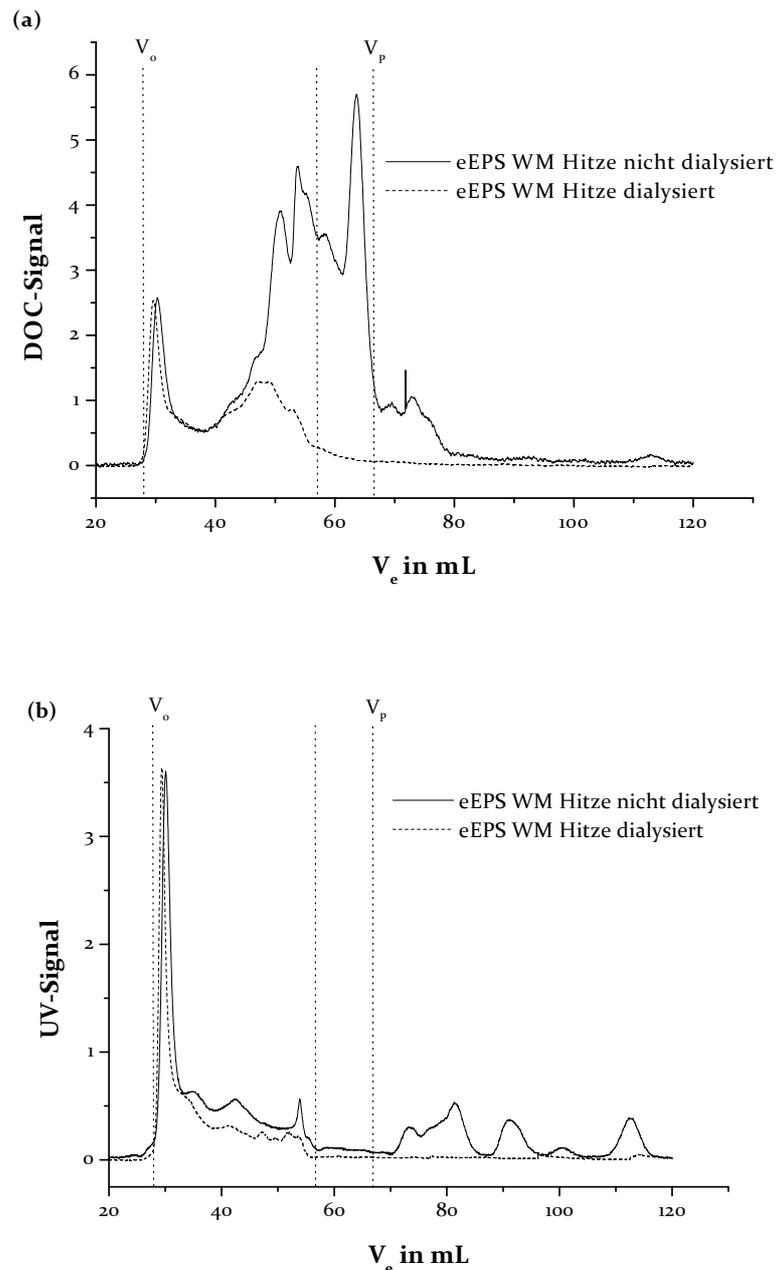


Abbildung 38: SEC-Chromatogramme der eEPS WM Hitze-Probe vor und nach Dialyse: (a) DOC- (b) UV_{254} -Signal (Die Flächen der Chromatogramme sind auf die DOC-Konzentration vor und nach der Dialyse normiert).

Dies ist in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Görner et al. (2003) und Garnier et al. (2005), die mittels SEC-Untersuchungen Molekülgrößen zwischen 0,5 und 1 kDa für Polysaccharide und zwischen 10 kDa und 600 kDa für Proteine aus EPS feststellten. Bei Kohlenhydratverbindungen im Bereich kleiner 1 kDa handelt es sich jedoch nicht um Polysaccharide, wie in den genannten Studien beschrieben wurde, sondern um Oligo- und Disaccharide, welche durch die Dialyse somit effektiv entfernt werden.

Im UV-Chromatogramm sind neben geringen Verlusten im dynamischen Trennbereich Verluste nach dem Permeationsvolumen festzustellen. Diese sind auf anorganische UV-aktive Verbindungen zurückzuführen, die kein korrespondierendes DOC-Signal aufweisen und somit nicht den eEPS zuzuordnen sind.

Aufgrund der Natur der Dialysemethode werden daher überwiegend niedermolekulare Substanzen entfernt, welche definitionsgemäß nicht den eEPS zugeordnet werden, während die makromolekularen Hauptkomponenten der EPS (Polysaccharide und Proteine) im Dialyseschlauch zurückgehalten werden. In verschiedenen Studien wird der Dialyseschritt nicht angewendet [Reid et al. 2008, Lee et al. 2003]. Bei Vernachlässigung des Dialyseschritts werden die niedermolekularen Substanzen mittels der biochemischen Protein- und Kohlenhydrat-Bestimmung z. T. mit analysiert. Dies führt in entsprechenden Studien zu einer höheren Abschätzung des EPS-Gehaltes basierend auf Protein- und Kohlenhydrat-Bestimmungen und somit zu scheinbar höheren EPS-Ausbeuten. In der vorliegenden Arbeit werden basierend auf Protein- und Kohlenhydrat-Bestimmungen bei den undialysierten eEPS-Proben bis zu 42 % größere Ausbeuten (eEPS WM F-NaOH) erzielt (Tabelle 32).

Tabelle 32: Einfluss der Dialyse auf Protein (P)- und Kohlenhydrat (KH)-Konzentrationen in eEPS-Proben (In Klammern sind die P/KH-Verhältnisse angegeben).

Probe	Konzentration (P + KH) in mg/L	
	vor Dialyse	nach Dialyse
eEPS WM F-NaOH	222 (1,1)	130 (2,4)
eEPS WM Hitze	221 (2,0)	167 (1,5)

4.3.1.3. SEC-Untersuchungen von eEPS

Der Einfluss der Extraktionsmethode auf die Molekülgrößenverteilung und die chemische Zusammensetzung der dialysierten Proben eEPS WM Hitze und eEPS WM F-NaOH wurde anhand von SEC-Chromatogrammen mit DOC- und UV₂₅₄-Detektion untersucht (Abbildung 39).

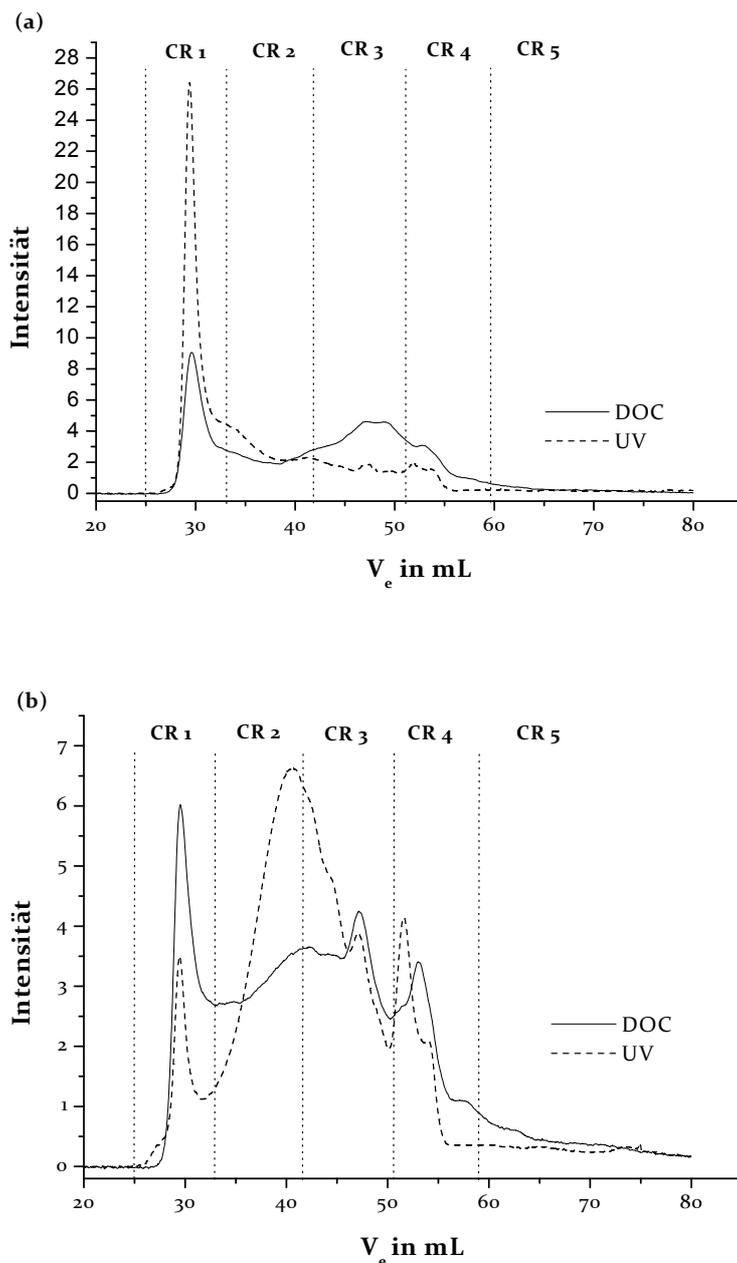


Abbildung 39: SEC-Chromatogramme der dialysierten Probe (a) eEPS WM Hitze und (b) eEPS WM F-NaOH mit DOC- und UV_{254} -Detektion (Die Chromatogrammspuren sind jeweils auf die gleiche Peakfläche normiert).

Die gelchromatographische Trennung führt infolge unerwünschter irreversibler Adsorption von Probenbestandteilen an die Gelmatrix zu Minderbefunden. Die Wiederfindungsraten für DOC lagen dabei zwischen 52 und 56 % (Tabelle 33). Das bedeutet, dass unterschiedliche Probenbestandteile in unterschiedlichem Maße irreversibel zurückgehalten werden. Diese ungewollte irreversible Sorption ist auf hydrophobe Wechselwirkung der Analyten mit dem Grundgerüst des Säulenfüllmaterials zurückzuführen. Eine Kompensation wäre z. B. durch Zugabe von organischen Lösemitteln (z. B. Acetonitril, Methanol) von bis zu 20 Vol-% zum

Eluenten (teilweise) möglich. Dies ist jedoch aufgrund des Einsatzes des organischen Kohlenstoff-Detektors (OCD) hier keine Option. Zusammenfassend werden die Anteile des DOC, die einer säulenchromatographischen Trennung aufgrund der hydrophoben Wechselwirkungen nicht zugänglich sind, als hydrophober organischer Kohlenstoff (HOC) bezeichnet. Der Anteil ergibt sich rechnerisch aus der Differenz des DOC zum chromatographierbaren DOC. EPS weisen somit einen großen Anteil von HOC auf. Die Unterschiede der eEPS-Zusammensetzung können daher im Folgenden lediglich an den wiedergefundenen eEPS-Bestandteilen diskutiert werden. Die ausgeprägte Adsorptionseigenschaft der hydrophoben EPS-Bestandteile ist auch einer der Gründe für die ausgeprägte Foulingneigung von EPS auf Membranen, wie in Kapitel 4.4 diskutiert wird.

Die Proben eEPS WM Hitze und eEPS WM F-NaOH weisen deutliche Unterschiede in ihrer Zusammensetzung auf. Der überwiegende Teil des DOC der beiden Proben eluiert zwischen dem Ausschluss- und dem Permeationsvolumen. Zu Integrationszwecken wurden die SEC-Chromatogramme in fünf gleichgroße Bereiche (CR, engl.: Chromatogram Region) von jeweils $\Delta V_e = 8,5$ mL unterteilt. Von den Bereichen wurden die Integrale der DOC- und der UV-Spur sowie die spezifische UV-Absorption SUVA (UV/DOC-Intensität) bestimmt (Tabelle 33).

Der Peak der hochmolekularen Biopolymere (~ 29 mL) ist bei der eEPS WM Hitze-Probe deutlich stärker ausgeprägt als bei der eEPS WM F-NaOH-Probe und weist eine auffallend hohe UV-Aktivität auf (Tabelle 33). Dies äußert sich in SUVA-Werten von 2,1 L/mg m für die eEPS WM Hitze-Probe und von 0,5 L/mg m für die eEPS WM F-NaOH-Probe im Bereich CR1 und weist auf einen höheren Anteil UV-aktiver makromolekularer Substanzen, wie z. B. Proteine, in der eEPS WM Hitze-Probe hin. Der SUVA der eEPS WM Hitze-Probe ist dabei deutlich höher als der SUVA reiner Proteine (ca. 0,5 L/mg m), was verschiedene Ursachen haben kann:

- a) Anwesenheit weiterer UV-aktiver Verbindungen, wie z. B. DNA. DNA hat einen höheren SUVA als Proteine von bis zu 6,5 L/mg m und kann als hochmolekulares Fragment oder als Gesamtmolekül in den eEPS vorliegen.
- b) Unvollständige Oxidation der hochmolekularen Verbindungen, insbesondere Proteine und DNA, mittels des DOC-Detektors führt zu einer Unterschätzung des DOC-Gehaltes im Bereich CR1 [Lankes et al. 2009].
- c) Anwesenheit von kolloidalen, anorganischen Verbindungen, die UV-Strahlung absorbieren.
- d) Konformationsänderung der Proteine während der Hitzebehandlung und Exposition von Tryptophan [Garrett et al. 1988], welches die UV-Absorption erhöht.

Der Bereich der Substanzklassen im mittleren Größenbereich und im Bereich der niedermolekularen Neutralstoffe (CR2 und CR3) ist in der eEPS WM F-NaOH-Probe stärker ausgeprägt als in der eEPS WM Hitze-Probe und weist einen höheren SUVA von bis zu 1,4 L/mg m auf. Das deutet auf eine Akkumulation UV-aktiver, niedermolekularer Stoffe, wie z. B. Peptidstrukturen, in der eEPS WM F-NaOH-Probe hin. Auffällig ist der Peak bei einem Retentionsvolumen von ca. 55 mL im Bereich CR4, der nur in der eEPS WM F-NaOH-Probe festgestellt werden kann. Dieser Peak lässt sich auf niedermolekulare Säuren mit sehr schwacher bis keiner UV-Aktivität, wie z. B. Essig- und Ameisensäure, zurückführen und/oder auf die Anwesenheit von Formaldehyd-Resten in der Probe.

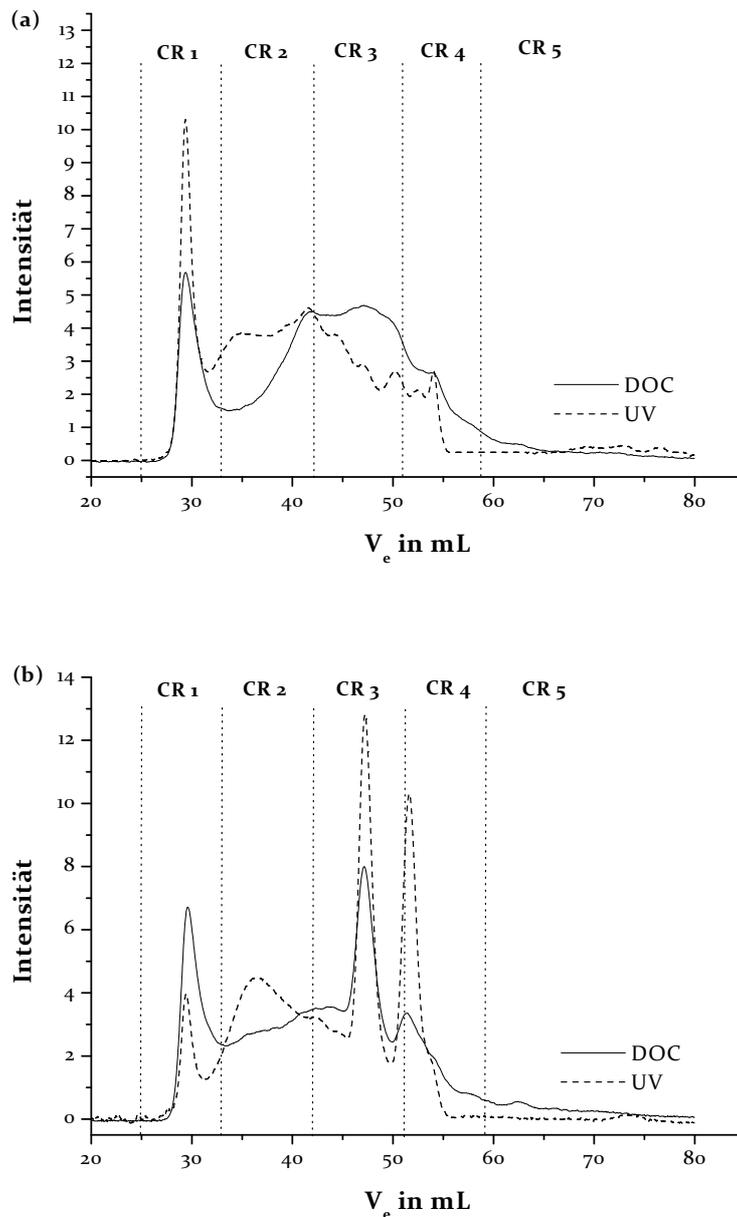


Abbildung 40: SEC-Chromatogramme der dialysierten eEPS-Proben mit DOC- und UV₂₅₄-Detektion (a) eEPS UNSW Hitze (b) eEPS UNSW F-NaOH (Die Flächen der Chromatogramme sind auf die gleichen Intensitäten normiert).

Die Ergebnisse aus dem kleintechnischen MBR UNSW zeigen ähnliche Tendenzen, wie sich in den SEC-Chromatogrammen sowie in den Integral- und SUVA-Werten der einzelnen Unterregionen darstellt (Abbildung 40, Tabelle 33).

Wie schon bei den eEPS WM-Proben haben die Extraktionsmethoden einen deutlichen Einfluss auf die Zusammensetzung der eEPS mit einem größeren Anteil UV-aktiver makromolekularer Substanzen in der eEPS Hitze-Probe und einem größeren Anteil UV-aktiver Substanzen im mittleren Molekülgrößenbereich in der eEPS F-NaOH-Probe. Besonders bei der eEPS F-NaOH-Probe treten Abweichungen im niedermolekularen Größenbereich auf, welche jedoch nicht eindeutig zugeordnet werden können. Abweichungen zwischen den MBR-Systemen können auf die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen (Abwasserzusammensetzung, Mikroorganismen-Population, Temperatur, etc.) zurückgeführt werden.

Dennoch werden unabhängig vom MBR-System mit beiden Extraktionsmethoden unterschiedliche Substanzklassen extrahiert. Unter der Annahme, dass der Großteil der eEPS aus Proteinen und Kohlenhydraten besteht, kann davon ausgegangen werden, dass durch die Hitze-Methode ein größerer Anteil hochmolekularer Proteine extrahiert wird, während durch die F-NaOH-Methode Proteine mit einer kleineren Molmasse oder Peptidstrukturen angereichert werden. Eine mögliche Anreicherung von DNA in den eEPS Hitze-Proben deutet auf die Beeinflussung der Bakterienzellen während der Hitze-Extraktion hin und wird ausführlicher in Kapitel 4.3.1.4. diskutiert. Eine Ursache für die Anreicherung größerer Mengen niedermolekularer Substanzen in der eEPS WM F-NaOH-Probe kann eine strukturelle Änderung der eEPS im Rahmen der Extraktion sein. Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass es durch den Gebrauch von NaOH zur Hydrolyse von EPS-Komponenten kommt.

Tabelle 33: Intensitätsverhältnisse der UV/DOC-Signale der verschiedenen Elutionsbereiche und DOC-Wiederfindung bei gelchromatographischer Analyse (Bypass/Säule).

Probe	UV/DOC –Verhältnis						DOC-Wiederfindung in %
	CR1	CR2	CR3	CR4	CR5	Gesamt	
eEPS WM F-NaOH	0,5	1,4	1,1	0,8	0,6	1,3	53
eEPS WM Hitze	2,1	1,2	0,4	0,4	0,5	1,5	53
eEPS UNSW F-NaOH	0,5	1,3	1,0	1,3	0,0	1,1	52
eEPS UNSW Hitze	1,4	1,5	0,7	0,6	0,6	1,4	56

4.3.1.4. Strukturelle Charakterisierung der eEPS

Die NMR-spektroskopischen, biochemischen und elementaranalytischen Ergebnisse beziehen sich auf den bei der Dialyse zurückgehaltenen eEPS-Anteil. Die Integrationsdaten der NMR-Spektren sowie die elementaranalytischen Daten der Proben aus dem MBR WM und dem MBR UNSW sind in Tabelle 34 und Tabelle 36 angegeben.

Tabelle 34: Integralwerte der chemischen Verschiebungsbereiche der Proben aus MBR WM und MBR UNSW.

Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %						
	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆	I _{6a}
	190-160 ppm	160-110 ppm	100-90 ppm	90-65 ppm	65-45 ppm	45-0 ppm	31-29 ppm
<i>Biomasse WM</i>	18,9	10,6	3,0	18,4	15,5	31,9	3,0
eEPS WM F-NaOH	20,4	6,6	3,6	20,4	19,9	28,8	2,0
eEPS WM Hitze	17,1	5,8	5,7	30,5	17,3	23,7	1,6
<i>Biomasse UNSW</i>	20,7	7,2	2,5	14,4	17,9	36,8	4,2
eEPS UNSW F-NaOH	21,1	6,5	4,8	19,0	19,0	27,7	2,4
eEPS UNSW Hitze	19,2	6,8	5,5	24,2	16,5	28,8	3,4

Tabelle 35: Elementaranalytische Daten der Biomasse und eEPS-Proben aus den MBR WM und MBR UNSW.

Probe	Massenanteil in %		Elementverhältnis N/C (mol/mol)
	N	C	
<i>Biomasse WM</i>	3,7	23,8	0,13
eEPS WM F-NaOH	7,4	34,3	0,18
eEPS WM Hitze	8,9	39,1	0,20
<i>Biomasse UNSW</i>	10,2	45,8	0,19
eEPS UNSW F-NaOH	6,8	33,3	0,18
eEPS UNSW Hitze	8,9	37,3	0,20

Der niedrige C-Gehalt der Biomasse WM wird durch Adsorption anorganischer Ionen aus dem Abwasser verursacht (Aschegehalt: ca. 45 %) und kann unter Laborbedingungen mit synthetischen Abwasser im MBR UNSW (Aschegehalt: ca. 8 %) nicht festgestellt werden. Im Vergleich zu den Modell-Biofilmen (Reinkultur-Biofilme und MBR UNSW) findet man in Umwelt-Biofilmen somit einen deutlich niedrigeren C- und einen höheren Aschegehalt.

Die eEPS-Proben aus den beiden MBR weisen ähnliche C- und N-Gehalte im Bereich von 34 bis 39 % bzw. 7 bis 9 % auf. Durch die Extraktionsverfahren und die Dialyse kommt es somit zu einer Anreicherung des organischen Anteils im Vergleich zur Biomasse und zu einer Entfernung anorganischer Substanzen in den eEPS WM. Die eEPS Hitze-Proben weisen jeweils einen höheren C- und N-Anteil als die eEPS F-NaOH-Proben auf. Dieser Trend wurde auch bei eEPS des Modell-Biofilms von *P. putida* festgestellt (Kapitel 4.2.2.1). Die Abnahme des C-Gehaltes in den eEPS UNSW im Vergleich zur Biomasse lässt sich auf eine selektive Extraktion von Biomasse-Bestandteilen zurückführen, wie in den folgenden Kapiteln erläutert wird.

MBR Waldmössingen

In Abbildung 41 sind die ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der eEPS und der Biomasse aus dem MBR WM dargestellt.

Alle Spektren zeigen eine heterogene Verteilung der Signale in den verschiedenen chemischen Verschiebungsbereichen und weisen auf die Anwesenheit von Polysacchariden und Proteinen hin. Die hohe Übereinstimmung der Signalmuster mit den NMR-Signalmuster der Modell-EPS, deutet darauf hin, dass die Biomasse und die eEPS fast ausschließlich aus mikrobiell synthetisierten Biopolymeren bestehen und wenig andere aus der Umgebung sorbierte Substanzen, wie z. B. Huminstoffe, anwesend sind. Das Biomasse-Spektrum hat auf Grund des geringen relativen C-Gehalts das niedrigste S/N-Verhältnis der Proben (Tabelle 52, Anhang D).

Das Biomasse-Spektrum zeigt ein ausgeprägtes Signal der n-Alkan-Strukturen (ca. 30 ppm) aus Zellwandbestandteilen der Mikroorganismen, was bereits am Spektrum des Modell-Biofilms *P. putida* (Kapitel 4.1.3.2) diskutiert wurde. Die beiden eEPS-Spektren weisen quantitative Unterschiede auf und belegen eine selektive Extraktion in Abhängigkeit von der Extraktionsmethode, was auch anhand der SEC-Chromatogramme (Kapitel 4.3.1.3) und anhand der biochemischen Protein- und Kohlenhydrat-Bestimmung erkennbar ist (Tabelle 37). Die relativen An- und Abreicherungen in den eEPS in Bezug auf die Biomasse-Probe werden durch die Differenzspektren verdeutlicht (Abbildung 42).

Die eEPS WM Hitze-Probe unterscheidet sich hinsichtlich der NMR- und biochemischen Daten deutlicher von der Biomasse-Probe als die eEPS WM F-NaOH-Probe, was auf eine ausgeprägte Anreicherung der O-Alkyl-Strukturen zurückzuführen ist. Im Gegensatz dazu werden bei der eEPS WM F-NaOH-Probe O-Alkyl- sowie proteinogene Strukturen im gleichen Maße angereichert. Beide Differenzspektren weisen zusätzlich auf eine starke relative Abreicherung von aliphatischen Strukturen und somit eine effektive Entfernung von Zellwandstrukturen hin.

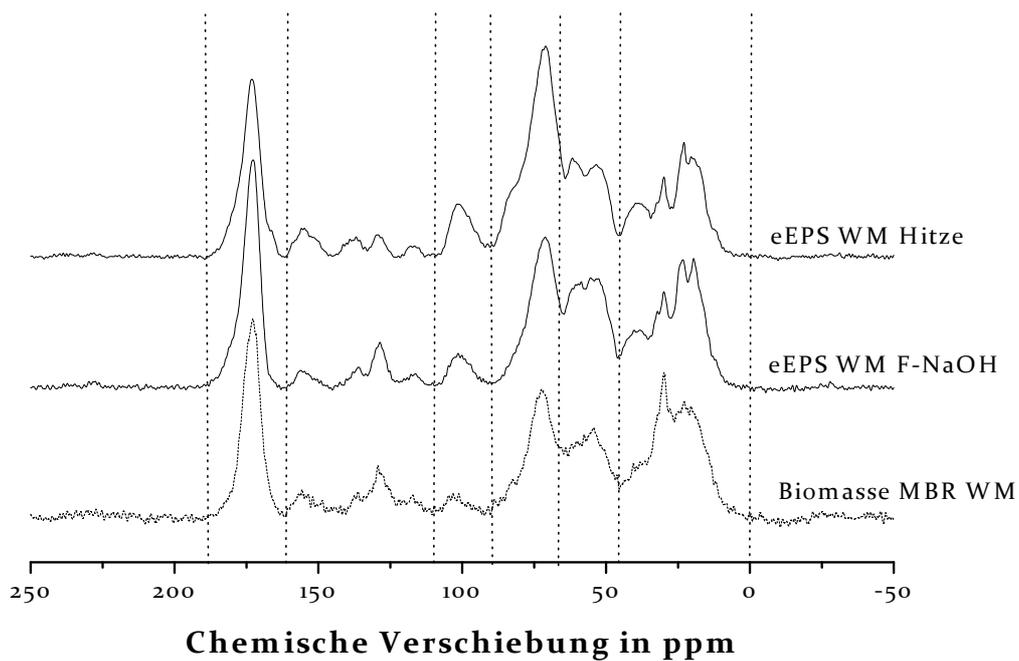


Abbildung 41: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der eEPS WM F-NaOH, eEPS WM Hitze und der Biomasse aus dem MBR WM.

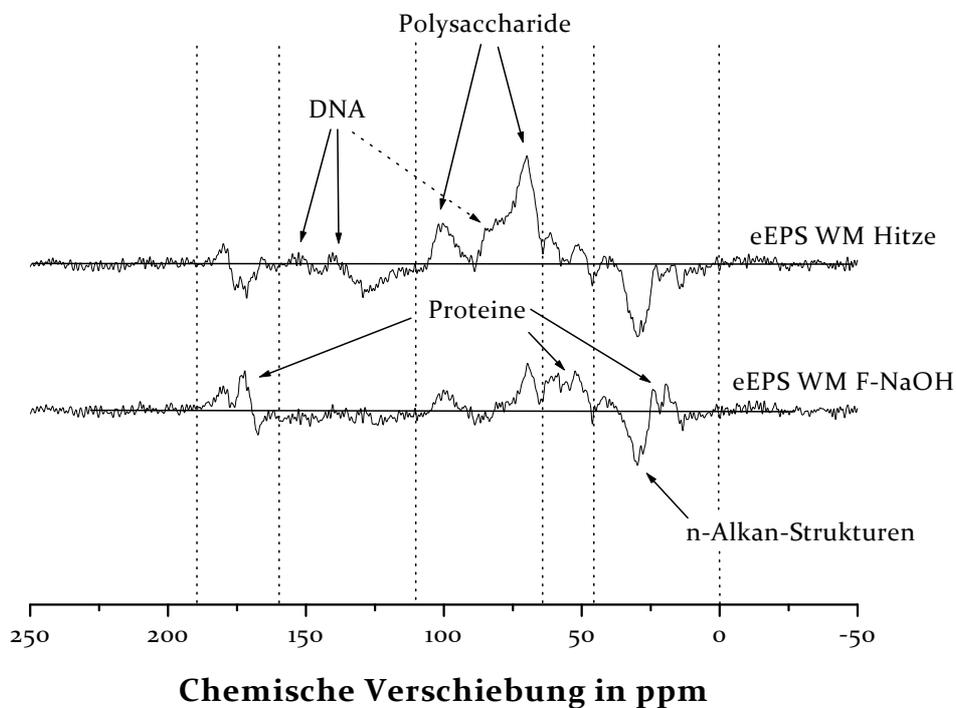


Abbildung 42: Differenzspektren der eEPS-Proben MBR WM (Das Spektrum der Biomasse WM-Probe wurde vom Spektrum der jeweiligen EPS-Probe abgezogen).

In den Spektren der eEPS-Proben treten im chemischen Verschiebungsbereich der Aliphaten die Signale bei 21 und 18 ppm hervor. Das Signal bei 21 ppm kann oft in Zusammenhang mit N-Acetyl-Gruppen aus Kohlenhydrat-Strukturen nachgewiesen werden [Lankes et al. 2001]. Besonders mikrobielle Zellwand-Kohlenhydrat-Strukturen, wie z. B. Murein, können N-Acetyl-Gruppen enthalten.

Anhand der Integrationsdaten und der C-Gehalte der Proben wurden die maximalen Kohlenhydrat- und Protein-Gehalte (w/w) berechnet. Sowohl die NMR-spektroskopischen als auch die biochemischen Ergebnisse spiegeln die relativen An- und Abreicherungen in den eEPS wider (Tabelle 36). Die Ergebnisse werden durch eine Zunahme der N/C-Verhältnisse der eEPS-Proben im Vergleich zur Biomasse-Probe (Tabelle 36) unterstützt.

Tabelle 36: Protein(P)- und Kohlenhydrat(KH)-Konzentration und -Verhältnis der Biomasse und eEPS WM basierend auf biochemischen und ^{13}C CPMAS NMR-spektroskopischen Ergebnissen.

Probe	Relativer Anteil in %					
	Biochemisch			NMR		
	P	KH	P/KH	P	KH	P/KH
Biomasse MBR WM	26,8	10,7	2,5	32,3	11,6	2,8
eEPS WM F-NaOH	40,9	16,5	2,5	47,5	18,7	2,5
eEPS WM Hitze	37,9	28,4	1,3	44,8	32,0	1,4

Die NMR-spektroskopischen Ergebnisse liegen leicht über den biochemischen Ergebnissen (vgl. Kapitel 4.2), wobei die P/KH-Verhältnisse gut übereinstimmen. Die geringeren Abweichungen zwischen den Methoden im Vergleich zu den EPS aus Modell-Biofilmen sind auf die Vermeidung der Wiederauflösung der EPS zurückzuführen, da die biochemischen Bestimmungen direkt nach der Dialyse ohne vorheriges Gefriertrocknen vollzogen wurden.

Die eEPS WM Hitze-Probe weist wegen des stärker angereicherten Kohlenhydrat-Anteils jeweils ein niedrigeres P/KH-Verhältnis als die eEPS WM F-NaOH-Probe und die Biomasse-Probe auf (Tabelle 36).

Die NMR-spektroskopischen und die biochemischen Ergebnisse unterscheiden sich von den elementaranalytischen Daten. Das erhöhte N/C-Verhältnis der eEPS WM Hitze-Probe (0,20) gegenüber der eEPS WM F-NaOH-Probe (0,18) spiegelt nicht den erwarteten Trend der P/KH-Verhältnisse wider. Der hohe N-Gehalt und das daraus resultierende höhere N/C-Verhältnis der eEPS WM Hitze-Probe lässt sich durch eine relative Anreicherung von DNA und/oder N-acetylierten Kohlenhydraten aus der Zellwand in den eEPS anhand der NMR-Spektren erklären.

Im Vergleich zu der Biomasse-Probe liegt eine leichte Anreicherung des DNA-Indikatorsignals bei 150 ppm und des Signals bei 139 ppm sowie eine Signalschulter im O-Alkyl-Bereich bei 83 ppm vor. Dies deutet auf eine Anreicherung von DNA hin (vgl. Kapitel 4.1.2.4). Durch die große relative Abreicherung im aliphatischen Bereich im Bezug zur Biomasse-Probe ist das korrespondierende Methyl-Signal nicht erkennbar.

Die Anreicherung von DNA kann somit auch als Ursache für den ausgeprägten SUVA-Wert im hochmolekularen Bereich CR1 im SEC-Chromatogramm angesehen werden (Kapitel 4.3.1.3, Abbildung 39). Aufgrund einer möglichen unvollständigen Oxidation durch den DOC-Detektor und einer niedrigen Wiederfindung ist eine Abschätzung der DNA-Konzentration anhand des SEC-Chromatogramms mit großer Unsicherheit behaftet. Bei der eEPS WM F-NaOH-Probe können die DNA-spezifischen Anreicherungen nicht festgestellt werden. In vergleichbaren eEPS F-NaOH-Proben wurden ebenfalls lediglich geringe DNA-Gehalte zwischen 0,1 bis 0,4 % in eEPS gefunden [Liu und Fang 2002].

MBR UNSW

In Abbildung 43 sind die ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Biomasse- sowie der eEPS-Proben aus dem kleintechnischen MBR UNSW dargestellt.

Die Spektren der eEPS-Proben aus dem MBR UNSW zeigen ähnliche relative Anreicherungen wie die eEPS-Spektren der Proben aus dem MBR WM, was sich auch in den Differenzspektren (Abbildung 44) und der Kohlenhydrat- und Protein-Bestimmung (Tabelle 38) widerspiegelt. Im Vergleich zur Biomasse WM weist die Biomasse UNSW einen größeren relativen Protein-Gehalt sowie einen höheren Anteil von n-Alkan-Strukturen auf, was zu einem höheren N/C-Verhältnis (0,19) führt. Unter Laborbedingungen ist davon auszugehen, dass überwiegend bakterielle Organismen im Reaktor wachsen, während unter Umweltbedingungen eine heterogenere Mikroorganismen-Flora und -Fauna einschließlich eukaryotischer Umwelt-Organismen, wie z. B. Flagellaten, anwesend sein können. Die Anwesenheit von Flagellaten wurde im MBR WM nachgewiesen [Krampe und Laufer 2006]. Zusätzlich ist die Substratkonzentration im kleintechnischen MBR konstanter, im Durchschnitt höher und nicht durch äußere Bedingungen, wie Niederschlagsereignisse, beeinflusst. Dies resultiert im schnelleren Wachstum und in einer höheren Zelldichte.

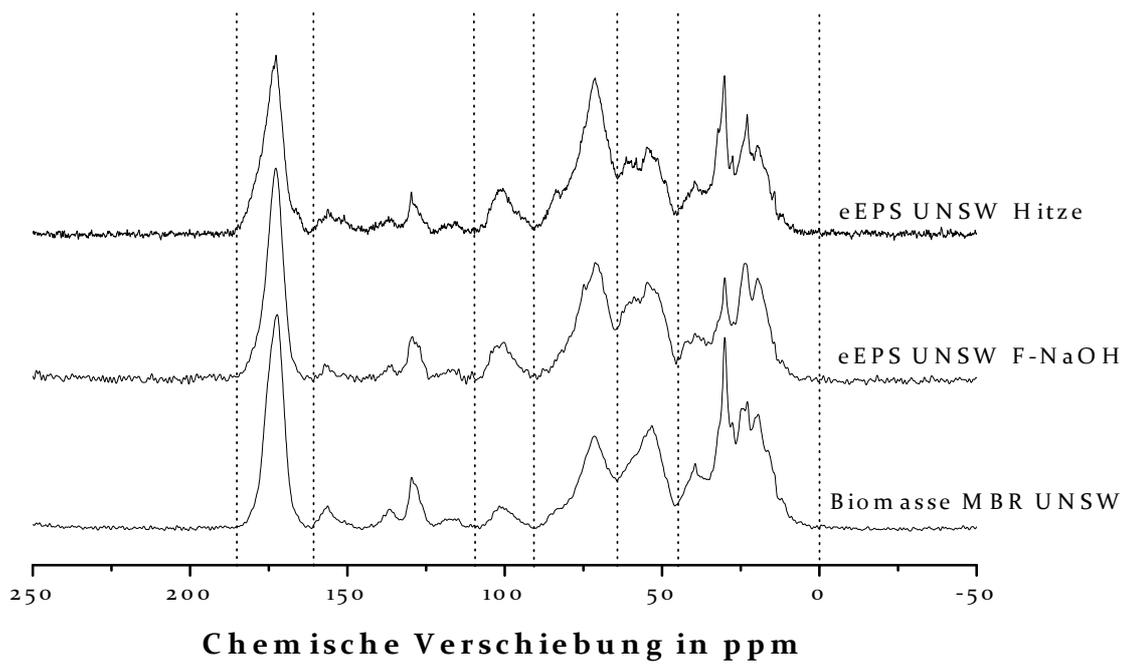


Abbildung 43: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der eEPS UNSW F-NaOH, eEPS UNSW Hitze und der Biomasse aus dem MBR UNSW.

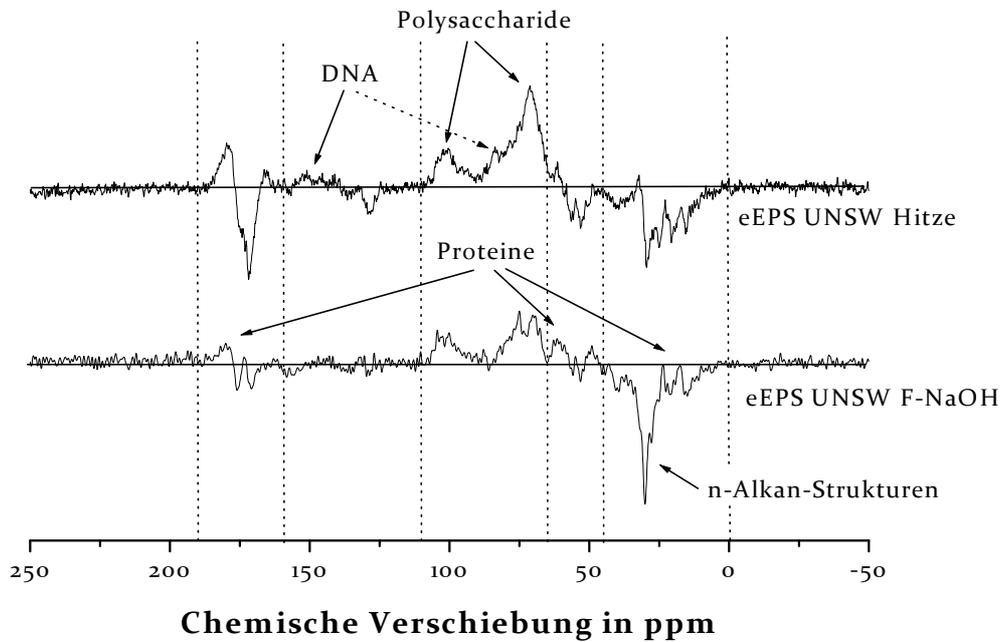


Abbildung 44: Differenzspektren der eEPS UNSW-Proben (Das Spektrum der Biomasse-Probe wurde vom Spektrum der jeweiligen eEPS-Probe abgezogen).

Mittels der Hitze-Extraktion findet wie im MBR WM eine ausgeprägte Anreicherung von Polysacchariden und Abreicherung von proteinogenen Substanzen statt. Bei der eEPS UNSW F-NaOH-Probe sind eine kleinere relative Anreicherung von Kohlenhydraten im Bezug zur Biomasse und im Bereich der Proteinstrukturen nur leichte Veränderungen festzustellen. Das resultiert in einem P/KH-Verhältnis von 2,5 für die eEPS UNSW F-NaOH-Probe und von 2,0 für die eEPS UNSW Hitze-Probe.

Auffallend ist das gut ausgeprägte Indikatorsignal für Lipide bei 30 ppm im Spektrum der eEPS UNSW Hitze-Probe. Zusätzlich ist das Indikatorsignal für DNA bei 150 ppm stärker ausgeprägt als im Spektrum der eEPS UNSW F-NaOH-Probe und eine Signalschulter ist bei 83 ppm zu erkennen. Das lässt auf eine Beeinflussung der Zellwand während der Hitze Extraktion schließen, was zur Anreicherung von intrazellulärer DNA sowie zellwand-spezifischer Komponenten in den eEPS führt.

Die N/C-Verhältnisse der eEPS UNSW-Proben stimmen mit denen der eEPS WM-Proben überein und weisen auf ähnliche An- bzw. Abreicherungen der Extraktionsmethoden unabhängig vom MBR-System hin.

Tabelle 37: Protein(P)- und Kohlenhydrat(KH)-Konzentration und -Verhältnis der Biomasse und eEPS UNSW basierend auf biochemischen und ^{13}C CPMAS NMR spektroskopischen Ergebnissen.

Probe	Relativer Anteil in %					
	Biochemisch			NMR		
	P	KH	P/KH	P	KH	P/KH
Biomasse MBR UNSW	n.a.	n.a.	n.a.	68,2	17,5	3,9
eEPS UNSW F-NaOH	20,3	8,5	2,4	44,8	18,0	2,5
eEPS UNSW Hitze	26,6	12,3	2,2	49,3	25,2	2,0

n.a. = nicht analysiert

Im Gegensatz zu den Proben aus dem MBR WM treten bei den Untersuchungen aus dem MBR UNSW wiederum erhebliche Abweichungen zwischen den unterschiedlichen Untersuchungsmethoden auf, da die eEPS-Proben aus dem MBR UNSW nach der Gefriertrocknung untersucht wurden. Daher lassen sich die Abweichungen zum Großteil auf die eingeschränkte Löslichkeit der eEPS-Proben nach der Gefriertrocknung zurückführen, welche aufgrund der nicht verfügbaren DOC-Analytik nicht quantifiziert werden konnte. Die P/KH-Verhältnisse beider Methoden stimmen jedoch gut überein. Bei der Analyse der Foulingkomponenten (siehe Kapitel 4.4.2.1) aus Deckschichten der Membranen aus dem MBR UNSW ist von der Gefriertrocknung der Proben vor der Analyse abgesehen worden.

4.3.1.5. Zusammenfassung und Beurteilung der Extraktionsmethoden

Die Dialyse von eEPS-Proben führte zu erheblichen Verlusten an organischen Substanzen, die aufgrund ihrer Molekülgröße nicht zu den EPS-Komponenten (Polysaccharide bzw. Proteine) gezählt werden. Zusätzlich wird durch die Dialyse ein Großteil der anorganischen Ionen entfernt. Für die nachfolgenden Analysen (SEC-, NMR-, biochemische Untersuchungen) ist der Dialyseschritt unerlässlich und führt bei Unterlassung zu deutlichen Unterschieden in den eEPS-Ausbeuten und -Zusammensetzungen.

Die beiden Extraktionsmethoden zeigen unabhängig vom MBR-System spezifische Unterschiede bei der Extraktion von eEPS aus Belebtschlamm, was sich sowohl auf die Molekülgröße der eEPS als auch auf deren chemische Zusammensetzung auswirkt.

Die Extraktion mit der Hitze-Methode führt im Vergleich zu der F-NaOH-Methode zu einer deutlichen relativen Anreicherung von Kohlenhydraten in den eEPS-Proben nach der Dialyse. Der hohe Kohlenhydrat-Anteil und die Abreicherung von proteinogenen Substanzen bei der Hitze-Methode könnten durch eine Denaturierung von EPS-Proteinen während der Extraktion zu Stande kommen. Durch Denaturierung nimmt die Löslichkeit von Proteinen ab, was zur Abtrennung dieser während der anschließenden Aufreinigungsmethoden führt.

Auf Grundlage der Ergebnisse kann eine Beeinträchtigung der Zellintegrität bei der Hitze-Methode vermutet werden, was zu Anreicherungen von intrazellulären und zellwand-spezifischen Strukturen in den eEPS führt. Eine derartige Beeinträchtigung konnte bei Anwendung der F-NaOH-Methode nicht festgestellt werden. Dazu trägt die Stabilisierung der Zellwandstruktur durch Formaldehyd bei, welches Verknüpfungen zwischen Amino-, Hydroxyl-, Carboxyl- und Sulfhydryl-Gruppen von Proteinen und Nukleinsäuren herstellt und die Zellwand dadurch fixiert [Alcamo 1997].

Unter der Annahme, dass der überwiegende Teil der Biomasse aus EPS besteht und Zellmasse lediglich einen Anteil von 5-10 % an der Gesamt-Biofilmmasse darstellt [Frølund et al. 1996], findet mittels der F-NaOH-Methode eine gleichmäßigere Extraktion der verschiedenen eEPS statt. Durch die Einwirkung von NaOH auf die eEPS kann es jedoch zu einer Hydrolyse der EPS-Komponenten kommen, was sich als Verringerung der Molekülgrößen auswirkt.

Anhand der kleinen eEPS-Ausbeuten wird ersichtlich, dass der Großteil der organischen extrazellulären polymeren Substanzen den Extraktionsmethoden unerschlossen bleibt.

Die Ergebnisse der strukturellen Zusammensetzung der eEPS aus Modell-Biofilm-Untersuchungen (Kapitel 4.2) lassen sich nur teilweise auf die Untersuchungen der Belebtschlammproben übertragen. Im Gegensatz zu den Modell-Biofilmen werden andere strukturelle Komponenten angereichert, was auf die unterschiedlichen Wachstumsbedingungen, Mikroorganismen und das Alter der Biomasse zurückzuführen. Dies stellt ein generelles Problem bei der Anwendung von Modell-Biofilmen dar. Tendenziell enthalten

eEPS aus Reinkultur-Biofilmen mehr Proteine und weniger Polysaccharide, als eEPS aus Belebtschlamm, was sich mit Ergebnissen aus anderen Studien deckt [Guibaud et al. 2005]. Der Großteil der organischen Strukturen in eEPS aus MBR lässt sich auf mikrobielle Substanzen zurückführen. Die hohe Übereinstimmung der NMR-Spektren der verschiedenen Proben mit den Spektren der Modell-Substanzen zeigt, dass die Biomasse und eEPS fast ausschließlich aus mikrobiell synthetisierten Biomolekülen besteht. Im Unterschied zu anderen Arbeiten [Comte et al. 2006, Al-Halbouni et al. 2009] konnten keine größeren Mengen an sorbierten Huminstoffen (gemessen mit modifizierter Lowry-Methode [Frølund et al. 1995]) in den eEPS nachgewiesen werden.

4.3.2. Charakterisierung von SMP aus MBR WM

SMP liegen im Gegensatz zu eEPS in wesentlich geringen Konzentrationen in MBR vor, was deren Charakterisierung aufgrund einer aufwendigen Aufbereitung erschwert. Mittels mehrstufiger Ultrafiltration (mst-UF) wurden SMP-Größenfraktionen hergestellt und mit Größenausschlusschromatographie und ^{13}C CPMAS NMR-Spektroskopie untersucht. Um eine ausreichende Menge von SMP in jeder Fraktion zu erhalten, wurden ca. 70 L Belebtschlamm aus dem MBR WM aufbereitet. Eine derartige SMP-Aufbereitung war im kleintechnischen MBR UNSW aufgrund des kleineren Reaktorvolumens nicht möglich.

4.3.2.1. Ausbeute von SMP

Der abzentrifugierte, gefilterte Überstand weist einen DOC-Gehalt von $6,8 \pm 1,6$ mg/L bei verschiedenen Probenahmen im MBR WM auf. Nach Aufkonzentrierung der SMP über eine 1 kDa Membran und anschließender Gefriertrocknung werden pro Liter $4,7 \pm 1,0$ mg SMP (C-Gehalt ca. 38 %) erhalten. Das entspricht einer SMP-Konzentration von ca. 0,5 mg/g TM und verdeutlicht den geringen SMP-Anteil im Vergleich zu eEPS (siehe Tabelle 30).

4.3.2.2. Fraktionierung der SMP mittels mst-UF

SMP WM (0,45 μm filtriert) wurden mittels mst-UF in die vier Fraktionen F1 (0,45 μm – 100 kDa), F2 (100 kDa – 10 kDa), F3 (10 kDa – 1 kDa) und F4 (< 1 kDa) fraktioniert. Zusätzlich wurde eine Gesamtprobe SMP WM K (0,45 μm – 1 kDa) hergestellt. Mittels Diafiltration sollten niedermolekulare, anorganische Moleküle ausgewaschen werden, welche einen störenden Einfluss auf die Anwendung der ^{13}C CPMAS NMR-Methode haben. Die Konzentrate wurden für die folgenden Analysen gefriergetrocknet.

Nach der Fraktionierung waren 46 % der gelösten organischen Verbindungen in den Fraktionen SMP WM F1, F2 und F3 sowie der Probe SMP WM K enthalten. Fraktion SMP F4 mit der niedrigsten nominellen Molmasse (< 1 kDa) stellte mit einem Anteil von

54 % den größten Anteil an DOC dar (Tabelle 38). Dieser Effekt wurde auch bei der Fraktionierung von Kläranlagenablaufproben [Frimmel et al. 2005] sowie in weiteren Studien zur Fraktionierung von SMP beobachtet [Malamis und Andreadakis 2009, Liang et al. 2007, Jang et al. 2007]. Fraktion SMP F4 besteht aus niedermolekularen Substanzen, wie z. B. Aminosäuren, Mono-, Di- und Oligosacchariden, organischen Säuren sowie anorganischen Ionen, welche ihren Ursprung im Kläranlagenzufluss haben bzw. niedermolekulare Abbauprodukte sind. SMP F4 wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht weitergehend untersucht, da der überwiegende Teil niedermolekularer Substanzen (< 1 kDa) die im MBR verwendeten Mikrofiltrationsmembranen passieren kann und wenig zum Fouling der Membranen beiträgt [Huang et al. 2000, Zhang et al. 2008, Laabs et al. 2006].

Fraktion SMP F1 stellte einen Anteil von ca. 12 % am DOC, Fraktion F2 und F3 jeweils einen etwas größeren Anteil von ca. 14 % dar (Tabelle 38). Bei den einzelnen Filtrationsschritten kam es zu DOC-Verlusten von maximal 10 %, die auf Anlagerungen in und auf den Filtern (Deckschichtbildung) zurückzuführen sind [Lankes 2001]. Die Ergebnisse der mst-UF stimmen tendenziell mit Untersuchungen von Liang et al. (2007), Zhou et al. (2001) und Jang et al. (2007) überein.

Tabelle 38: Basisparameter und DOC-Bilanz der mst-UF-Fraktionierung der Probe SMP WM.

Probe	DOC-Anteil %	m(DOC) mg/50 L	SUVA L/(m mg)	N/C mol/mol
SMP WM	100	---	---	---
SMP K (0,45 µm - 1 kDa)	46	238	2,1	0,15
SMP F1 (0,45 µm - 100 kDa)	12	62	1,5	0,20
SMP F2 (100 kDa - 10 kDa)	14	73	1,2	0,10
SMP F3 (10 kDa - 1 kDa)	14	70	3,0	0,09
SMP F4 (< 1 kDa)	54	---	---	---

Die N/C-Verhältnisse und SUVA-Werte der einzelnen Fraktionen lassen auf strukturelle Unterschiede in den Fraktionen schließen. Mit ansteigender Fraktionsnummer ist eine Abnahme des N/C-Verhältnisses zu erkennen. Der SUVA weist eine ähnliche Tendenz für Fraktion F1 und F2 auf, steigt jedoch in Fraktion F3 deutlich an. Das weist auf einen größeren Anteil proteinogener und anderer N-haltiger, UV-aktiver Moleküle, wie z. B. DNA, in den größeren Molekül-Fraktionen hin, wie in den folgenden Kapiteln anhand von SEC- und NMR-Untersuchungen diskutiert wird.

4.3.2.3. SEC-Untersuchungen der mst-UF-Fractionen

Die Molekülgrößenverteilung und Zusammensetzung der einzelnen Fraktionen sowie die Trennungseigenschaften der mst-Ultrafiltration wurden mittels Größenausschlusschromatographie mit Detektoren für organischen Kohlenstoff (OCD, engl.: organic carbon detector) sowie für organischen Stickstoff (OND, engl.: organic nitrogen detector) (LC-OCD/OND) untersucht. Die SEC-Chromatogramme der verschiedenen Fraktionen sind in Abbildung 45 dargestellt.

Zur Quantifizierung und Charakterisierung der verschiedenen SEC-Größenfraktionen wurden die Chromatogramme der mst-UF-Fractionen in drei Größenbereiche (A, B, C) unterteilt. SEC-Bereich A stellt den hochmolekularen Anteil, SEC-Bereich B den Anteil mittlerer Molekülgrößen und SEC-Bereich C den niedermolekularen Anteil dar. Die Grenzen der verschiedenen SEC-Bereiche wurden mit Pullulan-Standards (11,2 kDa bis 710 kDa) kalibriert und geben einen Anhaltspunkt über die Größenverteilung der SMP. Verschiedene SMP können jedoch unterschiedliche Retentionseigenschaften aufweisen, so dass keine genaue Klassifizierung der Molekülgrößen anhand der Pullulan-Standards vorgenommen werden kann. Die N/C-Verhältnisse der Gesamtfractionen sowie der einzelnen SEC-Größenbereiche wurden mittels des OC- und des ON-Detektors bestimmt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 39 und in Tabelle 40 zusammengefasst.

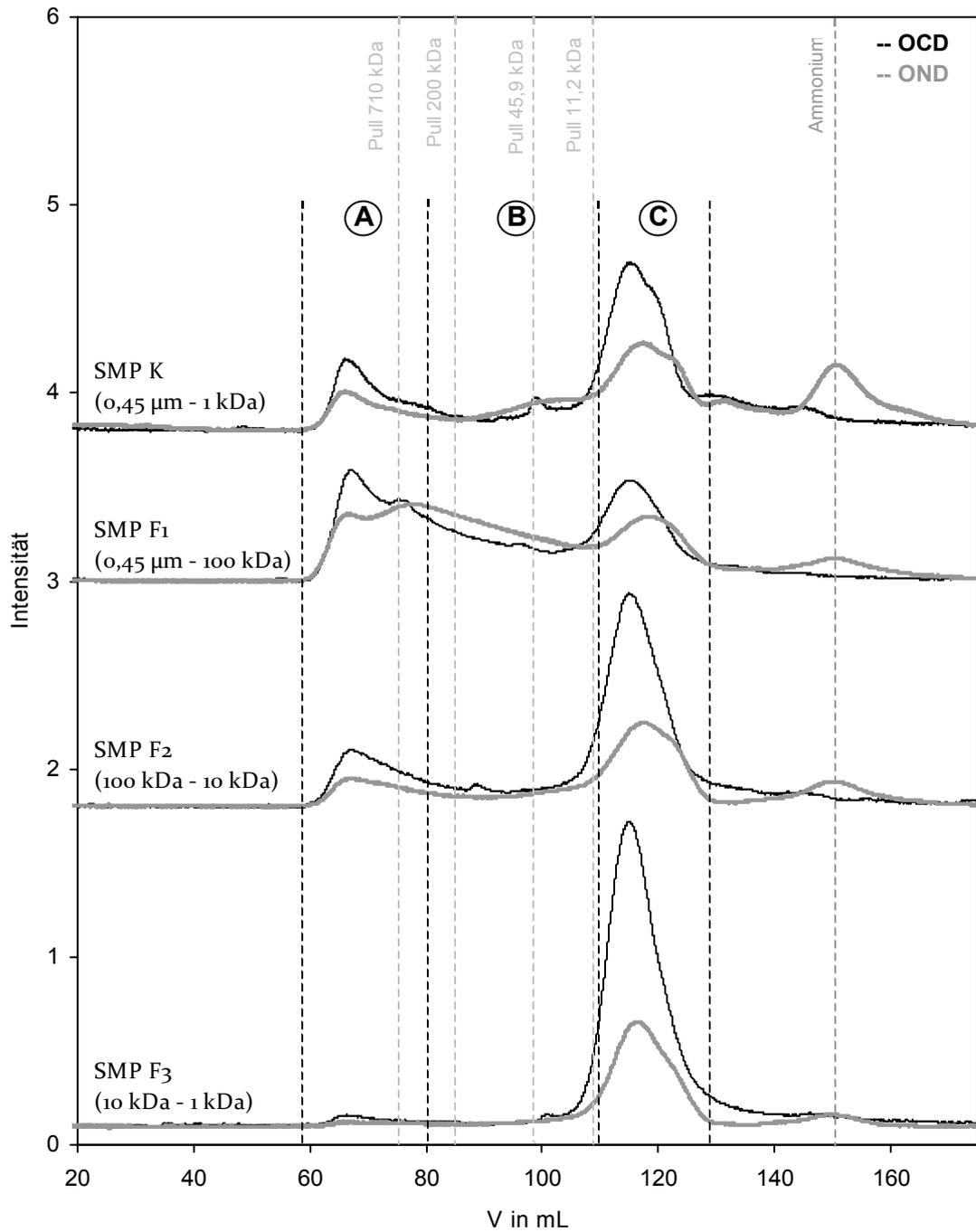


Abbildung 45: SEC-Chromatogramme der mst-UF-Fractionen mit OC- und ON-Detektor (SEC-Fraktion A: hochmolekular, B: mittelmolekular, C: niedermolekular).

Tabelle 39: N/C-Verhältnisse der mst-UF-Fractionen anhand von Elementaranalyse, Bypass- und säulenchromatographischen Messungen sowie DOC-Wiederfindungsraten der säulenchromatographischen Trennung in %.

Probe	N/C (mol/mol)			Wiederfindung in %	
	Element	Bypass	Säule	OCD	OND
SMP K (0,45 μ m -1 kDa)	0,15	0,13	0,20	63	95
SMP F1 (0,45 μ m - 100 kDa)	0,20	0,18	0,22	60	74
SMP F2 (100 kDa -10 kDa)	0,10	0,10	0,12	58	71
SMP F3 (10 kDa - 1 kDa)	0,09	0,06	0,08	71	94

Die im Bypass zur SEC-Trennsäule gemessenen N/C-Verhältnisse der LC-OCD/OND-Analyse stimmen gut mit den Werten der Elementaranalyse überein. Dabei ist folgende Tendenz zu erkennen. Im Vergleich zu der Gesamtprobe SMP K ist das N/C-Verhältnis in Fraktion SMP F1 höher, während das N/C-Verhältnis in den niedermolekularen Fraktionen F2 und F3 kleiner ist.

Wie bereits in Kapitel 4.3.1.3 beschrieben, kam es auch bei diesem SEC-System infolge unerwünschter irreversibler Adsorption von Probenbestandteilen an die Gelmatrix zu Minderbefunden. Die Wiederfindungsraten für OC lagen dabei zwischen 58 und 71 % und für ON zwischen 71 und 94 %. Das bedeutet, dass unterschiedliche Probenbestandteile in unterschiedlichem Maße irreversibel zurückgehalten werden, was folglich zu einer Veränderung des N/C-Verhältnisses der eluierten (und somit detektierbaren) Anteile führt. Der HOC-Gehalt ist in den einzelnen mst-UF-Fractionen auffallend hoch. Er liegt für die unfraktionierte Gesamtprobe bei 37 % des DOC. Für die einzelnen mst-UF-Fractionen ist eine Abnahme des HOC-Anteils mit abnehmender nomineller Größe der Fraktion zu erkennen; es werden somit v. a. hochmolekulare Probenanteile durch hydrophobe Wechselwirkungen irreversibel zurückgehalten.

Dies erklärt die niedrigen Wiederfindungsraten bei SEC-Untersuchungen von eEPS, die tendenziell einen höheren Anteil hochmolekularer Substanzen enthalten.

Es fällt auf, dass die Summe der Integrale der Größenbereiche A, B und C nicht die gesamte Integrationsfläche des Chromatogramms beschreibt. Obwohl alle Proben über eine 1 kDa Membran diafiltriert wurden, weisen die Chromatogramme OC- und ON-Signale im Größenbereich kleiner C auf. Mit zunehmender nomineller Molekülgröße der Fraktionen F1 – F3 wird der Anteil kleiner, was auf eine Entfernung der niedermolekularen Substanzen hindeutet. Neben der Anwesenheit niedermolekularer Substanzen können Signale außerhalb des kalibrierten Bereichs auch durch Wechselwirkungen zwischen dem Probenmaterial und dem Säulenmaterial entstehen, welche die Retentionszeiten im System verlängern

Tabelle 40: Relativer Massenanteil an DOC in % und N/C-Verhältnisse der drei Größenbereiche (A, B, C) der Probe SMP WM K und der drei SMP-Fraktionen bestimmt mittels organischem Kohlenstoff und Stickstoff Detektor.

Probe	Relativer Massenanteil DOC in %			N/C (mol/mol)		
	A	B	C	A	B	C
SMP K (0,45 μm - 1 kDa)	19	15	48	0,14	0,24	0,14
SMP F1 (0,45 μm - 100 kDa)	36	29	29	0,18	0,27	0,17
SMP F2 (100 kDa - 10 kDa)	18	18	54	0,11	0,12	0,10
SMP F3 (10 kDa - 1 kDa)	3	9	76	0,12	0,11	0,08

Mit ansteigender Fraktionsnummer finden eine Abreicherung der hochmolekularen (A) und der Substanzen im mittleren Molekülgrößenbereich (B) und eine Anreicherung des niedermolekularen Anteils (C) statt. Während in Fraktion F1 36 % der organischen gelösten Substanz im Größenbereich A eluieren, sind es in Fraktion F3 lediglich 3 %. Im Gegensatz dazu nimmt der niedermolekulare Anteil C von 29 % auf 76 % zu. Mittels der mst-UF hat somit eine Fraktionierung der SMP stattgefunden.

Eine klare Fraktionierung mittels mst-UF war jedoch nicht möglich. In Fraktion F1 und F2 sind erhebliche Anteile der niedermolekularen Substanzen C zu finden. Als Grund dafür kann die Anlagerung und Adsorption von SMP an die Membran während der (Dead-End-) Filtration gesehen werden, die zur Ausbildung einer Deckschicht führt. Die Deckschichtbildung und insbesondere das Porenfouling stellt eine zusätzliche Trennschicht dar. Dadurch wird die Trenngrenze der UF-Membranen verändert, was zu einem verstärkten Rückhalt von Molekülen mit einem kleinen hydrodynamischen Radius führt [Staudé 1992]. Als weitere Ursache können Wechselwirkungen zwischen der Probe und der Membran angesehen werden, die dazu führen, dass auch Moleküle zurückgehalten werden, deren Molmassen unterhalb des für die jeweilige Membran angegebenen MWCO liegen. Daneben spielt die Molekülkonformation (globulär oder fibrillär) eine wichtige Rolle. Nicht zuletzt liegt die „unscharfe“ Fraktionierung am Aufbau der Membranen, welche keine einheitlichen Porengrößen besitzen. Die nominellen Trenngrenzen der Membranen stellen keine scharfe Grenze dar, sondern geben die Größe der Moleküle an, welche die Membran unter Vernachlässigung der genannten Wechselwirkungen noch effizient Membran passieren können.

Die mst-UF ist daher nur beschränkt als Fraktionierungsverfahren einzusetzen. Makromolekulare Fraktionen enthalten stets Verunreinigungen durch niedermolekulare Fraktionen, so dass keine quantitative Trennung stattfindet. Dieser Effekt wurde auch bei der Fraktionierung von Huminstoffen festgestellt [Müller 2004]. Mittels der durchgeführten Diafiltration konnte kein wesentlicher Vorteil im Vergleich zu Untersuchungen von Müller (2004) erzielt werden.

In den einzelnen Größenbereichen A bis C ist eine Abnahme des N/C-Verhältnisses mit Verringerung der nominellen Molekülgrößenfraktionen SMP F1 bis F3 zu erkennen. Die größten N/C-Verhältnisse finden sich in den Größenbereich A und B der Fraktion SMP F1. Dies lässt auf eine Anreicherung makromolekularer N-haltiger Substanzen, wie z. B. Proteine, schließen. In kleineren Molekülgrößenbereichen findet dagegen eine Anreicherung von Kohlenhydrat- und/oder aliphatischen Strukturen statt, was durch die Ergebnisse der Elementaranalyse (Tabelle 38) unterstützt wird. Dieser Trend wurde auch bei der Untersuchung von dialysierten und nicht-dialysierten eEPS festgestellt (Abbildung 38).

4.3.2.4. ^{13}C NMR-spektroskopische Charakterisierung der SMP-Fraktionen

Die Ergebnisse der ^{13}C CPMAS NMR-spektroskopischen Untersuchungen der Gesamtprobe SMP K sowie der Fraktionen SMP F1, F2 und F3 sind in Abbildung 46 dargestellt. In Tabelle 41 sind die Integrationsdaten der chemischen Verschiebungsbereiche aufgeführt. Die geringe Probenmenge führte zu niedrigen S/N-Verhältnissen der Spektren (Tabelle 52, Anhang D), was zu Fehlern bei der quantitativen Auswertung führen kann (siehe Kapitel 4.1.1.3). Daher ist von einer quantitativen Auswertung der Proben SMP F1 - F3 und der Darstellung von Differenzspektren abgesehen worden. Für die NMR-spektroskopischen Untersuchungen mussten die SMP-Proben F1 - F3 mit Silikat aufgefüllt werden, um ein ausreichendes Probenvolumen zu erlangen. Dies führt zu niedrigeren C- und N-Gehalten bei der Elementaranalyse, jedoch zu keiner Beeinflussung der N/C-Verhältnisse.

Tabelle 41: Integrationsdaten der chemischen Verschiebungsbereiche der ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Probe SMP K und der SMP-Fraktionen F1 - F3.

Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %						
	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆	I _{6a}
	190-160 ppm	160-110 ppm	100-90 ppm	90-65 ppm	65-45 ppm	45-0 ppm	31-29 ppm
SMP K	17,7	6,0	4,3	22,3	14,2	32,6	2,8
SMP F1	17,5	8,1	3,1	22,1	16,3	32,7	2,9
SMP F2	17,1	7,9	4,6	21,3	15,7	32,5	3,5
SMP F3	17,9	7,0	2,9	19,3	14,5	38,4	--

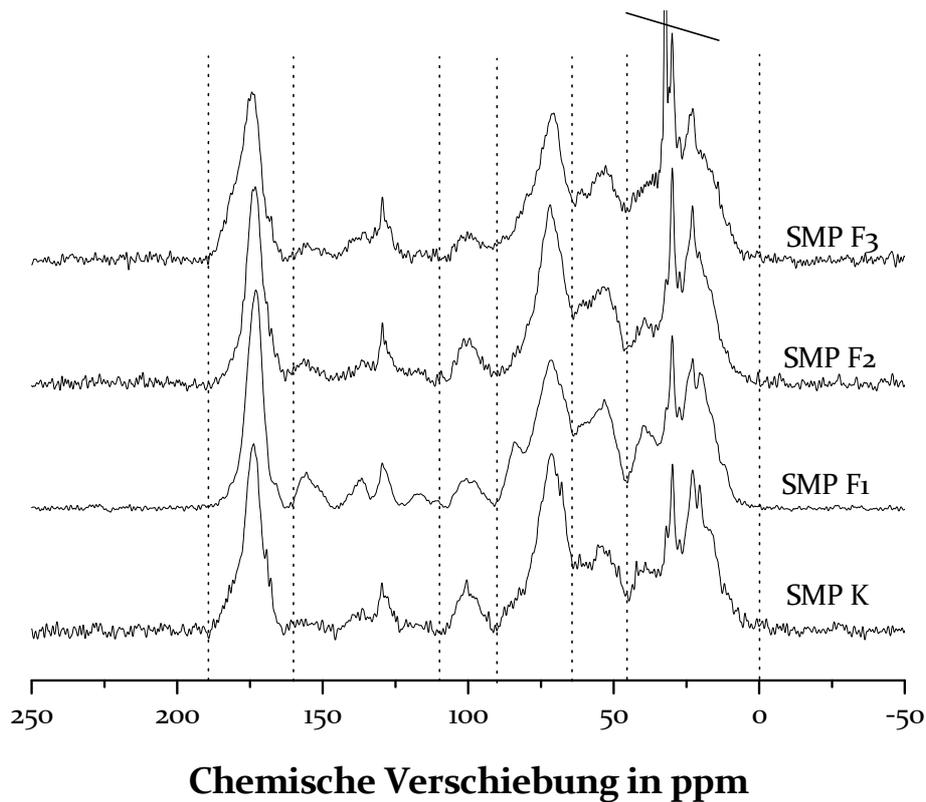


Abbildung 46: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Probe SMP K und der SMP-Fractionen F₁ - F₃ (Signal bei 32 ppm der Probe SMP F₃ ist wegen des begrenzten Bildausschnittes nicht ganz dargestellt).

Trotz der Fraktionierung mittels mst-UF zeigen die Spektren der einzelnen Fraktionen vom quantitativen Gesichtspunkt große Ähnlichkeiten. Zwischen den einzelnen Proben lassen sich jedoch strukturelle Unterschiede feststellen, die aufgrund der starken Anreicherung der niedermolekularen Anteile in allen Fraktionen schwach ausgeprägt sind. Das Signal bei 32 ppm in der Probe SMP F₃ kann auf Verunreinigungen zurückgeführt werden. Aufgrund der großen Signalintensität nimmt der relative Anteil der anderen Verschiebungsbereiche ab.

Die Gesamtprobe SMP K zeigt eine heterogene Verteilung der Signale in den verschiedenen Verschiebungsbereichen. Die Signale bei 100 ppm und 70 ppm sind stark ausgeprägt und zeigen eine Anreicherung von Kohlenhydraten gegenüber der Biomasse an. Die Anwesenheit von Proteinen wird durch Signale in den charakteristischen chemischen Verschiebungsbereichen sowie anhand des N/C-Verhältnisses von 0,15 deutlich. Das Signal der Peptidgruppen (160 bis 190 ppm) weist die größte Intensität auf.

Im Aliphaten-Bereich von 0 bis 45 ppm sind deutliche qualitative Differenzierungen zu sehen. Auffällig sind die gut aufgelösten Signale der n-Alkan-Strukturen (30 ppm) und der

Methylgruppen (20 bis 22 ppm). Ein hoher Anteil von Methylgruppen von bis zu 15 % konnte auch in verschiedenen Fraktionen eines Kläranlagenablaufs festgestellt werden [Lankes 2001]. Die Strukturen lassen sich auf Zellbestandteile und deren Abbauprodukte zurückführen.

Anhand der Integrale der verschiedenen Verschiebungsbereiche und des C-Gehalts (siehe Kapitel 4.2.2.4) werden eine maximale Kohlenhydrat-Konzentration von 23 % und eine maximale Protein-Konzentration von 44 % für die Gesamtprobe berechnet. Somit lassen sich 30 % der enthaltenen organischen Substanzen nicht auf Proteine und Kohlenhydrate zurückführen. Dies deutet auf die Anwesenheit sorbierter Stoffe aus der Umwelt oder Zellabbauprodukten hin.

Das NMR-Spektrum von Fraktion SMP F1 (0,45 μm - 100 kDa) weist die deutlichsten Unterschiede zu den Spektren der anderen Fraktionen auf, was auf die Anreicherung von hochmolekularen Substanzen zurückzuführen ist, wie durch SEC-Untersuchungen festgestellt wurde (vgl. Kapitel 4.3.2.3). Im Gegensatz zu den anderen Fraktionen weisen die α -C-Gruppen bei 50 ppm eine größere Signalintensität auf. Zusätzlich sind die Signale bei 84 ppm, 139 ppm sowie das DNA-Indikatorsignal bei 150 ppm ausgeprägter. Das deutet auf die Anreicherung von Proteinen und DNA hin, was durch ein erhöhtes N/C-Verhältnis (0,20) und einem SUVA-Wert von $1,5 \text{ L mg}^{-1} \text{ m}^{-1}$ bestätigt wird.

Fraktion SMP F2 (100 kDa - 10 kDa) weist eine höhere Intensität des chemischen Verschiebungsbereichs der O-Alkyl-Strukturen im Vergleich zu Fraktion F1 und F3 auf. Dies lässt sich auf eine relative Anreicherung von Kohlenhydraten im Vergleich zu den beiden anderen Größenfraktionen zurückführen. Des Weiteren ist der aliphatische Bereich bei Probe SMP F2 stärker ausgeprägt. Die Signale bei 30 ppm und 22 ppm treten gegenüber den anderen Fraktionen stärker hervor und lassen auf die Anreicherung von Zellwandstrukturen schließen. Es kann davon ausgegangen werden, dass der überwiegende Anteil der aliphatischen Strukturen auf n-Alkan-Strukturen und acetylierte Kohlenhydrate zurückzuführen ist. Dies hat eine Abnahme des N/C-Verhältnisses (0,10) zur Folge und wird auch aus den SEC-Chromatogrammen ersichtlich. Im Gegensatz zu den hochmolekularen Substanzen aus Probe F1 nehmen das N/C-Verhältnis und der SUVA-Wert in Fraktion F2 ab.

Fraktion SMP F3 (10 kDa - 1 kDa) weist gegenüber den anderen Fraktionen das niedrigste N/C-Verhältnis (0,09) auf, was z. T. auf Verunreinigungen zurückzuführen ist. In der Fraktion liegen vor allem Kohlenhydrat-Strukturen vor. Das im Gegensatz zu den Fraktionen F1 und F2 verbreiterte Signal im Amid/Carboxyl-Bereich deutet auf einen großen Anteil von Carboxyl-Gruppen hin. Aufgrund des großen relativen Anteils an der SMP-Gesamtprobe lässt sich die Signalverbreiterung auch im Spektrum von SMP K erkennen. Der hohe SUVA-Wert

($3,0 \text{ L mg}^{-1} \text{ m}^{-1}$) lässt sich anhand des NMR-Spektrums nicht erklären und kann auf die Verunreinigungen der Probe zurückgeführt werden.

4.3.3. Vergleich von eEPS und SMP - Ausblick

Um einen direkten Vergleich der eEPS und SMP zu ermöglichen und Unterschiede aufgrund verschiedener Reinigungsverfahren (Dialyse/mst-UF) zu minimieren, wurden die eEPS mittels 1 kDa Ultrafiltration nach dem gleichen Prinzip wie die SMP angereichert. Für den Vergleich wurden die eEPS beider Extraktionsmethoden herangezogen. Anhand der Ergebnisse wird ersichtlich, dass eEPS einer einzelnen Methode keine repräsentative Menge darstellt, was auch von Park und Novak (2007) beim Vergleich weiterer Extraktionsmethoden festgestellt wurde.

Die eEPS-Ausbeute und das N/C-Verhältnis der filtrierten eEPS F-NaOH-Probe (Tabelle 42) zeigen im Vergleich zu der dialysierten eEPS-Probe nur geringe Unterschiede. Im Gegensatz dazu nimmt das N/C-Verhältnis der filtrierten eEPS Hitze-Probe im Vergleich zur dialysierten Probe deutlich ab.

Tabelle 42: Ausbeuten der SMP K und der eEPS WM F-NaOH- (>1 kDa) und eEPS WM Hitze- (> 1kDa) Proben bezogen auf die organische Biofilm-Trockenmasse (TM) (Der Gehalt an anorganischen Substanzen (Aschegehalt: WM: ca. 45 %) wurde herausgerechnet).

Probe	Ausbeute in % TM	Anteil in %		Elementverhältnis N/C (mol/mol)
		N	C	
eEPS WM F-NaOH (> 1 kDa)	$4,7 \pm 1,2$	7,3	37,2	0,17
eEPS WM Hitze (> 1 kDa)	$8,5 \pm 0,6$	5,8	32,3	0,15
SMP K	$0,6 \pm 0,1$	6,9	37,8	0,15

Durch die Ultrafiltration kommt es bei der eEPS Hitze-Probe zum Rückhalt weiterer Kohlenhydrat-Strukturen, was durch das NMR-Spektrum (Abbildung 47) und das niedrigere N/C-Verhältnis ersichtlich wird. Dieser Trend ist im SEC-Chromatogramm (Abbildung 48) nicht zu erkennen, was auf Wechselwirkungen und Rückhalt von Kohlenhydraten auf der SEC-Säule schließen lässt.

Im Gegensatz dazu kommt es bei der eEPS F-NaOH-Probe durch die Ultrafiltration zu keiner zusätzlichen Anreicherung von Kohlenhydraten. Die bei der Dialyse (vgl. Kapitel 4.3.1.2) und der Ultrafiltration entfernten Substanzen weisen somit eine nominelle Molekülgröße kleiner 1 kDa auf, was die Vermutung einer Hydrolyse während der NaOH-Extraktion bestärkt.

In Abbildung 47 sind die ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der eEPS und der SMP dargestellt. Die zugehörigen Integralwerte sind in Tabelle 43 dargestellt.

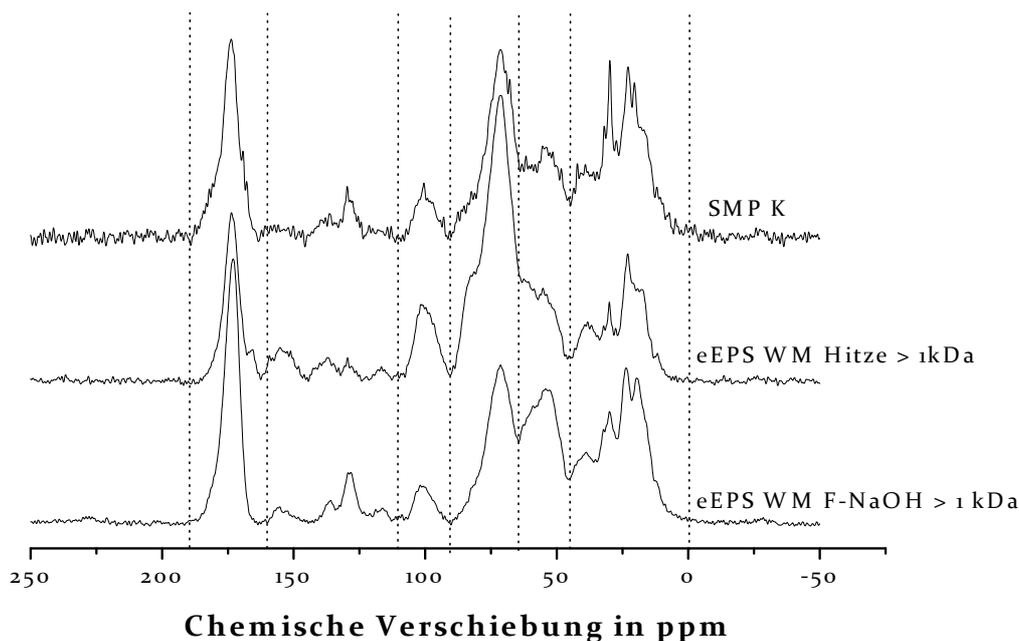


Abbildung 47: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der eEPS-Proben und SMP-Probe aus WM ($0,45\ \mu\text{m} - 1\ \text{kDa}$).

Tabelle 43: Integrationsdaten der chemischen Verschiebungsbereiche der ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Proben SMP K, eEPS WM F-NaOH und eEPS WM Hitze ($0,45\ \mu\text{m} - 1\ \text{kDa}$).

Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %					
	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆
	190-160 ppm	160-110 ppm	100-90 ppm	90-65 ppm	65-45 ppm	45-0 ppm
eEPS WM F-NaOH (>1 kDa)	19,7	6,3	3,4	18,6	20,2	30,9
eEPS WM Hitze (>1 kDa)	13,0	6,5	7,5	36,9	15,0	20,6
SMP K	17,7	6,0	4,3	22,3	14,2	32,6

Tabelle 44: Relativer C-Anteil in % der Kohlenhydrat- und Protein-Strukturen der Proben SMP K, eEPS WM F-NaOH und eEPS WM Hitze ($0,45\ \mu\text{m} - 1\ \text{kDa}$).

Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %	
	Kohlenhydrat	Protein
eEPS WM F-NaOH (> 1 kDa)	21,9	72,7
eEPS WM Hitze (> 1 kDa)	44,4	51,8
SMP K	26,7	58,6

In Tabelle 44 sind deutliche strukturelle Unterschiede zwischen der SMP- und den eEPS-Proben zu erkennen. Die SMP-Probe enthält einen größeren Anteil aliphatischer Strukturen. Der große Anteil von aliphatischen Substanzen beruht auf aliphatischen Zellwandstrukturen und deren Abbauprodukten, die im MBR akkumulieren, wie in Kapitel 4.3.2.4 diskutiert wurde.

Die Kohlenhydrat-Intensitäten liegen gegenüber der eEPS F-NaOH-Probe angereicht vor. Im Vergleich zur eEPS Hitze-Probe liegt jedoch ein kleinerer Kohlenhydrat-Anteil vor. Bei Protein-Strukturen ist ein umgekehrtes Verhalten zu erkennen. Während die SMP-Probe mehr Protein-Strukturen als die eEPS Hitze-Probe aufweist, liegen in der eEPS F-NaOH-Probe deutlich größere Signalintensitäten im Proteinbereich vor. Das führt zu einem höherem N/C-Verhältnis der eEPS F-NaOH-Probe und einem ähnlichen N/C-Verhältnis der eEPS-Hitze- und der SMP-Probe. Des Weiteren konnte DNA in der SMP- sowie der eEPS-Hitze-Probe identifiziert werden (vgl. Kapitel 4.3.2.4).

Sowohl bei den eEPS als auch bei den SMP lassen sich die überwiegenden Signalintensitäten in der Größenfraktion 0,45 μm bis 1 kDa auf Polymere mikrobiellen Ursprungs zurückführen. Zwischen 94 und 96 % der Signalintensitäten in den Spektren von eEPS F-NaOH und eEPS Hitze lassen sich Kohlenhydrat- und Protein-Strukturen zuordnen (Tabelle 22). Im Gegensatz dazu lassen sich diesen Strukturen im SMP-Spektrum lediglich 86 % der Signalintensitäten zuordnen (Tabelle 45). Das impliziert die Anwesenheit anderer Substanzklassen, welche auf Abbauprodukte der eEPS, intrazelluläre Substanzen und Zellwandstrukturen oder auf durch den Kläranlagenzufluss zugeführte organische Substanzen aus der Umwelt zurückzuführen sind.

Anreicherungen von aus der Umwelt sorbierten, auf Pflanzenabbauprodukten basierenden, Huminstoffen mit charakteristischen Signalen, wie z. B. von Ligninen, im aromatischen Bereich konnten trotz großer Fremdwassermengen in den SMP WM nicht nachgewiesen werden. Dies steht im Widerspruch zu Untersuchungen von Al-Halbouni et al. 2009 und Comte et al. 2006, welche erhebliche Anteile von Huminstoffen in eEPS und SMP festgestellt haben, jedoch eine unselektive photometrische Methode anwendeten.

Eine Anreicherung niedermolekularer Substanzen durch 1 kDa Ultrafiltration im Vergleich zur Dialyse konnte in den eEPS-Proben mittels SEC nicht festgestellt werden. Die SEC-Chromatogramme der ultrafiltrierten Proben zeigen einen ähnlichen Verlauf wie die der dialysierten Proben (Abbildung 48). Aufgrund der niedrigen Wiederfindungsraten (eEPS WM F-NaOH 55 %, eEPS WM Hitze 53 %) kann jedoch auch hier davon ausgegangen werden, dass Wechselwirkungen zwischen HOC und der SEC-Säule stattgefunden haben und weitere Strukturen vorhanden sind.

Somit werden mit beiden Aufreinigungsmethoden für die eEPS F-NaOH Methode ähnliche Proben erhalten, während es bei der Hitze-Extraktion zu einer ausgeprägteren Anreicherung von Kohlenhydrat-Strukturen mittels mst-UF kam.

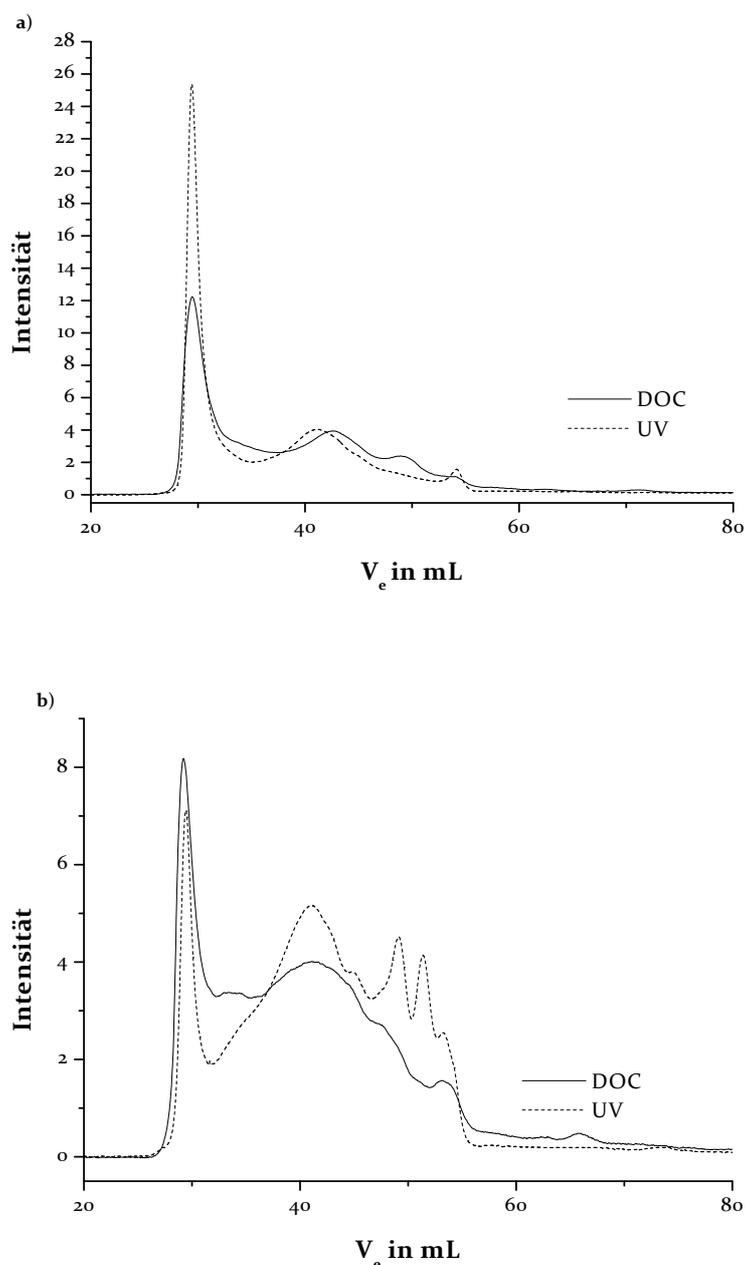


Abbildung 48: SEC-Chromatogramme der 1 kDa filtrierten Probe eEPS WM Hitze (a) und der eEPS WM F-NaOH mit DOC- und UV₂₅₄-Detektion (Die Flächen der Chromatogramme sind auf die gleichen Intensitäten normiert).

Die SEC-Chromatogramme der SMP (Kapitel 4.3.2.3) weisen auf einen größeren Anteil niedermolekularer Substanzen in den SMP hin, auch wenn ein direkter Vergleich aufgrund der verschiedenen Systeme (SEC-Säulen, Säulenkombinationen, Detektoren) nicht möglich ist. Sowohl in den dialysierten als auch in den 1 kDa filtrierten eEPS-Proben konnte ein größerer Anteil von 30 bis 35 % Makromolekülen zugeschrieben werden, während die SMP einen Anteil von ca. 20 % aufwiesen.

Mit abnehmender Molekülgröße weisen die SMP eine Zunahme aliphatischer Gruppen mit hydrophoben Eigenschaften auf. In Studien von Al-Halbouni (2008) wurden EPS mit einer Molekülgröße von kleiner 10 kDa und besonders aliphatische Verbindungen mit Membranfouling in MBR in Zusammenhang gebracht. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann angenommen werden, dass es sich dabei um niedermolekulare Abbauprodukte von Zellstrukturen und Zellwänden handelt. Im folgenden Kapitel 4.4 wird der Einfluss der eEPS und SMP auf das Fouling daher näher untersucht.

4.4. Makromolekulares Fouling in Membranbioreaktoren

Die Grundlagen des Foulings in MBR wurden in den Kapiteln 2.4.6.1 und 2.5.3 beschrieben. Eine differenzierte Betrachtung sowohl des Aufbaus (Poren-/Kuchenfouling) als auch der chemischen Komponenten (Protein/Kohlenhydrate) ist bisher nur unzureichend durchgeführt worden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse von Foulingexperimenten aus dem kleintechnischen MBR UNSW dargestellt. Getauchte Hohlfasermembranmodule wurden nach definierter Filtrationszeit bei verschiedenen Betriebsweisen aus dem MBR entnommen, die Deckschicht mittels physikalischer und chemischer Verfahren fraktioniert und deren Zusammensetzung analysiert. Zusätzlich wurde der durch die einzelnen Fraktionen verursachte Widerstand bestimmt und Rückschlüsse auf die Struktur der einzelnen Fraktionen gezogen. Die Ergebnisse liefern ein tieferes Verständnis über den Aufbau der Foulingschichten in MBR in Abhängigkeit verschiedener Betriebsweisen.

4.4.1. Einfluss von Betriebsweisen auf den transmembranen Druck

In diesem Abschnitt wird das Ausmaß des Foulings bei vier verschiedenen Betriebsweisen (kontinuierlich, mit Rückspülung, mit Relaxation, mit verschiedenen Permeatflüssen und Rückspülung (Mixed-Modus)) miteinander verglichen (siehe Kapitel 3.5.1).

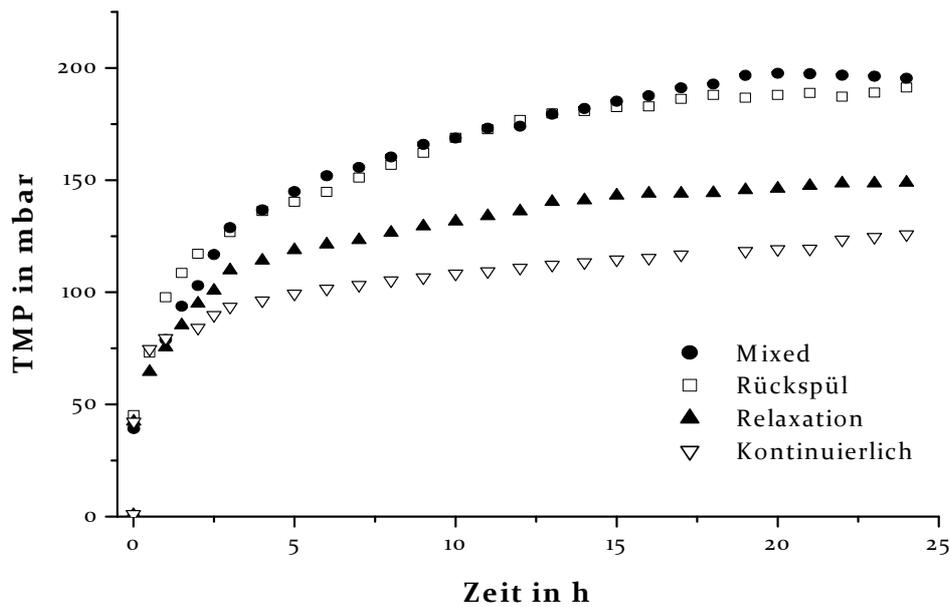


Abbildung 49: Entwicklung des transmembranen Druckes (TMP) bei verschiedenen Betriebsweisen (gleicher Netto-Permeatfluss) innerhalb von 24 h (Der TMP-Verlauf während Rückspül- und Relaxationszeiten ist nicht dargestellt).

Die Entwicklung des TMP zeigt deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Betriebsweisen (Abbildung 49). Nach einer Filtrationszeit von 24 h wird der niedrigste TMP von 125 mbar mit dem kontinuierlichen Modus und der höchste TMP von 195 mbar mit dem Mixed-Modus erzielt. Dies spiegelt sich auch in der Brutto-Permeabilität (bezogen auf die momentane und nicht die durchschnittliche Permeatmenge) wider, welche bei der kontinuierlichen Betriebsweise am größten war (Tabelle 45).

Tabelle 45: Hydraulische Leistung bei verschiedenen Betriebsweisen nach 24 h.

Betriebsweise	Kontinuierlich	Relaxation	Rückspül	Mixed
Parameter				
TMP [mbar]	125	149	190	195
Brutto-Permeabilität [L/m ² h bar]	160	146	131	117 (J = 20)

Anhand der Foulingrate (Gleichung 31) lässt sich die Foulingbildung zu verschiedenen Filtrationszeiten vergleichen und charakterisieren, wie in Abbildung 50 dargestellt ist.

$$Foulingrate = \frac{\Delta p_{TMP}}{\Delta t} \quad (31)$$

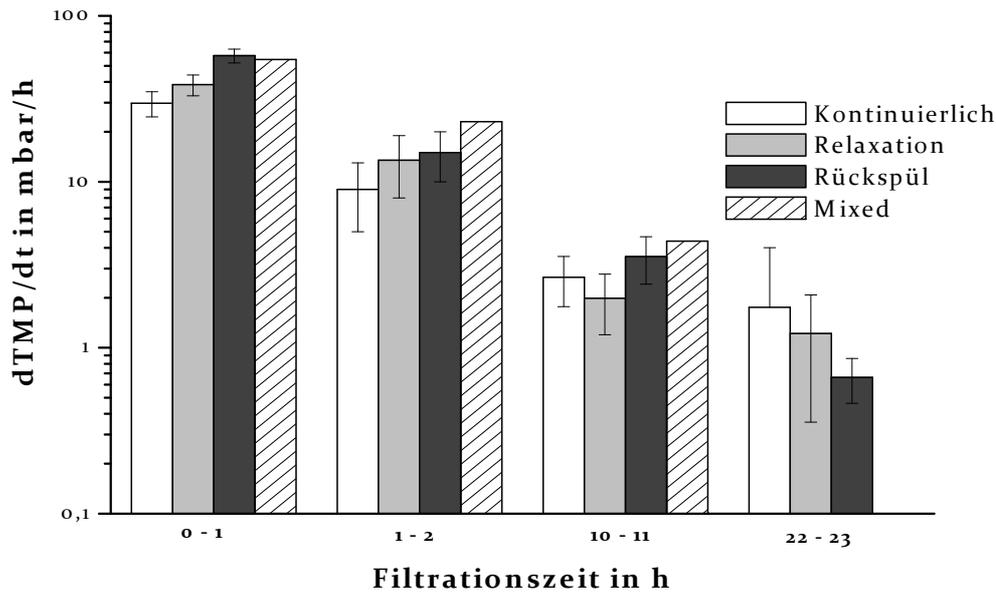


Abbildung 50: Foulingraten bei verschiedenen Betriebsweisen zu verschiedenen Zeiten des Foulingexperiments (logarithmische Darstellung).

Die größten Unterschiede zwischen den Foulingraten für die verschiedenen Betriebsweisen treten während der ersten Stunde des Filtrationsprozesses auf. Dabei ist eine Abhängigkeit der Foulingrate vom Brutto-Permeatfluss zu erkennen, so dass der Rückspül- und der Mixed-Modus die höchsten Foulingraten von ca. 55 mbar/h aufweisen. Im Gegensatz dazu nimmt der TMP beim kontinuierlichen Modus nur um etwa 30 mbar/h zu. Die Foulingraten beim Mixed-Modus können auf den hohen Brutto-Permeatfluss ($40 \text{ L/m}^2\text{h}$) während der ersten 80 s des Filtrationszyklusses zurückgeführt werden, welche nicht durch den anschließenden niedrigeren Permeatfluss ($20 \text{ L/m}^2\text{h}$) kompensiert werden konnten.

In der ersten Stunde des Filtrationsprozesses ist ein überproportionaler Zusammenhang zwischen den Foulingraten und dem angelegten Permeatfluss erkennbar. Eine Steigerung des Permeatflusses um 25 % führt nahezu zu einer Verdopplung der Foulingrate; ein Phänomen, das in ähnlicher Ausprägung in anderen Studien festgestellt wurde [Germain et al. 2004, Chua et al. 2002].

Der schnelle Anstieg des hydraulischen Widerstands zu Beginn der Filtration wird durch rasche Akkumulation und Adsorption von Biopolymeren auf der Membran hervorgerufen. Bei Membranen, die mit höherem Permeatfluss betrieben werden, werden im Vergleich zu Membranen mit niedrigerem Permeatfluss im gleichen Zeitintervall mehr SMP an die Membranoberfläche transportiert. Dies führt zu einer höheren Konzentration gelösten organischen Materials an der Membranoberfläche und zu einer ausgeprägteren

Konzentrationspolarisation [Gorenflo 2003]. Nach vollkommener Bedeckung der Adsorptionsplätze der Membran findet eine Stabilisierung des hydraulischen Widerstands statt, wie auch von Tardieu et al. (1998) erkannt wurde. Im weiteren Verlauf der Filtration kommt es zunehmend zur Ausbildung eines Foulingkuchens auf der Membran und zu einer Verringerung der Foulingrate.

Nach einer Stunde haben die Foulingraten bei allen Betriebsweisen signifikant abgenommen und stellen nur noch ca. 30 % der anfänglichen Foulingrate dar. Nach 10 h liegen ähnliche Foulingraten bei den verschiedenen Betriebsweisen vor (ca. 3 mbar/h) und nach 22 h ist die Foulingrate für alle Betriebsweisen außer dem kontinuierlichen Modus kleiner als 1 mbar/h. Die TMP-Unterschiede nach 24 h am Ende des Filtrationsexperiments lassen sich somit auf die unterschiedlich ausgeprägten Foulingvorgänge (Porenverblockungs- und Kuchenbildungsprozesse) innerhalb der ersten Stunden der Filtration zurückführen. Dies stimmt mit Beobachtungen von Hong et al. (2002) überein, die festgestellt haben, dass sich Membranfouling besonders durch die anfängliche Permeationsrate kontrollieren lässt. Höhere Brutto-Permeatflüsse haben somit einen großen Einfluss auf die Foulingbildung, welche durch die physikalischen Reinigungsverfahren nicht kompensiert werden konnte.

MBR werden unterhalb des kritischen Flusses betrieben. Das starke Ansteigen der Foulingrate bei Flüssen größer $20 \text{ L/m}^2\text{h}$ lässt vermuten, dass der kritische Fluss überschritten wurde, was zu starkem Fouling führt [Field et al. 1995] und besonders zu Beginn des Mixed- und des Rückspül-Modus auftritt. Ziel des hohen Flusses zu Beginn des Mixed-Modus war es rasch eine schützende Kuchenfoulingschicht auszubilden, die dem schnellen anfänglichen Porenfouling entgegenwirkt. Auf Grundlage der Ergebnisse konnte dieser Effekt jedoch nicht beobachtet werden, so dass durch die variierenden Filtrationsflüsse kein Vorteil generiert werden konnte.

Zusätzlich kann beim Mixed- und Rückspül-Modus durch häufiges Rückspülen Fouling an der Innenseite der Membranen auftreten. In verschiedenen Studien wurde gezeigt, dass kleine Kolloide und Biopolymere MF-Membranen passieren [Lyko et al. 2007, Laabs et al. 2006] und besonders zu Beginn des Filtrationsprozesses, wenn noch keine sekundäre Filtrationsschicht in Form eines Filterkuchens entwickelt ist, nicht komplett zurückgehalten werden. Durch Umkehrung der Filtrationsrichtung während des Rückspülprozesses können sich die gelösten Kolloide und Biopolymere an die Innenseite der Membran anlagern, was den Gesamt-Foulingwiderstand erhöht.

4.4.2. Charakterisierung der Foulingschichten

Membranfouling kann in verschiedenen Ausprägungen auftreten. Im Folgenden wird zwischen reversiblen und irreversiblen Fouling sowie zwischen Oberflächen- (Kuchenfouling) und Porenfouling unterschieden.

Um Informationen über den Aufbau der Deckschichten zu bekommen, wurden diese nach einer definierten Filtrationsdauer mittels verschiedener Reinigungsschritte in drei Fraktionen (locker gebundene, reversible Kuchenfoulingschicht (oben), reversible Porenfoulingschicht (mitte), irreversible Foulingschicht (unten)) unterteilt. Von den einzelnen Schichten wurden die gesamte und die gelöste Biopolymer-Konzentration bestimmt. Zusätzlich wurden ^{13}C CPMAS NMR-Spektren von den unfraktionierten Foulingschichten aufgenommen.

Der Beitrag der jeweiligen Schicht zum Gesamt-Foulingwiderstand wurde mittels des Widerstandsmodells quantifiziert. Durch Messung der Membran-Permeabilität vor Versuchsbeginn, nach Versuchsbeginn und nach den verschiedenen Reinigungsschritten, konnte das Ausmaß der einzelnen Deckschichtfraktionen auf den Gesamt-Foulingwiderstand ermittelt und ein spezifischer Widerstand der einzelnen Schichten bestimmt werden. Die Ergebnisse lassen Rückschlüsse auf die Zusammensetzung und Struktur der Deckschicht zu.

4.4.2.1. Zusammensetzung der Foulingschichten

Der gesamte und gelöste Biopolymer-Anteil wurde als Summe der Proteine und Kohlenhydrate in den drei erhaltenen Foulingschichten gemessen. Dabei enthält der Gesamt-Biopolymer-Anteil sämtliche partikulären (Biomasseflocken, Zellen, EPS) und gelösten Substanzen (SMP), während der gelöste Biopolymer-Anteil nur die SMP beinhaltet.

In Abbildung 51 ist die Gesamt-Biopolymer-Masse der einzelnen Schichten basierend auf der biochemischen Protein- und Kohlenhydrat-Messung dargestellt. Durch unzureichende Hydrolyse mittels der biochemischen Methoden kann es zu einer Unterbestimmung der Gesamt-Biopolymer-Konzentration kommen, wie in Kapitel 4.2.2.4 beschrieben wird. Im Gegensatz dazu kann von einer vollständigen quantitativen Analyse der gelösten Biopolymer-Konzentration ausgegangen werden.

An dieser Stelle wird darauf hingewiesen, dass die Massenanteile der verschiedenen Schichten stark von den physikalischen und chemischen Fraktionierungsmethoden abhängen. Verschiedene Reinigungszeiten sowie Rückspül-Permeatflüsse resultieren in unterschiedlichen Fraktionen. Die Ergebnisse geben jedoch einen Einblick in die Verteilung verschiedener Biopolymere in der Foulingschicht.

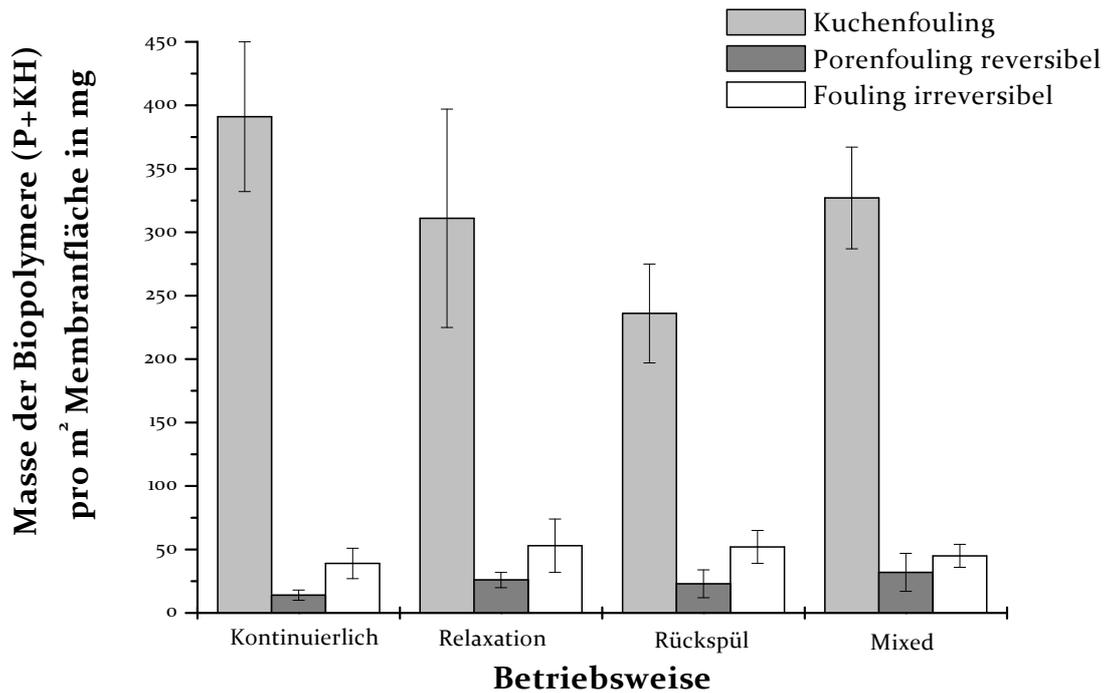


Abbildung 51: Gesamt-Biopolymer-Masse der verschiedenen Foulingschichten (Kuchenfouling, Porenfouling reversibel, Fouling irreversibel) in Abhängigkeit von der Betriebsweise.

Der Filterkuchen, der sich durch Spülen der Membran entfernen ließ, zeigt für sämtliche Betriebsweisen die höchste Gesamt-Biopolymer-Masse. Dabei weisen die in der kontinuierlichen Betriebsweise betriebenen Membranen den höchsten Anteil (390 mg/m^2) auf, da weder eine Relaxationspause noch eine Rückspülung stattgefunden hat, um den locker gebundenen Kuchen zu entfernen. Die im Rückspül-Modus betriebenen Membranen weisen den geringsten Anteil (230 mg/m^2) auf, was auf eine effektive Entfernung des Filterkuchens durch das periodische Rückspülen zurückzuführen ist.

Die Gesamt-Biopolymer-Masse in der reversiblen Porenfoulingschicht stellt für alle untersuchten Membranen den geringsten Anteil der drei Schichten dar (15 bis 30 mg/m^2). Im Mixed-Modus wurde die größte Masse an Biopolymeren in dieser Schicht gefunden. Dies basiert auf dem hohen Permeatfluss zu Beginn der Filtrationsperiode, welcher den Filterkuchen stärker auf die Membran presst, so dass dieser im Folgenden durch Spülen nicht vollkommen entfernt werden konnte.

Die irreversible Foulingschicht, welche sich nur durch chemische Reinigung entfernen ließ, stellt bei allen untersuchten Membranen den zweit größten Gesamt-Biopolymer-Anteil dar. Die gelöste Biopolymer-Masse der verschiedenen Schichten gemessen als Summe von Proteinen und Kohlenhydraten ist in Abbildung 52 dargestellt.

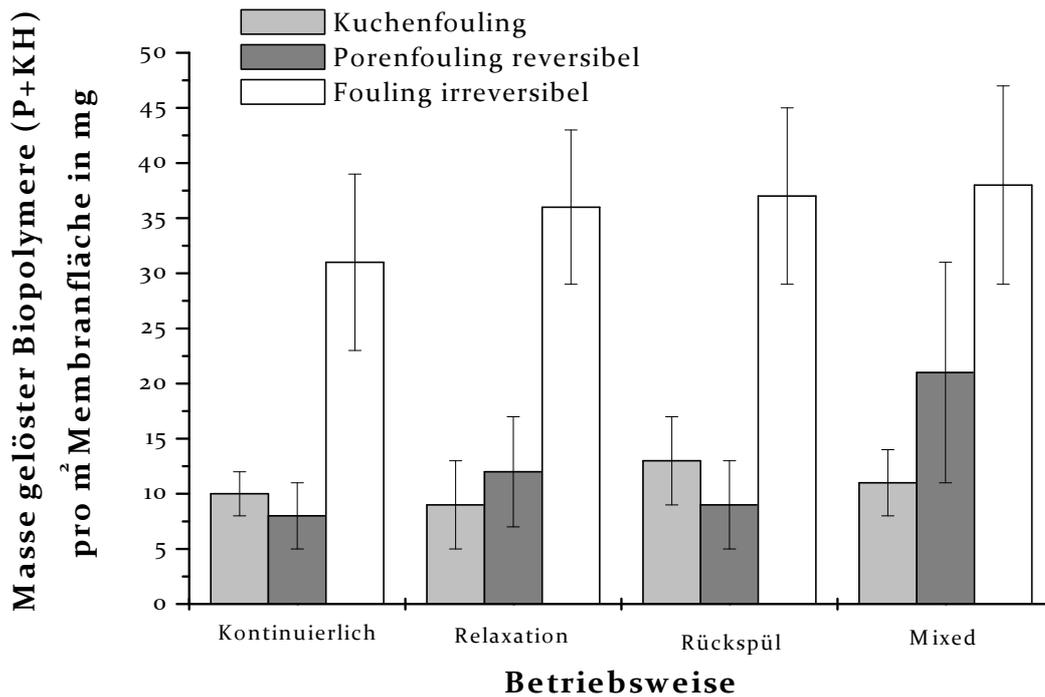


Abbildung 52: Gelöste Biopolymer-Masse der verschiedenen Schichten (Kuchenfouling, Porenfouling reversibel, Fouling irreversibel) in Abhängigkeit von der Betriebsweise.

Die gelösten Biopolymere zeigen eine entgegengesetzte Konzentrationsverteilung in der Foulingschicht im Vergleich zu den Gesamt-Biopolymeren. Die unteren, irreversibel gebundenen Schichten enthalten jeweils einen größeren SMP-Anteil als die darüber liegenden reversibel gebundenen Schichten. Der Anteil der SMP an der Gesamt-Biopolymer-Masse sowie das P/KH-Verhältnis der einzelnen Foulingschichten sind in Tabelle 46 dargestellt.

Tabelle 46: Protein/Kohlenhydrat-Verhältnis der Gesamt-Biopolymere und der gelösten Biopolymere in den verschiedenen Foulingschichten und Anteil der gelösten Fraktion an der Gesamt-Fraktion in %.

Fraktion	Betriebsweise			
	Kontinuierlich	Relaxation	Rückspül	Mixed
Kuchenfouling				
Gesamt-Biopolymere	2,2	2,0	2,2	1,8
gelöste Biopolymere	0,7	0,8	0,2	0,6
$\rho(\text{gelöst})/\rho(\text{Gesamt})$ [%]	3	3	6	3
Porenfouling rev.				
Gesamt-Biopolymere	1,0	0,7	0,6	0,8
gelöste Biopolymere	0,7	0,5	0,4	0,9
$\rho(\text{gelöst})/\rho(\text{Gesamt})$ [%]	55	47	37	65
Fouling irrev.				
Gesamt-Biopolymere	1,3	1,6	0,9	1,2
gelöste Biopolymere	1,4	1,7	1,1	1,1
$\rho(\text{gelöst})/\rho(\text{Gesamt})$ [%]	79	68	72	84

Die Gesamt-Biopolymer-Fractionen der Filterkuchen weisen ein ähnliches P/KH-Verhältnis wie die Biomasse ($P/KH = 1,9$) auf, während in den gelösten Biopolymer-Fractionen eine deutliche Anreicherung von Kohlenhydraten festzustellen ist, was sich in einer Abnahme des P/KH-Verhältnisses äußert. Aufgrund der geringen SMP-Anteile und der ähnlichen P/KH-Verhältnisse zur Biomasse in den Filterkuchen kann davon ausgegangen werden, dass diese überwiegend aus locker gebundener Biomasse bestehen, wie in anderen Studien vermutet wurde [Wang et al. 2007]. Durch Ergebnisse der Festkörper-NMR-Analysen konnte diese Vermutung bestätigt werden (vgl. Kapitel 4.4.2.2).

Die reversible Porenfoulingschicht besteht zu einem deutlich größeren Anteil aus gelösten Biopolymeren (37 – 65 %). Das P/KH-Verhältnis in dieser Schicht ist für die gesamten und die gelösten Biopolymer-Fractionen ähnlich und überwiegend kleiner als 1. Dies impliziert eine Anreicherung von Kohlenhydraten. Kohlenhydrate scheinen nur leicht an die Membranoberfläche zu adsorbieren und können durch Rückspülen entfernt werden. Dies lässt sich u.a. auf deren strukturellen Aufbau zurückführen und wird am Ende des Kapitels ausführlicher diskutiert.

Auch Chen et al. (2006) konnten mittels fluoreszierender Farbstoffe eine Konzentrierung von beta-D-Glucopyranose-Einheiten in einer organischen Foulingschicht etwa 1 μm über der Membran entdecken und vermuteten eine entscheidende Rolle von Kohlenhydraten bei der Anlagerung von weiteren Biopolymer-Schichten.

Die untere, irreversible Foulingschicht enthält bei allen Betriebsweisen den größten Anteil an SMP (68 - 84 %), was ähnliche P/KH-Verhältnisse der gesamten und gelösten Biopolymer-Masse zur Folge hat. Während im Vergleich zum Filterkuchen eine Abreicherung von Proteinen stattfindet, kann im Vergleich zur reversiblen Porenfoulingschicht eine Anreicherung von Proteinen festgestellt werden, die sich in einer Zunahme des P/KH-Verhältnisses widerspiegelt. Ein vergleichbares P/KH-Verhältnis extrahierter Foulingkomponenten von 1,4 wurde auch von Yamoto et al. (2006) bei Filtrationsversuchen mit PVDF-Membranen festgestellt.

Bei den Filtrationsmodi ohne Rückspülung ist eine ausgeprägte Zunahme des P/KH-Verhältnisses in der irreversiblen Foulingschicht gegenüber der reversiblen Porenfoulingschicht festzustellen. Aufgrund der Vielzahl funktioneller Gruppen und der daraus resultierenden heterogenen Eigenschaften, kann davon ausgegangen werden, dass Proteine fester als Kohlenhydrate an Membranen binden [Chu et al. 2005] und sich nur durch Rückspülung oder chemische Reinigung entfernen lassen. Des Weiteren spielt die Molekülstruktur der Polymere eine entscheidende Rolle. Während Kohlenhydrate als langkettige lineare Polymere oder verzweigte flexible Knäuel vorliegen, bilden Proteine oft kompaktere, globuläre Strukturen, welche einfacher in die Poren eindringen können und dort aufgrund sterischer Effekte zurückbleiben. Proteine weisen somit eine größere Tendenz als Kohlenhydrate auf sich an der Membranoberfläche anzulagern und in die Poren einzudringen.

4.4.2.2. ¹³C NMR-Analyse der Foulingschichten

Um detaillierte Informationen über die Zusammensetzung der Deckschicht zu erhalten wurden die gefriergetrockneten Proben zweier Deckschichten (kontinuierlicher Modus und Relaxations-Modus) mittels ¹³C CPMAS NMR-Spektroskopie untersucht. Dabei wurde keine Fraktionierung vorgenommen, da besonders von den untenliegenden Foulingschichten keine ausreichende Menge an Probenmaterial vorlag. Da Foulingschichten in MBR überwiegend aus organischen Komponenten bestehen [Bin et al. 2008], sind die NMR-Spektren gut aufgelöst.

Die Spektren der Deckschichten weisen ein ähnliches Intensitätsmuster wie die Biomasse-Spektren auf (Abbildung 53). Dennoch sind quantitative Unterschiede im Differenzspektrum in Bezug auf die Biomasse MBR UNSW zu erkennen (Abbildung 54).

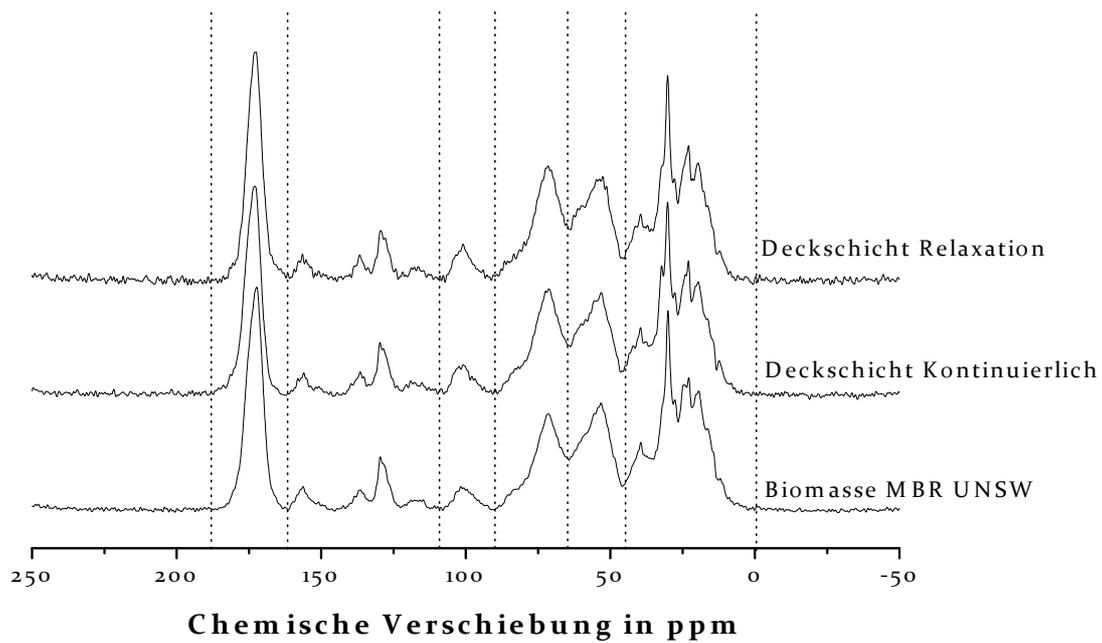


Abbildung 53: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Biomasse MBR UNSW sowie der Deckschichten verschiedener Betriebsweisen (Relaxation und Kontinuierlich).

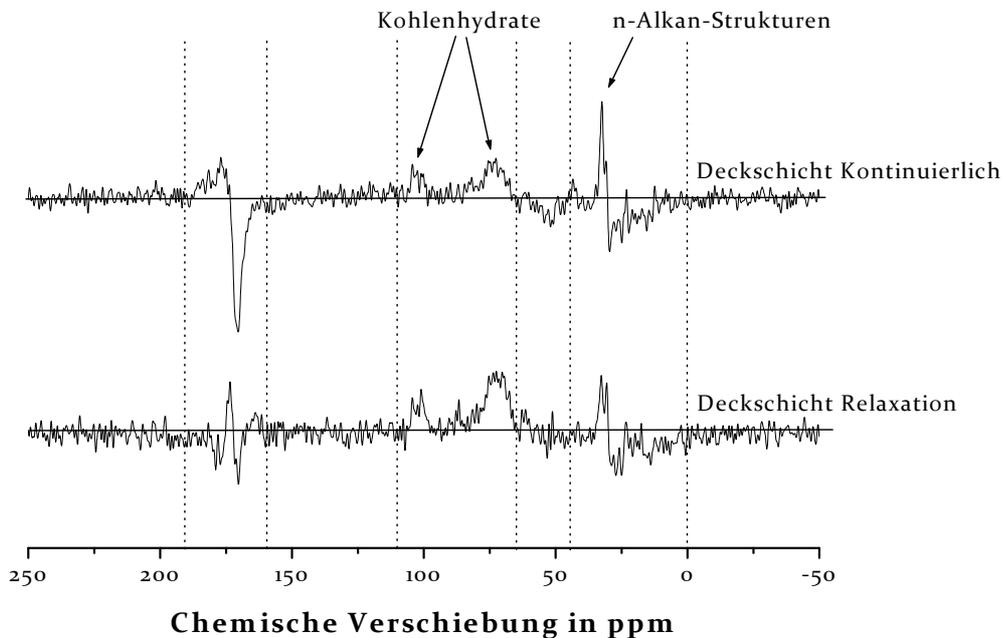


Abbildung 54: Differenzspektren von Deckschichten verschiedener Betriebsweisen (Kontinuierlich und Relaxation) im Bezug auf die Biomasse aus MBR UNSW (Die Deckschicht-Spektren wurden jeweils von dem Biomasse-Spektrum subtrahiert).

Die Signale weisen auf eine relative Abnahme der proteinogenen Strukturen (α -C, Amid-C, aliphatische C) und eine relative Anreicherung von Kohlenhydraten (O-Alkyl-Strukturen) in den Deckschichten im Vergleich zur Biomasse im MBR hin. Dies lässt sich durch die Anreicherung von Kohlenhydraten in den unteren Foulingschichten erklären, wie mittels biochemischer Methoden festgestellt wurde. Bei beiden Deckschichten ist zusätzlich eine relative Anreicherung der n-Alkan-Strukturen (30 ppm) zu erkennen. Die An- bzw. Abreicherungen sind in der kontinuierlichen Deckschicht aufgrund der fehlenden physikalischen Reinigung stärker ausgeprägt.

Sowohl die Zunahme der Kohlenhydrat-Strukturen als auch der aliphatischen Strukturen lässt auf eine Anreicherung von SMP in der Deckschicht schließen. Wie in Kapitel 4.3.2.4 dargestellt wurde, weisen SMP mit abnehmender Molekülgröße eine Zunahme aliphatischer Strukturen mit hydrophoben Eigenschaften sowie eine Zunahme von Kohlenhydrat-Strukturen auf. In Studien von Al-Halbouni et al. (2009) wurden aliphatische Verbindungen aus Lipopolysacchariden mit Membranfouling in MBR in Zusammenhang gebracht. Al-Halbouni et al. (2009) vermuten, dass die hydrophoben Bereiche der EPS bzw. SMP einen wesentlichen Beitrag zum Fouling liefern und sich aufgrund hydrophober Wechselwirkungen bevorzugt an der Membran anlagern. Das Fettsäureprofil der extrahierten Substanzen wies dabei auf die Anwesenheit von bakteriellen Fettsäuren (C16:0 und C18:0) hin, die überwiegend aus gram-negativen Bakterien stammen [Haack et al 1994, Basile et al. 1995]. Der Anteil von Fettsäuren in EPS, welche von Membranen extrahiert wurden, war dabei deutlich höher (10%) als der Anteil von Fettsäuren in der Biomasse und im Überstand (1 - 3%). Dies erklärt die Zunahme des n-Alkan-Signals in den Spektren der Deckschichten.

EPS von extrahierten Membranen waren überwiegend kleiner 10 kDa, was Al-Halbouni et al. (2009) auf die Anwesenheit von Huminstoffen und deren building blocks sowie auf niedermolekulare organische Komponenten zurückführten. Auf Grundlage der vorliegenden Ergebnisse kann angenommen werden, dass es sich dabei um niedermolekulare Abbauprodukte von Zellstrukturen und Zellwänden handelt.

Besonders die hydrophoben Gruppen der EPS können zu Beginn des Foulingexperiments an die ebenfalls hydrophoben PVDF-Membranen adsorbieren. Dies erklärt die Beobachtung von Le Clech et al. (2006), dass hydrophobe Membranen zu Beginn des Filtrationsprozesses größere Foulingeigenschaften als hydrophile Membranen aufweisen. Eine Anreicherung von aliphatischen Strukturen, besonders von langkettigen Fettsäuren, wurde auch von Lankes et al. (2008) bei der UF von gelösten organischen Substanzen festgestellt, was ebenfalls auf Wechselwirkungen der hydrophoben Substanzen mit den Membranen zurückgeführt wurde.

Aufgrund der Ähnlichkeit der ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Deckschichten und der Biomasse kann jedoch davon ausgegangen werden, dass der Großteil der Deckschicht aus angelagerter Biomasse besteht und SMP nur einen geringen Anteil an der Gesamt-Deckschicht darstellt. Auf Grundlage der Ergebnisse kann somit vermutet werden, dass sich besonders SMP mit kleinen Molekülgrößen in der Foulingschicht anreichern, an die Membran

anlagern und die Poren der Membran sowie des Filterkuchens auffüllen, was in ähnlicher Ausprägung von Meng et al. (2006) festgestellt wurde.

Die Ergebnisse der NMR-Untersuchungen geben somit weitere Erkenntnisse über die Zusammensetzung der Foulingschicht, welche mittels der biochemischen Methoden im Rahmen der Arbeit nicht aufgeklärt werden konnten. Dennoch wird im Weiteren nicht näher auf das Fouling durch aliphatische Substanzen eingegangen, da der Fokus der Arbeit auf den Hauptkomponenten der SMP und eEPS, den Proteinen und Kohlenhydraten, lag.

4.4.2.3. Hydraulischer Widerstand der Foulingschichten

Der Membran-Gesamt-Widerstand R_{Total} wurde mittels des Brutto-Permeatflusses der verschiedenen Filtrations-Modi und der jeweiligen TMP berechnet. R_{Membran} , $R_{\text{Spülung}}$ (Widerstand nach Spülung) und $R_{\text{Rückspülung}}$ (Widerstand nach Rückspülung) wurden durch Reinwasser-Tests ermittelt und zur Berechnung von R_{TF} (Widerstand der gesamten Foulingschicht), R_{K} (Widerstand des Filterkuchens), R_{RP} (Widerstand des reversiblen Porenfoulings) und R_{IF} (Widerstand des irreversiblen Foulings) auf Grundlage des Widerstandsmodells verwendet (vgl. Kapitel 3.5.3). In Abbildung 55 sind die hydraulischen Widerstände der verschiedenen Schichten und der Gesamt-Foulingwiderstand bei unterschiedlichen Betriebsweisen nach 24 h dargestellt.

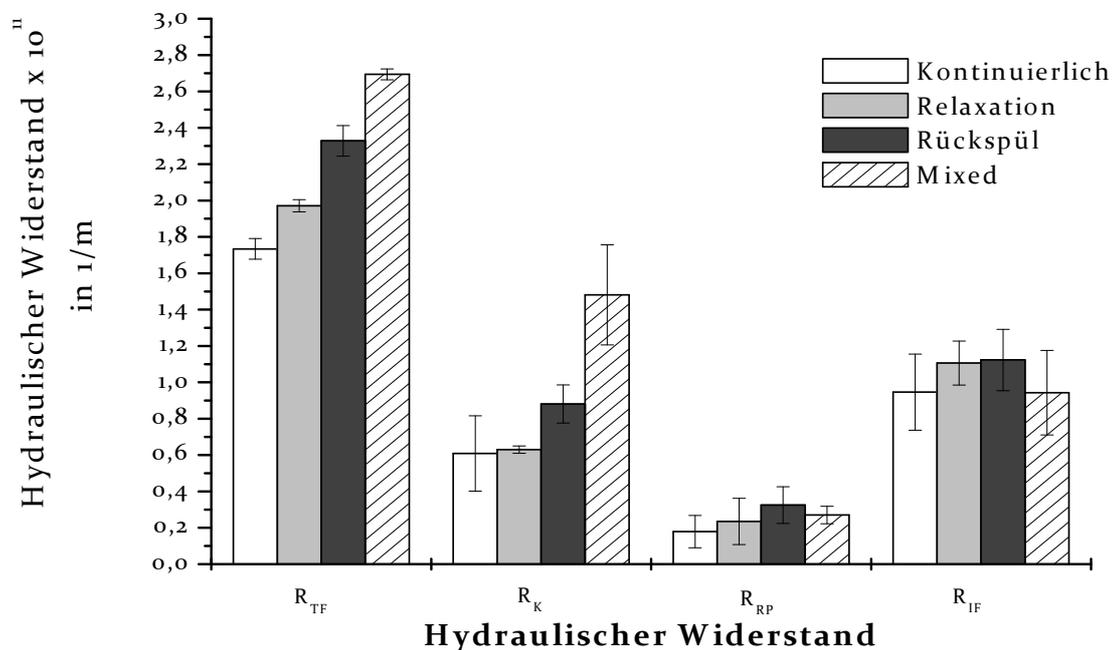


Abbildung 55: Hydraulischer Widerstand der verschiedenen Schichten (R_{Gesamt} , R_{K} , R_{RP} , R_{IF}) in Abhängigkeit von der Betriebsweise.

Der Mixed-Modus produziert den größten Gesamt-Foulingwiderstand R_{TF} und der kontinuierliche Modus den geringsten, wie bereits bei den TMP-Messungen festgestellt wurde. Die Unterschiede der Gesamt-Foulingwiderstände werden überwiegend durch Eigenschaften des locker gebundenen Filterkuchens verursacht. R_K ist dabei stark von dem angelegten Brutto-Permeatfluss abhängig und folglich für den Mixed-Modus am höchsten, was auf den Permeatfluss zu Beginn der Filtrationsperiode zurückzuführen ist. Durch den erhöhten Permeatfluss entsteht eine kompaktere Kuchenfoulingsschicht aus Biomasseflocken. R_{RP} ist für alle Betriebsweisen am geringsten und stellt einen Beitrag von ca. 12 % zum Gesamt-Foulingwiderstand dar. R_{RP} und R_K bilden das reversible Fouling, welches einen Beitrag von 42 - 52 % für den Rückspül-, den Relaxations- und den kontinuierlichen Modus, und von 65 % für den Mixed-Modus zu R_{TF} hat.

Der Widerstand des irreversiblen Foulings R_{IF} stellt für alle Betriebsweisen, außer dem Mixed-Modus, einen Beitrag von ca. 50 % zu R_{TF} dar und für den Mixed-Modus einen Beitrag von 35 %. Irreversibles Fouling wird überwiegend durch Porenfouling verursacht [Chang et al. 2002]. Dabei können die Polymere durch Adsorption basierend auf hydrophoben und van-der-Waals-Wechselwirkungen an die Membran gebunden werden oder sich durch sterische Effekte in den Poren verhaken [Melin und Rautenbach 2007].

Reversibles und irreversibles Fouling stellen somit für alle Betriebsweisen, außer dem Mixed-Modus, einen ähnlichen Anteil am Gesamt-Fouling dar.

Dies verdeutlicht den großen Einfluss der SMP, welche den Hauptbestandteil des irreversiblen Foulings darstellen, auf die Foulingbildung. Ein ähnliches Foulingverhalten wurde von Huang et al. (2000) beschrieben, die feststellten, dass die Hälfte des Foulings durch gelöste Komponenten, besonders Biopolymere, entsteht. Obwohl diese nur einen sehr geringen Anteil an der gesamten organischen Materie darstellen, haben sie erheblichen Einfluss auf den Filtrationsprozess, was auch bei den Untersuchungen in Kapitel 4.3.2 eine wichtige Rolle spielte.

Es kann davon ausgegangen werden, dass der hohe Anteil der SMP in der irreversiblen Foulingsschicht in der vorliegenden Studie z. T. auch auf deren Löslichkeit im basischen Milieu beruht, da durch die Anwendung von NaOH EPS und SMP gelöst werden können. Die Ergebnisse der Arbeit geben einen guten Einblick in die Verteilung von Biopolymeren und Biomasseaggregaten in der Foulingsschicht.

Anhand der TMP-Verläufe des Rückspül-Modus und des Relaxations-Modus können weitere Rückschlüsse auf die Entstehung von irreversiblen Fouling gezogen werden. Während zu Beginn des Experiments eine gute Regenerierung der relativen Permeabilität durch Rückspülen erzielt werden konnte, ließ sich die Permeabilität bereits nach vier Filtrationszyklen nicht mehr vollständig regenerieren, was auf eine schnelle Ausprägung von irreversiblen Porenfouling schließen lässt. Ähnliches wurde auch für den Relaxations-Modus festgestellt. Hier waren die Regenerationsleistungen von Anfang an niedriger. Nach Filtration

von 480 L/m² lässt sich kein Effekt der physikalischen Reinigung mehr erkennen. Es kann davon ausgegangen werden, dass ab dieser Menge der Einfluss von Porenfouling dominiert.

4.4.2.4. Spezifischer Widerstand der Foulingschichten

Der Biopolymer-Anteil der reversiblen Foulingschichten (obere und mittlere) ist verantwortlich für ca. 50 % des Gesamt-Foulingwiderstands. Im Vergleich zu den Biopolymeren der irreversiblen Foulingschicht haben sie jedoch eine kleinere spezifische Auswirkung auf den Gesamt-Foulingwiderstand. Während z. B. 45 mg/m² der irreversibel gebundenen Biopolymere ca. 50 % zum Gesamt-Foulingwiderstand beitragen, tragen 300 mg/m² der reversiblen Schicht mit dem gleichen Anteil dazu bei. Das Verhältnis des hydraulischen Widerstands der einzelnen Foulingschichten zu der Konzentration der Biopolymere, lässt sich als spezifischer Widerstand der Biopolymere definieren [Nagaoka et al. 1996]:

$$\alpha_{\text{Biopolymer}} = \frac{R}{D_p} \quad (32)$$

mit:

$\alpha_{\text{Biopolymer}}$: spezifischer Widerstand der Biopolymere [m/kg]

R : Widerstand der verschiedenen Schichten [1/m]

D_p : Biopolymer-Masse pro Membranfläche in den verschiedenen Schichten [kg/m²]

Der spezifische Widerstand für die Gesamt-Foulingschicht liegt zwischen 10¹⁵ und 10¹⁶ m/kg. Im Gegensatz dazu berichten Nagaoka et al. (1996) von $\alpha_{\text{Biopolymer}}$ -Werten zwischen 10¹⁶ und 10¹⁷ m/kg, welche jedoch längere Filtrationszeiten von 27 bzw. 143 Tagen zu Grunde legen.

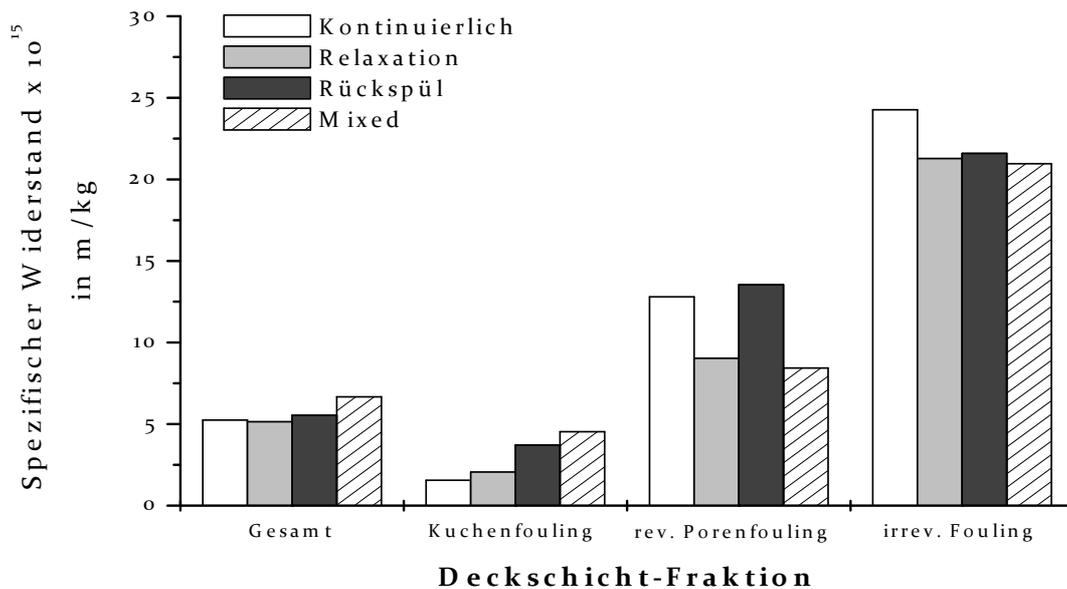


Abbildung 56: Spezifischer Widerstand der einzelnen Foulingschichten in Abhängigkeit von der Betriebsweise.

Mit Annäherung der Foulingschichten an die Membran nimmt deren $\alpha_{\text{Biopolymer}}$ -Wert zu, wie in Abbildung 56 dargestellt ist. Dies lässt Rückschlüsse auf den Aufbau der Foulingschichten zu. Die obere Schicht weist eine poröse Struktur auf, die von Wasser einfach zu durchdringen ist [Wang et al. 2007]. Der spezifische Widerstand des Filterkuchens nimmt dabei deutlich mit steigendem Brutto-Permeatfluss zu. Eine Steigerung des Permeatflusses von 20 (kontinuierlicher Modus) auf 25 L/m²h (Rückspül-Modus) vergrößert den spezifischen Widerstand fast um das dreifache und lässt auf eine Überschreitung des kritischen Flusses schließen. Aufgrund des höheren Wasserdrucks in den Poren sind die unteren Schichten kompakter und dichter aufgebaut. Sie hindern das Wasser verstärkt durchzudringen, was sich in den höchsten spezifischen Widerständen widerspiegelt. Der spezifische Widerstand der irreversiblen Foulingschichten ist wenig vom angelegten Fluss abhängig und zeigt für alle Betriebsweisen ähnliche Werte. Das basiert auf einer kompletten Beladung der Adsorptionsplätze auf der Membran und einer teilweisen Verstopfung der Poren bei allen Betriebsweisen nach 24 h. Die reversible Porenfoulingschicht weist einen spezifischen Widerstand im Größenbereich zwischen der oberen und der unteren Schicht auf. In dieser Schicht füllen kleine Biomasseaggregate und SMP die Porenräume der Membran auf und verbinden die untere und die obere Schicht.

Die mittlere Schicht stellt somit eine Verbindung für den locker gebundenen Filterkuchen an die irreversibel gebundene untere Schicht dar [Chu und Li 2005]. Auch in fluoreszenzmikroskopischen Studien konnten die oben beschriebenen Tendenzen festgestellt werden. Chen et al. (2006) bemerkten, dass die Porosität mit zunehmender Entfernung von der Membran zunimmt.

4.4.3. Möglicher Foulingmechanismus bei Kurzzeit-Experimenten

Aufbauend auf den Ergebnissen sollen im Folgenden Foulingmechanismen für zwei der vier Betriebsweisen beschrieben werden (Abbildung 57):

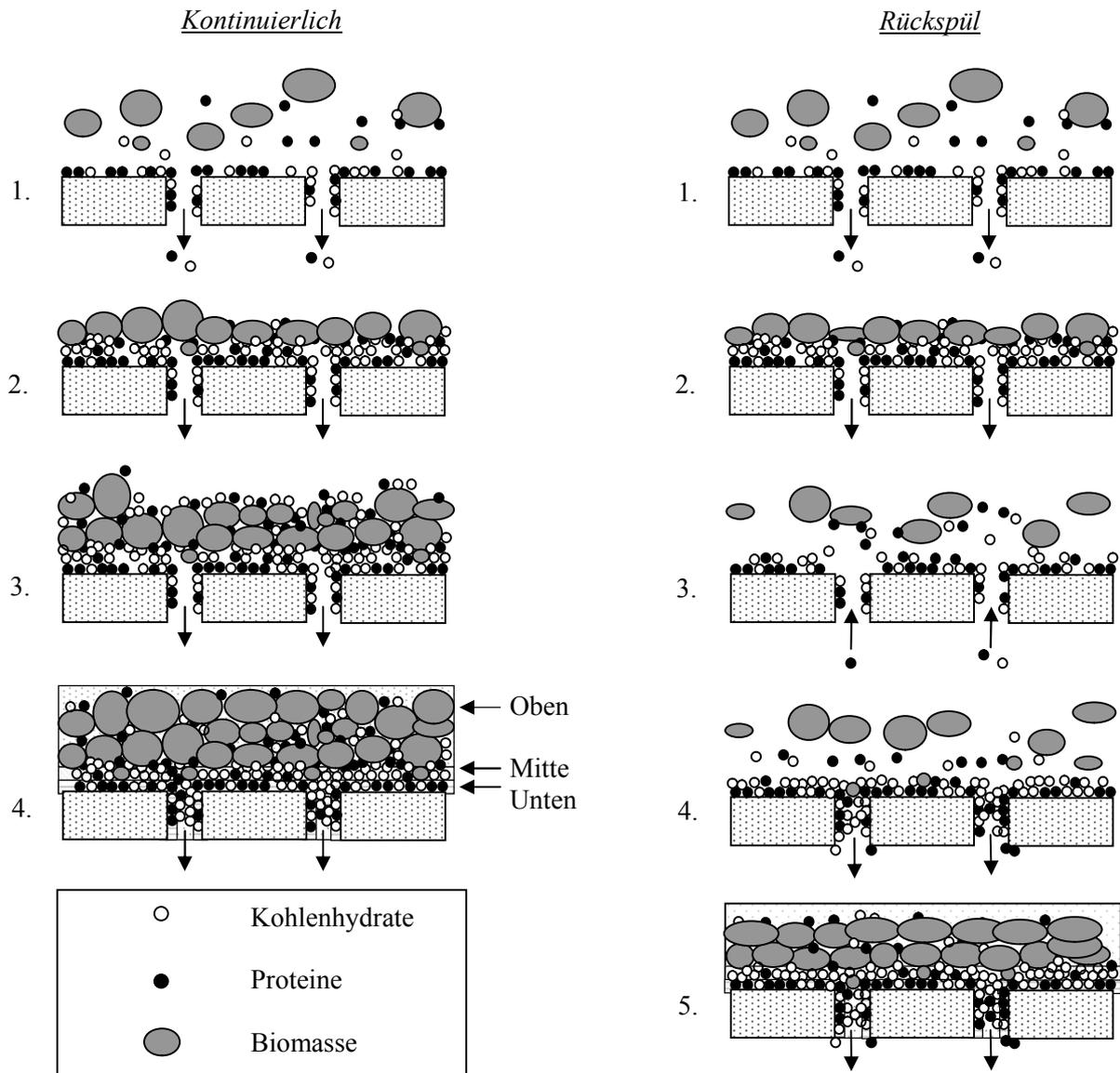


Abbildung 57: Mögliche Foulingmechanismen für den kontinuierlichen Modus und den Rückspül-Modus.

Kontinuierlicher Modus

Innerhalb der ersten Sekunden der Filtration bildet sich eine dünne „conditioning“ Schicht auf der Membran. Diese besteht überwiegend aus SMP, welche aufgrund der Molekülgröße schneller als die Biomasseflocken an die Membran herantransportiert werden und aufgrund hydrophober Wechselwirkungen an der Membranoberfläche adsorbieren. Diese ist die Ursache für die schnelle TMP-Zunahme zu Beginn der Filtration, welche überwiegend durch

Adsorption und anschließendes Porenfouling verursacht wird. Porenfouling durch SMP wurde besonders in frühen Filtrationsstadien berichtet [Jiang et al. 2003], was durch die abnehmenden Foulingraten bestärkt wird.

Kleine Partikel und Moleküle erreichen die Membran zuerst [Le Clech et al. 2006a] und bilden somit eine „größen-differenzierte conditioning Schicht“ aus. Aufgrund der anhaftenden SMP erhöht sich die Klebrigkeit der Membran, was eine Anhaftung von Biomasseflocken und Bakterien begünstigt. Es entsteht ein Filterkuchen auf der Membran. Durch weitere Anlagerung von Biomasseflocken wächst der Kuchen und fungiert als eine Sekundär-Membran bzw. als Vorfilter und verlangsamt weiteres Porenfouling. Im weiteren Verlauf wird das Fouling überwiegend durch eine zunehmende Kuchenbildung geprägt, was sich in abnehmenden Foulingraten zeigt. Im Laufe der Filtration lagert sich mehr Biomasse und SMP an den Kuchen an, was zu einem porösen Filterkuchen mit moderatem Widerstand führt. Die Dicke des Kuchens wird durch äußere Einflüsse limitiert. Aufgrund von Scherkräften durch aufsteigende Luftblasen und ein Aneinanderreiben verschiedener Hohlfasermembranen stellt sich ein Gleichgewicht ein. Durch die poröse Struktur des Filterkuchens ist es kleinen Biopolymermolekülen möglich durch den hydratisierten Kuchen zu diffundieren. Zusätzlich können sich Moleküle von den Biomasseflocken lösen und an die Membran binden, was letztendlich zu einer totalen Bedeckung der Membran führt. Proteine können wegen ihrer kompakten globulären Struktur bevorzugt in die Membranporen eindringen und aufgrund einer Vielzahl funktioneller Gruppen auf der Membranoberfläche adsorbieren. Im Gegensatz dazu werden Kohlenhydrate aufgrund ihrer langkettigen linearen und/oder verzweigten Struktur von der Kuchenschicht zurückgehalten und/oder lagern sich auf der Membranoberfläche ab und bilden eine mittlere Schicht. Im Laufe der Zeit führen zunehmendes Porenfouling und Porenverblockung zu einer reduzierten Prozesseffizienz. Des Weiteren lagern sich SMP in den Poren des Filterkuchens ab und verdichten diesen, was einen erhöhten Widerstand zur Folge hat.

Rückspül Modus

Der anfängliche Foulingmechanismus folgt dem gleichen Ablauf wie zuvor beschrieben, jedoch mit einer höheren Foulingrate aufgrund des höheren angelegten Brutto-Permeatflusses. Dadurch werden im gleichen Zeitintervall mehr SMP an die Membranoberfläche herantransportiert, was zu einer ausgeprägteren Konzentrationspolarisation führt. Während des Rückspülvorgangs löst sich der locker anhaftende Filterkuchen sowie die reversibel gebundene Porenfoulingsschicht von der Membran, während die durch Adsorption und sterische Effekte irreversibel gebundenen Foulingkomponenten auf der Membran und/oder in den Membranporen zurückbleiben. Durch die Entfernung der Kuchenschicht können weitere SMP zu Beginn des nächsten Filtrationszyklusses ungehindert die Membran erreichen und an den verbleibenden Adsorptionsstellen an der Membran anhaften und in deren Poren eindringen. Dies resultiert in einer schnelleren Bedeckung der Membran und der Ausbildung

von Porenfouling. Dieser Prozess wiederholt sich bis die gesamte Membran mit Polymeren bedeckt ist und sich ein Gleichgewicht einstellt.

Anschließend ändern sich die Foulingraten nur noch wenig, da weiteres Porenfouling nur sehr langsam auftritt. Im Verlauf jedes Filtrationszyklusses bildet sich ein neuer Kuchen aus Biomasseflocken auf der Membran aus, welcher über eine mit Kohlenhydraten angereicherte mittlere Schicht mit der irreversiblen Membranfoulingschicht verbunden ist. Aufgrund der höheren Permeatflüsse bildet sich ein kompakterer, dichter Filterkuchen im Vergleich zum kontinuierlichen Modus aus. Ein anderer Effekt der möglicherweise zum Membranfouling beiträgt, ist Fouling auf der Innenseite der Membran. Während des Filtrationsprozesses können kleine Kolloide oder Makromoleküle die Membran passieren. Da Permeat als Rückspülwasser genutzt wird, können sich die Inhaltsstoffe an der Innenseite der Membran anlagern, was das Porenfouling zusätzlich fördert.

4.4.4. Ergebnisse von Langzeit-Experimenten

Neben den Kurzzeit-Experimenten wurde das Foulingverhalten bei längeren Filtrationszeiten untersucht. Dazu wurden Versuche im Relaxations-Modus in einen Zeitraum von 4 Tagen bis 3 Monaten durchgeführt. Die Foulingbildung wurde anhand des TMP kontinuierlich analysiert und die Foulingschichten nach Versuchsende wie in Kapitel 4.4.2 untersucht.

Beim Relaxations-Modus konnte eine deutliche Abnahme der Foulingrate mit zunehmender Filtrationsdauer festgestellt werden, wie bereits in Kapitel 4.4.1 erläutert wurde. Nach 24 h hat das System einen Gleichgewichtszustand erreicht, so dass sich die Foulingrate im weiteren Verlauf nur noch wenig verändert. Dies führt zu einem TMP von 250 mbar nach 4 d und von 400 mbar nach 3 Monaten.

Bei den Langzeit-Versuchen trat bei den Membranmodulen eine verstärkte Anlagerung von Biomasseflocken an den Enden der Module auf, die dort zu Verklumpungen führte. Dies resultiert im Vergleich zu den Kurzzeit-Experimenten in höheren Biopolymer-Konzentrationen des Filterkuchens von bis zu 1100 mg/m^2 . Aufgrund der Betriebsweise im Relaxations-Modus und der damit verbundenen periodischen Ablösung des Filterkuchens, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass sich der hydraulische Widerstand der oberen Schicht gegenüber den Kurzzeit-Versuchen nicht signifikant erhöht und die obere Schicht eine ähnliche Struktur wie bei den Kurzzeit-Versuchen aufweist.

Die Gesamt-Biopolymer-Konzentration der reversiblen Porenfoulingschicht lag unabhängig von der Filtrationsdauer im gleichen Bereich (25 bis 33 mg/m^2) wie bei den Kurzzeit-Versuchen. Die P/KH-Verhältnisse waren auch hier kleiner als 1, was eine Anreicherung von Kohlenhydraten in dieser Schicht zeigt. Im Gegensatz dazu weist die Biopolymer-Konzentration der irreversiblen Foulingschicht eine deutliche Abhängigkeit zum aufgewendeten TMP und der relativen Permeabilität auf, wie in Abbildung 58 dargestellt ist.

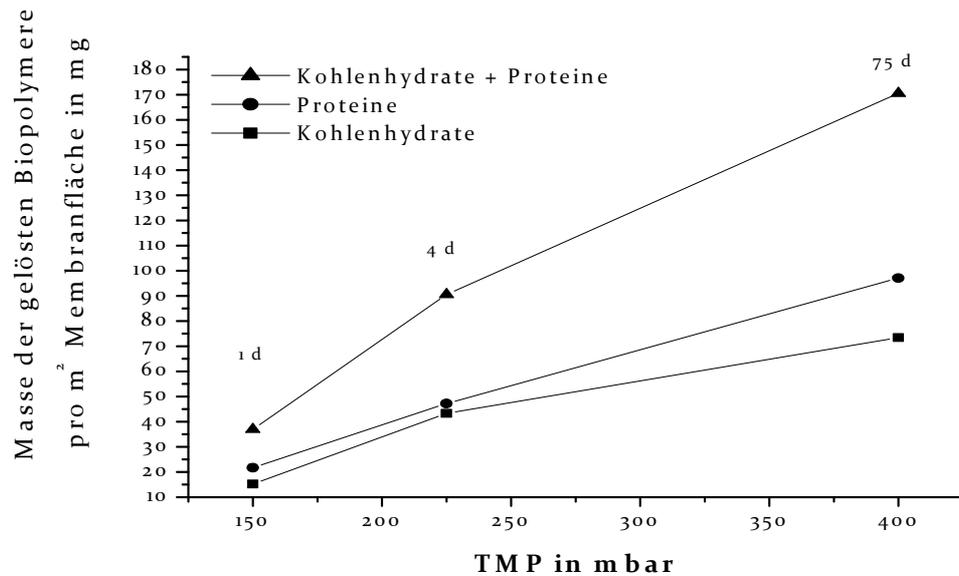


Abbildung 58: TMP in Abhängigkeit der Masse der gelösten Biopolymere pro m² Membranfläche in mg der irreversiblen Foulingsschicht.

Mit zunehmendem TMP ist eine Zunahme der Biopolymer-Konzentration der unteren Schichten zu erkennen. Wie bei den Kurzzeit-Versuchen findet in der irreversiblen Schicht im Gegensatz zur reversiblen Porenfoulingsschicht eine Anreicherung von Proteinen statt, was sich in einem höheren P/KH-Verhältnis von 1,3 bis 1,8 der Gesamt-Biopolymere widerspiegelt. Der Großteil der Biopolymere (> 80%) liegt dabei in gelöster Form vor.

Die überwiegende Zunahme des hydraulischen Widerstandes kann somit auf irreversible Anlagerung von Biopolymeren auf der Membran und in deren Poren zurückgeführt werden. Je mehr Biopolymere auf den Membranen irreversibel gebunden waren, desto höher war der TMP, um einen Permeatfluss von 20 L/m²h aufrecht zu erhalten. Die Biopolymer-Konzentration zeigt dabei einen annähernd linearen Zusammenhang zum aufgewendeten TMP. Ein ähnliches Verhalten wurde von Meng et al. (2006) berichtet, die einen signifikanten positiven Effekt zwischen der EPS-Menge auf der Membran und dem resultierenden Foulingwiderstand fanden.

Wie in Kapitel 4.4.1 beschrieben wurde, findet die hauptsächliche Anlagerung der SMP und das daraus resultierende Fouling während der ersten Minuten des Filtrationsprozesses statt. Nach vollständiger Besetzung der Adsorptionsplätze verringert sich die Biopolymer-Anlagerung auf der Membran deutlich, was eine verminderte Foulingrate nach sich zieht.

5. Zusammenfassung und Ausblick

Biofilme treten ubiquitär auf und stellen die häufigste Form mikrobiellen Lebens dar. Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) stellen den größten Anteil der organischen Materie von Biofilmen dar und sind wesentlich für deren strukturellen Aufbau und deren charakteristische Eigenschaften verantwortlich. Besonders in wasserführenden Systemen und Systemen zur Abwasseraufbereitung, wie z. B. Membranbioreaktoren (MBR), spielen Biofilme und deren EPS eine große Rolle. Zum einen wird die Reinigungsleistung in der Abwasseraufbereitung überwiegend von Mikroorganismen in Biofilmstrukturen erbracht, zum anderen können Biofilme und deren EPS erhebliche Probleme verursachen.

Im MBR dienen Membranen zur Abtrennung der Biomasse vom gereinigten Abwasser. Aufgrund hoher Biomassekonzentrationen kann es durch Verblockung der Membranen schnell zur Beeinträchtigung des Membranprozesses kommen. In aktuellen Studien wurde dabei der besondere Einfluss der EPS auf das Fouling erkannt.

EPS zeichnen sich durch eine große strukturelle Vielfalt und Heterogenität aus. Der Großteil der EPS besteht aus Proteinen und Kohlenhydraten. Daneben finden sich zu kleineren Anteilen Nukleinsäuren und Lipide sowie aus der Umwelt sorbierte anorganische und organische Substanzen. Zur Beurteilung des Verhaltens von Biofilmen und EPS sind Informationen über die chemischen Strukturen und die Molekülgrößenverteilung von grundlegendem Interesse.

Um EPS zu charakterisieren, werden diese mittels unterschiedlicher Verfahren aus Biofilmen extrahiert. Die extrahierten EPS werden folglich als extrahierbare EPS (eEPS) bezeichnet. Daneben können EPS in gelöster Form vorliegen, wenn sie vom Biofilm in die sie umgebende wässrige Phase abgegeben werden. Diese Gruppe der EPS bezeichnet man als SMP (engl.: soluble microbial products).

Ziel der Arbeit ist die strukturelle Charakterisierung von EPS und SMP aus MBR. Ein weiterer Schwerpunkt der Arbeit bestand in der Untersuchung des Einflusses von SMP und Biomasse auf das Membranfouling in MBR. Durch Informationen über die Struktur der SMP können Rückschlüsse auf das Foulingverhalten gezogen werden.

Die Arbeit wurde in vier Teilbereiche untergliedert, die jeweils aufeinander aufbauen.

Zur Charakterisierung der strukturellen EPS-Zusammensetzung wurden im ersten Teil der Arbeit grundlegende Untersuchungen an Modell-EPS-Substanzen (Kohlenhydraten (Pullulan, Dextran, Alginat), Proteinen (BSA), DNA) und Reinkultur-Biofilmen der Spezies *Pseudomonas putida* (Bakterium, prokaryotischer Organismus) und *Aureobasidium pullulans*

(Pilz, eukaryotischer Organismus) durchgeführt. Dazu wurde eine NMR-spektroskopische Methode zur Strukturaufklärung entwickelt, die eine quantitative Analyse von EPS zulässt.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde die NMR-Methode zur Charakterisierung von EPS aus den Reinkultur-Biofilmen angewendet. Die EPS wurden zunächst mittels mechanisch-physikalischer und physikalisch-chemischer Verfahren extrahiert. Die Extraktionsmethoden wurden anhand der EPS-Ausbeute und der strukturellen EPS-Zusammensetzung sowie hinsichtlich auftretender Zellyse und EPS-Verunreinigungen umfassend beurteilt.

Aufbauend auf den Untersuchungen an Modell-Substanzen und Reinkultur-Biofilmen lag der Schwerpunkt im dritten Teil der Arbeit auf der anwendungsbezogenen Charakterisierung von EPS aus MBR. Neben der Extraktion von eEPS aus Biomasse eines kommunalen und eines kleintechnischen MBR, wurde die Probenaufbereitung mittels Dialyse untersucht. Des Weiteren wurden SMP aus dem kommunalen MBR angereichert und mittels mehrstufiger Ultrafiltration (mst-UF) fraktioniert. Eine weitergehende Charakterisierung der eEPS und der SMP-Fractionen erfolgte durch die (im ersten Abschnitt) etablierten Analysemethoden und durch Größenausschlusschromatographie (SEC, engl.: size exclusion chromatography). Auf Grundlage der Ergebnisse wurden strukturelle Unterschiede verschiedener SMP-Größenfraktionen und zwischen eEPS und SMP herausgestellt.

Im vierten Teil der Arbeit wurde das Foulingverhalten in einem MBR bei unterschiedlichen Betriebsweisen untersucht. Um das Ausmaß des Foulings auf der Membranoberfläche und im Membraninneren zu quantifizieren, wurde ein Reinigungsverfahren entwickelt, welches die vollständige Entfernung der Foulingschicht in drei Fraktionen ermöglicht. Die entstandenen Fraktionen wurden reversiblen und irreversiblen Fouling zugeteilt. Neben dem Einfluss verschiedener Betriebsweisen, konnte somit die strukturelle Zusammensetzung der Foulingschichten und der Beitrag von SMP und Biomasse am reversiblen und am irreversiblen Fouling untersucht werden.

Im Folgenden werden die Ergebnisse der vier Teilbereiche dargestellt:

(NMR)-Untersuchungen an Modell-Biofilmen und -EPS

Die quantitative Erfassung aller chemischen Strukturelemente mittels ^{13}C CPMAS NMR (CP, engl.: cross polarization, MAS, magic angle spinning) in den Biofilm- und EPS-Proben und deren Zuordnung zu biologischen Strukturen wurde an Modell-Substanzen erarbeitet.

Um Sättigungseffekte zu vermeiden und eine quantitative Auswertung der NMR-Spektren zu ermöglichen wurde die Protonenrelaxationszeit ($T_{1\text{H}}$ -Zeit) für Biofilm-Proben und Modell-EPS-Substanzen bestimmt. Innerhalb der Biofilm-Probe waren die $T_{1\text{H}}$ -Zeiten stark von der Umgebung der Biopolymere abhängig. Besonders Dipol-Dipol-Wechselwirkungen in Abhängigkeit von der Anzahl der H-Substitutionen der jeweiligen C-Atome hatten einen großen Einfluss auf die $T_{1\text{H}}$ -Zeit. Entsprechend waren $T_{1\text{H}}$ -Zeiten für aliphatische Strukturen am kürzesten und für O-Alkyl-Strukturen am längsten. Traten Wechselwirkungen mit

paramagnetischen Ionen in der direkten Umgebung auf, verkürzte sich die T_{1H} -Zeit. Lag das Biopolymer als Reinsubstanz vor, erhöhten sich die T_{1H} -Zeiten signifikant. Ausgehend von einer maximalen T_{1H} -Zeit von 1 s für O-Alkyl-C-Atome wurde der Impulsabstand angepasst, so dass Sättigungseffekte ausgeschlossen und die NMR-Spektren zur Quantifizierung der einzelnen EPS-Komponenten herangezogen werden konnten.

Die Auswertung der NMR-Spektren zeigte, dass eine quantitative Auswertung der Spektren ab einem Signal/Rausch (S/N)-Verhältnis von größer als 10 möglich war.

In Abhängigkeit der molekularen Zusammensetzung wiesen Kohlenhydrate überwiegend Signale verschiedener Intensität im O-Alkyl-Bereich der NMR-Spektren auf. Im Gegensatz dazu wiesen Proteine eine heterogenere Verteilung der Signale im Amid/Carboxyl-C, im α -C- sowie im aliphatischen C-Bereich auf. Dabei variierten die Signalintensitäten in Abhängigkeit von der Aminosäurezusammensetzung verschiedener Proteine. Unabhängig von der Aminosäure-zusammensetzung konnten jedoch spezifische Intensitätsverhältnisse zwischen den verschiedenen Signalen für Proteine herausgestellt werden.

Durch Anpassung der Integrationsgrenzen zwischen verschiedenen chemischen Verschiebungsbereichen und Anwendung spezifischer Algorithmen war es möglich, in EPS Kohlenhydrate und Proteine zu quantifizieren. Signale von Nukleinsäuren wiesen Überlappungen mit Signalen von Kohlenhydraten und Proteinen auf, so dass lediglich ein maximaler Nukleinsäure-Gehalt anhand eines Indikatorsignals abgeschätzt werden konnte. Der Anteil an Zellwandbestandteilen wurde anhand eines charakteristischen Indikatorsignals im aliphatischen Bereich abgeschätzt, welches auf n-Alkan-Strukturen aus der Zellwand bzw. -membran zurückgeführt werden konnte.

Die Reinkultur-Biofilme eigneten sich sehr gut als Untersuchungssysteme zur Etablierung der Methode, da sie überwiegend aus organischer Materie (C-Gehalt: ca. 45% w/w) bestehen und Adsorption von anorganischen und organischen Substanzen aus der Umwelt ausgeschlossen werden konnte. Die gut aufgelösten NMR-Spektren mit schmalen Signalgruppenbreiten deuten auf eine große Homogenität innerhalb der Biofilm-Probe hin. Es hat sich gezeigt, dass die Zusammensetzung der Reinkultur-Biofilme dabei von den Wachstumsbedingungen abhängig war. Den überwiegenden Bestandteil der organischen Materie der Reinkultur-Biofilme stellten Proteine (48 - 64 %) und zu geringerem Anteil Kohlenhydrate (20 - 41 %) dar. Die Anteile an Nukleinsäuren und Lipiden waren mit ca. 4 % deutlich kleiner.

Extraktion von EPS aus Modell-Biofilmen

Neben der Extraktion mittels Ultrazentrifugation (UZ) wurden verschiedene Extraktionshilfsmittel (Formaldehyd-Natriumhydroxid (F-NaOH), Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Kationenaustauscher (CER, engl.: cation exchange resin)) eingesetzt sowie ein thermisches Verfahren angewendet, um die EPS-Ausbeute zu erhöhen. Die extrahierten EPS wurden mit der NMR-spektroskopischen Methode sowie mit biochemischen Verfahren und

per Elementanalyse (C und N) untersucht. Aus dem Vergleich der Ergebnisse der Untersuchungsmethoden ergab sich eine kritische Auseinandersetzung mit den Auswerteverfahren der NMR-Spektren und eine Fortentwicklung des Auswerte-Algorithmus. Die NMR-Methode und die Auswertungsverfahren liefern Ergebnisse, die mit den quantitativen Daten der anderen angewandten Untersuchungsmethoden übereinstimmen. Besonders die Kombination von NMR-spektroskopischen Untersuchungen mit den Ergebnissen der Elementanalyse eignete sich für eine vergleichende Beschreibung von EPS- und Biofilmproben und bot tiefere Einblicke in die strukturelle Zusammensetzung der EPS. Es konnten spezifische An- und Abreicherungen als Folge der Extraktion erkannt werden. Neben dem Protein/Kohlenhydrat (P/KH)-Verhältnis, den n-Alkan- und DNA-Strukturen, konnten weitere NMR-Signale, z. B. den N-Acetyl- und Carboxyl-Gruppen sowie dem Extraktionshilfsmittel EDTA, zugeordnet werden.

Die EPS-Ausbeuten der verschiedenen Extraktionsmethoden unterschieden sich deutlich voneinander und waren für den eukaryotischen *A. pullulans* Biofilm jeweils höher als für den prokaryotischen *P. putida* Biofilm. Es konnte gezeigt werden, dass Zellwandbestandteile und Nukleinsäuren durch sämtliche Extraktionsverfahren effektiv von den EPS entfernt worden sind.

Die verschiedenen EPS-Proben (außer EPS EDTA-Proben) der jeweiligen Biofilme unterschieden sich nur wenig hinsichtlich der strukturellen Zusammensetzung. Eine Erhöhung der EPS-Ausbeute hatte eine Abnahme des P/KH-Verhältnisses der entsprechenden EPS-Probe zur Folge. Mittels der F-NaOH-Methode wurden für beide Biofilme die höchste Ausbeute und das niedrigste P/KH-Verhältnis erzielt.

Im Gegensatz dazu wurde beim *A. pullulans* Biofilm die niedrigste Ausbeute mit der CER-Methode und bei *P. putida* mit der UZ-Methode erzielt, was jeweils zum größten P/KH-Verhältnis führt. Auf Grundlage der Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass Proteine in den untersuchten Reinkultur-Biofilmen schwächer gebunden waren und somit bevorzugt extrahiert wurden.

Durch die NMR-spektroskopische Methode konnte eine Kontamination der EPS-Proben von *P. putida* und *A. pullulans* Biofilmen mittels der EDTA-Methode nachgewiesen werden. EDTA machte einen Anteil von bis zu 46 % (w/w) an den EPS aus. Die Verunreinigung erklärt die scheinbar hohen Ausbeuten der Methode und die niedrigen Protein- und Kohlenhydrat-Gehalte von eEPS aus Literaturdaten. Die Ergebnisse der Strukturaufklärung stellen somit eine wertvolle Grundlage für die Beurteilung der Methode dar. Die EDTA-Methode war für die Extraktion von EPS aus Biofilmen in dieser Arbeit ungeeignet. Die UZ-Methode führte sowohl bei dem *P. putida* als auch bei dem *A. pullulans* Biofilm zur Zellyse. Eine Verunreinigung mit intrazellulären Proteinen konnte somit nicht ausgeschlossen werden und könnte eine Erklärung für den hohen Protein-Gehalt in den mittels der UZ-Methode extrahierten EPS sein.

Für weitere Versuche wurden die F-NaOH- und die thermische Methode ausgewählt, da beide Methoden bei ähnlicher chemischer EPS-Zusammensetzung und gleicher Anreicherungscharakteristik wie bei den anderen EPS-Proben die höchsten Ausbeuten und keine nachzuweisenden Verunreinigungen durch Extraktionshilfsmittel aufwiesen.

Charakterisierung von EPS aus Membranbioreaktoren

Bei der Extraktion von eEPS aus MBR wurde zusätzlich der Effekt der Dialyse auf die EPS-Ausbeute und deren strukturelle Zusammensetzung sowie der Einfluss des Extraktionsverfahrens auf die EPS-Molekülgröße untersucht. Der Dialyseschritt war für die nachfolgenden Analysen (SEC, NMR, biochemische Untersuchungen) unerlässlich. Bei Unterlassung resultierten deutliche Unterschiede in den eEPS-Ausbeuten und den Ergebnissen der chemischen Analysen.

Mit der Dialyse waren jedoch große Verluste an organischen Substanzen verbunden. Dennoch konnte mit Hilfe der SEC eine größenspezifische DOC-Abreicherung durch die Dialyse in der Probe nachgewiesen werden. Mit dem Verlust waren keine wesentlichen Änderungen in der chemischen Struktur und der Molekülgrößenverteilung der eEPS (Proteine und Polysaccharide) verbunden. Die Verluste ließen sich überwiegend auf niedermolekulare Substanzen, wie z. B. Oligosaccharide und Peptide, zurückführen. Zusätzlich wurde durch die Dialyse ein Großteil der anorganischen Ionen und der Extraktionshilfsmittel, wie z. B. Formaldehyd, entfernt.

Die beiden Extraktionsverfahren zeigten unabhängig vom MBR-System spezifische Anreicherungen bei der Extraktion von eEPS aus MBR-Biomasse, was sich sowohl auf die Molekülgröße der eEPS, als auch auf deren strukturellen Zusammensetzung auswirkt.

Die thermische Extraktion führte zu einer relativen Anreicherung von Kohlenhydraten im Vergleich zu der F-NaOH-Methode in den eEPS-Proben. Auf Grundlage der Ergebnisse kann von einer Beeinträchtigung der Zellintegrität im Rahmen der thermischen Extraktion ausgegangen werden, was zu Anreicherungen von intrazellulären und zellwandspezifischen Strukturen in den eEPS führte. Eine derartige Beeinträchtigung konnte bei der F-NaOH-Methode nicht festgestellt werden; hier fand eine gleichmäßigere Extraktion der verschiedenen eEPS-Komponenten statt.

Die SEC-Ergebnisse zeigten, dass die Extraktionsverfahren einen entscheidenden Einfluss auf die Molekülgröße der eEPS haben. Mittels der Hitze-Methode wurde ein größerer Anteil an makromolekularen UV-aktiven Substanzen (Proteine, DNA) extrahiert, während mit der F-NaOH-Methode größere Anteile an EPS im mittleren Molekülgrößenbereich extrahiert wurden. Es konnte nicht ausgeschlossen werden, dass es durch die Einwirkung von NaOH auf die eEPS zu Modifikationen in den eEPS-Strukturen kam, die zu kleineren Molekülgrößen führten.

Die hohe Übereinstimmung der NMR-Spektren der verschiedenen eEPS-Proben mit den Spektren der Modell-Substanzen zeigt, dass die eEPS fast ausschließlich aus mikrobiell synthetisierten Biopolymeren bestehen. Adsorbierte Substanzen aus der Umwelt, wie z. B. Pflanzenabbauprodukte, konnten in den eEPS nicht nachgewiesen werden. Aus den Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Anwendung jeweils nur einer der hier untersuchten Extraktionsmethoden zu EPS-Proben führte, die nicht die Gesamtheit der EPS repräsentieren. Die eEPS-Ausbeuten von ca. 5 bis 9 % der Biofilm-TM verdeutlichen zusätzlich, dass der Großteil der EPS nicht extrahiert werden konnte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen von Reinkultur-Biofilmen können nur eingeschränkt auf die Untersuchungen der Biomasse-Proben übertragen werden. Im Gegensatz zu den Modell-Biofilmen wurden andere Strukturen angereichert, was auf die Heterogenität der Mikroorganismen, die Wachstumsbedingungen (Nährstoffe, Sauerstoff, Strömung, etc.) und das Alter der Biomasse zurückzuführen war. Tendenziell enthielten eEPS aus Reinkultur-Biofilmen mehr Proteine und weniger Polysaccharide als eEPS aus Belebtschlamm. Während die Zusammensetzung der eEPS bei zwei verschiedenen Biomasse-Proben aus MBR große Übereinstimmungen zeigten, wurden in Modell-Biofilmen deutlich andere eEPS-Zusammensetzungen erzielt. Aufgrund der Übertragbarkeit der Ergebnisse zwischen dem kommunalen und dem kleintechnischen MBR war das kleintechnische System gut für die Untersuchungen zum Membranfouling geeignet.

SMP (0,6 % Biomasse-TM) treten im Gegensatz zu eEPS in wesentlich geringeren Konzentrationen in MBR auf, was eine Charakterisierung dieser nur durch eine aufwendige Probenaufbereitung ermöglicht. Mittels UF wurden SMP angereicht und mit mst-UF in drei Größenklassen (F1 - F3) fraktioniert. Nach der Anreicherung waren nahezu 50 % des DOC im Permeat (< 1 kDa) enthalten, während sich die anderen 50 % gleichmäßig auf die verschiedenen Größenfraktionen verteilten.

Die Qualität des Trennergebnisses der mst-UF wurde mit Hilfe der SEC überprüft. Es konnte eine Größenfraktionierung mittels mst-UF gezeigt werden. Die verschiedenen Fraktionen zeichneten sich jedoch durch eine breite Molekülgrößenverteilung aus und enthielten verschiedene Molekülgrößenbereiche der Ausgangsprobe. In nominell höhermolekularen mst-UF-Fractionen waren aus verschiedenen Gründen (Dead-End-Filtration, Deckschichtbildung, Wechselwirkungen) auch niedermolekulare Verbindungen enthalten. Dabei generierte die durchgeführte Diafiltration keinen nennenswerten Vorteil gegenüber anderen Studien, welche im Konzentrationsmodus durchgeführt wurden.

Auch bei den Fraktionierungsverfahren konnte mit Hilfe der NMR-Spektroskopie eine strukturelle Charakterisierung der mst-UF-Fractionen von SMP aus MBR durchgeführt werden. Die NMR-Spektren der einzelnen SMP-Fractionen unterschieden sich nur wenig von

dem der Ausgangsprobe. Die Ergebnisse der ^{13}C -NMR-spektroskopischen Untersuchung stimmten dabei mit denen der SEC-Untersuchung überein.

Die größten Unterschiede waren in der hochmolekularen Fraktion festzustellen. Die anderen Fraktionen unterschieden sich deutlich weniger von der Ausgangsprobe. Tendenziell enthielten höhermolekulare Fraktionen einen größeren Anteil an Proteinen und Nukleinsäuren, während in niedermolekularen Fraktionen eine Anreicherung von Kohlenhydrat- und aliphatischen Strukturen festzustellen war. Dies spiegelte sich auch in einer Zunahme des N/C-Verhältnisses für Fraktionen mit zunehmender nomineller Molekülgröße wider, wie sie aus der SEC-Analyse mit Detektion des organischen Kohlen- und Stickstoffs erhalten worden ist.

Im Gegensatz zu den eEPS bestehen die SMP-Fraktionen zu einem größeren Anteil aus aliphatischen Strukturen von bis zu 32 %. Ein Teil davon kann auf langkettige n-Alkan-Verbindungen aus Zellwandkomponenten und Zellabbauprodukten zurückgeführt werden, welche tendenziell kleinere Molekülgrößen als eEPS aufwiesen.

Auch in SMP konnten keine erkennbaren Anreicherungen von Pflanzenabbauprodukten festgestellt werden, so dass der überwiegende Anteil an SMP auf mikrobiell synthetisierte Substanzen und deren Abbauprodukte zurückzuführen war.

Makromolekulares Fouling von Membranen in Membranbioreaktoren

Durch Kurzzeit-Foulingexperimente von 24 h wurden detaillierte Informationen über den Einfluss der Betriebsweise (bei gleichem Netto-Permeatfluss) auf den Aufbau und die Zusammensetzung der Foulingschicht im MBR erhalten. Dabei wurden vier Betriebsweisen im kleintechnischen MBR bei Anwendung unterschiedlicher Reinigungsregime (mit/ohne Rückspülen, Relaxation) untersucht. Um jeweils die gleiche Netto-Produktivität zu erhalten, wurde der Brutto-Permeatfluss bei Betriebsweisen mit physikalischer Reinigung erhöht. Nach den Filtrationsversuchen wurden die gefoulten Membranen aus dem MBR entfernt und die Foulingschichten mittels definierter physikalischer und chemischer Reinigungsmethoden fraktioniert. Auf diese Weise standen die einzelnen Fraktionen der Foulingschicht für eine anschließende Untersuchung zur Verfügung.

Es hat sich gezeigt, dass Betriebsweisen mit höheren Brutto-Permeatflüssen nach Ende der Filtration höhere hydraulische Foulingwiderstände aufweisen. Die Anwendung physikalischer in-situ-Reinigungen konnte die Ausbildung des Foulings dabei nur begrenzt kompensieren. Schon nach wenigen Filtrationszyklen konnte mittels Rückspülen und Relaxation keine erkennbare Regenerierung der Permeabilität erzielt werden.

Zu Beginn des Filtrationsprozesses war die Foulingbildung bei allen Betriebsweisen am größten und zeigte eine deutliche Abhängigkeit zum angelegten Brutto-Permeatfluss. Eine Steigerung des Brutto-Permeatflusses um 25 % hatte nahezu eine Verdopplung der Foulingrate zu Folge. Dieses Verhalten lässt sich auf die schnelle Ausbildung irreversiblen

Fouling und ein Verblocken der Membranstruktur zurückführen. Durch höhere Permeatflüsse werden zu Beginn der Filtrationsintervalle mehr SMP an die Membranoberfläche transportiert, was zu einer ausgeprägten Konzentrationspolarisation und zu einer raschen Akkumulation und Sorption von Biopolymeren auf und in der Membran führt. Nach Besetzung der Adsorptionsplätze auf der Membran nahmen die Foulingraten ab. Besonders bei hohen Permeatflüssen kann davon ausgegangen werden, dass der kritische Fluss überschritten wurde.

Die chemisch-physikalische Analyse der Deckschichten ergab, dass Oberflächenfouling bei allen Betriebsweisen den größten Biopolymer-Anteil aufweist. Aufgrund der fehlenden physikalischen Reinigungsverfahren war der Anteil bei der kontinuierlichen Betriebsweise am höchsten. Die Porenfoulingsschicht wies jeweils einen deutlich kleineren Anteil auf und war für alle Betriebsweisen ähnlich ausgeprägt.

Bei den löslichen Biopolymeren zeigte sich ein gegenläufiger Trend: der SMP-Anteil in den Porenfoulingsschichten war jeweils höher als in der Kuchenfoulingsschicht.

Nach 24 h war das Porenfouling unabhängig von der Filtrationsbetriebsweise ähnlich ausgeprägt und die überwiegenden Unterschiede im Aufbau der Gesamt-Foulingsschicht wurden durch die Kuchenfoulingsschicht verursacht.

Durch Anwendung der ^{13}C -NMR-Methode konnte festgestellt werden, dass der Großteil der Foulingsschicht aus angelagerten Biomasseaggregaten bestand. Des Weiteren konnte eine Anreicherung von aliphatischen und Kohlenhydrat-Strukturen in der Deckschicht festgestellt werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der Arbeit kann von einer SMP-Anreicherung ausgegangen werden, welche besonders auf die unteren Fraktionen der Foulingsschicht zurückzuführen war. Die vorwiegend hydrophoben SMP lagern sich somit bevorzugt an der hydrophoben Membran an.

Etwa 50 % des Gesamt-Foulingwiderstands der Membranen konnte auf irreversibles Fouling und 50 % auf reversibles Fouling zurückgeführt werden.

Mit zunehmenden Brutto-Permeatfluss bildet sich eine kompaktere Kuchenfoulingsschicht mit höherem hydraulischen/spezifischen Widerstand aus. Der spezifische Widerstand der Foulingsschicht nahm zur Membran hin zu. Dies wurde auf eine kompaktere Struktur in den Poren aufgrund eines erhöhten Wasserdrucks zurückgeführt, während der Filterkuchen eine poröse Struktur aufwies.

Porenfouling wurde überwiegend von SMP verursacht. Somit konnte gezeigt werden, dass selbst geringe Mengen an gelösten makromolekularen Substanzen erheblich zum Fouling beitragen. Unterschiedliche Molekülkonformationen führten dabei zu spezifischen Anreicherungen von Kohlenhydraten und Proteinen in der Foulingsschicht. Dicht gepackte, globuläre Strukturen, wie Proteine, dringen bevorzugt in die Membranporen ein, wo sie durch sterische Effekte und/oder Adsorption zurückgehalten werden und somit maßgeblich zum irreversiblen Porenfouling beitragen. Im Gegensatz dazu weisen die meisten Kohlenhydrate langkettige oder verzweigte Strukturen auf und lagerten sich bevorzugt auf der

Membranoberfläche ab. Durch Rückspülen und/oder Relaxation konnten diese somit besser von der Membran entfernt werden als Proteine.

Ergebnisse aus Langzeit-Foulinguntersuchungen zeigten eine deutliche Abnahme der Foulingrate und einen deutlichen Einfluss von irreversiblen Porenfouling auf die Zunahme des TMP. Mit zunehmendem TMP konnte ein größerer Anteil SMP von den Membranen extrahiert werden, während die Kuchenfoulingschicht keine großen Veränderungen zeigte.

In Abbildung 59 sind das Vorgehen und die Ergebnisse der vorliegenden Dissertation vereinfacht, schematisch dargestellt.

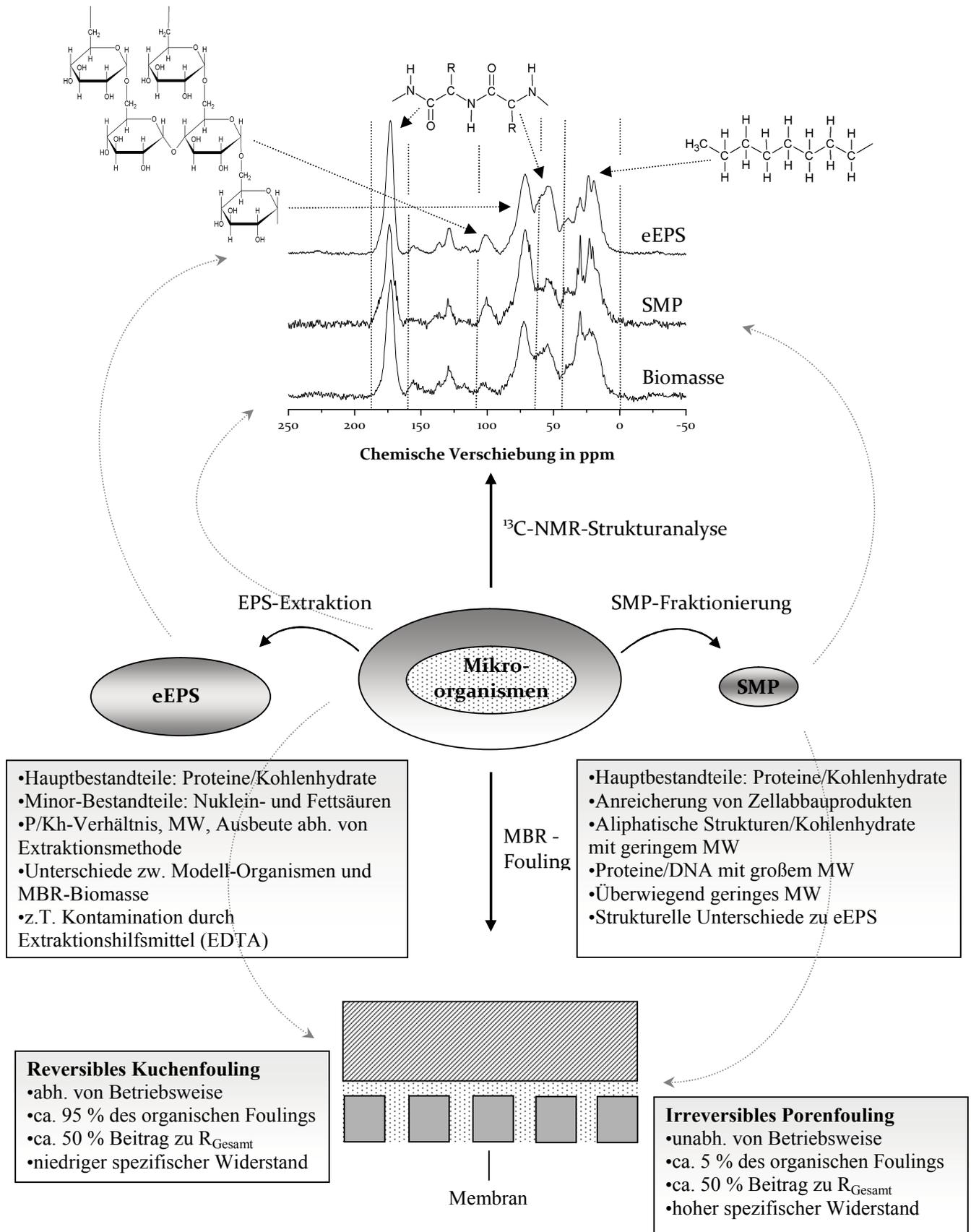


Abbildung 59: Vereinfachte schematische Darstellung des Vorgehens und der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation.

Im Laufe der Arbeit ergaben sich weitere interessante Fragestellungen für zukünftige Untersuchungen:

Optimierung der Auswertung der NMR-Spektren. Aufgrund der starken Überlappungen einzelner Signalgruppen ist das Auswertungsverfahren nicht immer bzw. mit einigen Einschränkungen anwendbar. Die Untersuchungen weiterer EPS-Proben aus anderen Biofilm-Systemen lässt eine Optimierung bei der Anpassung der Integrationsgrenzen zu. Dies führt zu einem exakteren Auswertungs-Algorithmus der NMR-Spektren. In Kombination dazu ist es sinnvoll spezifische Dekonvolutionsmethoden unter Berücksichtigung unterschiedlicher Linienbreiten der Signalgruppen anzuwenden und somit weitere Strukturen aufzuklären. Dies eröffnet die Möglichkeit komplexe Biopolymer-Proben unabhängig von deren Herkunft und Zusammensetzung zu quantifizieren.

Kombination verschiedener Extraktionsverfahren. Besonders durch Kombination verschiedener Extraktionsverfahren und die Anwendung spezifischer Extraktionshilfsmittel war es möglich, die EPS-Ausbeuten zu erhöhen. Dennoch konnte ein Großteil der EPS nicht extrahiert werden. Eine vielversprechende Methode für weitere Studien könnte eine mehrstufige Extraktion aus einer Kombination der thermischen und der F-NaOH-Methode darstellen.

Untersuchung adsorptiver Vorgänge an Membranen und Foulinguntersuchungen mit Modell-Substanzen und SMP. Die Ergebnisse der Foulinguntersuchungen zeigten den großen Einfluss von SMP auf die Verblockung der Membranen. Um weitere Erkenntnisse über das Kuchen- und Porenfouling zu erlangen, sollten adsorptive Vorgänge an der Oberfläche der Membran und in ihren Poren untersucht werden. Dazu können getrennte, statische Adsorptionsversuche mit den EPS-Modell-Substanzen und im Anschluss mit den verschiedenen SMP-Größenfraktionen durchgeführt werden. Dies liefert Informationen über den Einfluss der Oberflächeneigenschaften von Membran und Poren auf die Anlagerung von SMP. Eine sich daraus ergebende interessante Fragestellung ist die Bedeutung der primären EPS-Deckschicht für die Anlagerung von Mikroorganismen und Partikel im Rahmen des sich anschließenden Biofouling-Prozesses.

Online-Monitoring der Foulingkomponenten. Anhand der Strukturaufklärung der EPS und der Analyse der Deckschichten konnten spezifische Foulingkomponenten bestimmt werden. Aufbauend auf den Untersuchungen ist es nützlich ein Verfahren zu entwickeln, um bestimmte Indikatorgruppen mittels einfacher Online-Technologie bestimmen zu können. So kann der Konzentrationsverlauf der Foulingkomponenten verfolgt und auftretendes Fouling frühzeitig erkannt werden, so dass entsprechende Gegenmaßnahmen getroffen werden können. Eine Untersuchung der Membranen aus dem kommunalen MBR liefert in diesem

Zusammenhang weitere Informationen über die hauptverantwortlichen Fouling-Komponenten.

Ergänzung der SEC-Untersuchungen. Mittels SEC konnte gezeigt werden, dass SMP in verschiedenen Molekülgrößen und Zusammensetzungen in MBR auftreten. SEC liefert somit wertvolle Ergebnisse und könnte bei zukünftigen MBR-Untersuchungen durch Untersuchungen der SMP im MBR, im Permeat und in den Deckschichtfraktionen zur detaillierten Aufklärung des Rückhalts verschiedener SMP-Fractionen im MBR beitragen.

Langzeit-Foulingexperimente. Aufbauend auf den Kurzzeit-Experimenten könnten weitere Langzeitversuche zum Fouling in MBR mit verschiedenen Betriebsweisen durchgeführt werden. Ein wichtiger Aspekt, wäre dabei neben physikalischen Reinigungsverfahren, den Gebrauch von chemischen Reinigungsverfahren bei den Langzeitstudien zu untersuchen. Darüber hinaus könnte versucht werden durch eine Kombination verschiedener Reinigungsverfahren und Brutto-Permeatflüsse die Permeabilität längerfristig aufrecht zu erhalten.

Die vorliegende Arbeit liefert einen wesentlichen Beitrag zur Strukturaufklärung von EPS aus Biofilmen und unterstreicht den ausgeprägten Einfluss von EPS auf das Membranfouling in MBR. Aufbauend auf den Ergebnissen und fortführenden Studien ist es möglich die für das Fouling verantwortlichen Substanzen im MBR-System zu detektieren und ihnen gezielt entgegen zu wirken. Dies stellt die Grundlage für einen nachhaltigen MBR-Prozess dar, welcher nach wie vor durch die durch Fouling verminderte Prozessleistung mit hohen Reinigungs- und Betriebskosten verbunden ist.

Literaturverzeichnis

- 1 Agis, H. (2001): Energieoptimierung von Kläranlagen - Detailuntersuchungen von 21 Anlagen. Bundesministerium für Land- und Forstwirtschaft, Umwelt und Wasserwirtschaft, Österreich, Wien.
- 2 Aguilera, A., Souza-Egipsy, V., Martin-Uriz, P.S., Amils, R. (2008): Extraction of extracellular polymeric substances from extreme acidic microbial biofilms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 78, 1079-1088.
- 3 Alcamo, I.E. (1997): Fundamentals of microbiology. Chapter 11. Benjamin Cummings, Menlo Park.
- 4 Al-Halbouni, D. (2008): Role of extracellular polymeric substances and metals in fouling of membranes in the wastewater treatment. Dissertation, RWTH Aachen.
- 5 Al-Halbouni, D., Dott, W., Hollender, J. (2009): Occurrence and composition of extracellular lipids and polysaccharides in a full-scale membrane bioreactor. *Water Res.* 43, 97-106.
- 6 Arevalo-Fero, C., Reil, G., Görg, A., Eberl, L., Riedel, K. (2005): Biofilm formation of *Pseudomonas putida* IsoF: the role of quorum sensing as assessed by proteomics. *Syst. Appl. Microbiol.* 28, 87-114.
- 7 ATV-DVWK (2000): Membranbelebungsverfahren - Arbeitsbericht des ATV-DVWK-Fachausschuss KA-7 "Membranbelebungsverfahren" - Korrespondenz Abwasser 10(47), 1547-1553.
- 8 Auerbach, H.D., Sorensen, C., Hansma, G.H., Holden, P.A. (2000): Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *J. Bacteriol.* 182(13), 3809-3815.
- 9 Bacchin, P., Aimar, P., Field, R.W. (2006): Critical and sustainable fluxes: Theory, experiments and applications. *J. Membr. Sci.* 281, 42-69.
- 10 Basile, F., Voorhees, K.J., Hadfield, T.L. (1995): Microorganism gram-type differentiation based on pyrolysis-mass spectroscopy of bacterial fatty acid methyl ester extracts. *Appl. Environ. Microbiol.* 61(4), 1534-1539.
- 11 Berger, S., Braun, S. (2004): 200 and more basic NMR experiments. 838. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- 12 Berges, J.A., Fisher, A.E., Harrison, P.J. (1993): A comparison of Lowry, Bradford and Smith protein assays using different protein standards and protein isolated from marine diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Mar. Biol.* 115, 187-193.
- 13 Bin, Z., Baosheng, S., Min, J., Taishi, G., Zhenghong, G. (2008): Extraction and analysis of extracellular polymeric substances in membrane fouling in submerged MBR. *Desalination* 227, 286-294.
- 14 Bishop, P.L. (1997): Biofilm structure and kinetics. *Water Sci. Technol.* 36, 287-294.
- 15 Bohn, T. (1993): Wirtschaftlichkeit und Kostenplanung von kommunalen Abwasserreinigungsanlagen. Schriftenreihe des Instituts für Baubetriebslehre der Universität Stuttgart. Expert Verlag, Ehningen.

- 16 Bouhabila, E.H., Ben Aim, R., Buisson, H. (1998): Microfiltration of activated sludge using submerged membrane with air bubbling (application to wastewater treatment). *Desalination* 118, 315-322.
- 17 Brinkmeyer, J. (2008): Membran-Bio-Reaktoren mit organischen und anorganischen getauchten Niederdruckmembranen. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- 18 Brown, M.J., Lester, J.N. (1980): Comparison of bacterial extracellular polymer extraction methods. *Appl. Environ. Microbiol.* 40, 179-185.
- 19 Bruus, J.H., Nielsen, P.H., Keiding, K. (1992): On the stability of activated sludge flocs with implications to dewatering. *Water Res.* 26, 1597-1604.
- 20 Bura, R., Cheung, M., Liao, B., Finlayson, J., Lee, B.C., Droppo, I.G., Leppard, G.G., Liss, S.N. (1998): Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Water Sci. Technol.* 37(4-5), 325-333.
- 21 Carman, P.C. (1938): Fundamental principles of industrial filtration- A critical review of present knowledge. *Trans. Inst. Chem. Eng.* 16, 168-188.
- 22 Celik, G.Y., Aslim, B., Beyatli, Y. (2008): Characterisation and production of the exopolysaccharides (EPS) from *Pseudomonas aeruginosa* G1 and *Pseudomonas putida* G12 strains. *Carbohydr. Polym.* 73,178-182.
- 23 Chang, I.S., Le Clech, P., Jefferson B., Judd, S. (2002): Membrane fouling in membrane bioreactors for wastewater treatment. *J. Environ. Eng. ASCE*, 128, 1018-1029.
- 24 Chen, M.-Y., Lee, D.-J., Yang, Z., Peng, F., Lai, J.Y. (2006): Fluorescent staining for study of extracellular polymeric substances in membrane biofouling layers. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6642-6646.
- 25 Cho, B.D., Fane, A.G., Ghayeni, S.B., Kim, K.J., Parameshwaran, K. (1999): Biological waste water treatment and membranes. In: *Proceedings of Membrane Technology in Environmental Management*. 263-269. Tokyo.
- 26 Cho B.D., Fane, A.G. (2002): Fouling transients in nominally sub-critical flux operation of a membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.* 209, 391-403.
- 27 Cho, J. Song, K.-G., Ahn, K.H. (2005): The activated sludge and microbial substances influences on membrane fouling in submerged membrane bioreactor: unstirred batch cell test. *Desalination* 183, 425-429.
- 28 Christensen, B.E. (1989): The role of extracellular polysaccharide biofilms. *J. Biotechnol.* 10, 181-202.
- 29 Chu, H.P., Li, X. (2005): Membrane fouling in a membrane bioreactor (MBR): Sludge cake formation and fouling characteristics. *Biotechnol. Bioeng.* 90, 323-331.
- 30 Chua, H.C., Arnot, T.C., Howell, J.A. (2002): Controlling fouling in membrane bioreactors operated with a variable throughput. *Desalination* 149, 225-229.
- 31 Clara, M., Strenn, B., Gans, O., Martinez, E., Kreuzinger, N., Kroiss, H. (2005): Removal of selected pharmaceuticals in a membrane bioreactor and conventional wastewater treatment plants. *Water Res.* 39, 4797-4807.
- 32 Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M. (2006): Relations between extraction protocols for activated sludge extracellular polymeric substances (EPS) and EPS complexation properties Part I. Comparison of the efficiency of eight EPS extraction methods. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 237-245.

- 33 Comte, S., Guibaud, G., Baudu, M. (2007): Effect of extraction method on EPS from activated sludge: An HPSEC investigation. *J. Hazard. Mater.* 140(1), 129-137.
- 34 Conrad, A., Kontro, M., Keinaenen, M., Cadoret, M.M., Faure, P., Mansuy-Huaultt, L., Block, J.-C. (2003): Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* 38(10), 1093-1105.
- 35 Cooke, W.B. (1959): An ecological history of *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud. *Mycopathologica* 12, 1-45.
- 36 Costerton, J.W., Lewandowski, Z. (1995): Microbial biofilms. *Ann. Rev. Microbiol.* 49, 711-745.
- 37 Costerton, J.W., Lewandowski, Z., deBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., James, G. (1994): Bacterial biofilms - the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176, 2137-2142.
- 38 Dasinger, B.L., McArthur, H.A., Lengen, J.P., Smogowicz, A.A. (1994): Composition and rheological properties of extracellular polysaccharids produced by *Pseudomonas* spec.. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1364-1366.
- 39 Davies, E.M. (1988): Protein assay: a review of common techniques. *Am. Biotechnol. Lab.* 6, 28-37.
- 40 de Beer, D., Stoodley, P. (1995): Relation between structure of an aerobic biofilm and transport phenomena. *Water Sci. Technol.* 32, 11-18.
- 41 Decho, A.W. (1990): Microbial exopolymer secretions in ocean environments: Their role(s) in food webs and marine processes. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.* 280, 73-153.
- 42 Decho, A.W. (1999): Chemical communication within microbial biofilms - chemotaxis and quorum sensing in bacterial cells. In: Wingender J., Neu T.R., Flemming H.C. (Hrsg.): *Microbial extracellular polymer substances*. 155-169. Springer Verlag, Heidelberg-Berlin.
- 43 Dignac, M.-F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchert, A., Snidaro, D., Scribe, P. (1998): Chemical description of extracellular polymers: Implication on activated sludge floc structure. *Water Sci. Technol.* 38(8-9), 45-53.
- 44 DIN EN 12879 (2000): Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Glühverlustes der Trockenmasse; Deutsche Fassung EN 12879.
- 45 DIN EN 12880 (2000): Charakterisierung von Schlämmen - Bestimmung des Trockenrückstandes und des Wassergehalts; Deutsche Fassung EN 12880.
- 46 Drews, A., Vocks, M., Bracklow, U., Iversen, V., Kraume, M. (2008): Does fouling in MBRs depend on SMP?. *Desalination* 231, 141-149.
- 47 Dubois, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.R., Rebers, P.A., Smith, F. (1956): Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal. Chem.* 28, 350-356.
- 48 Duquesnoy, E., Castola, V., Casanova, J. (2008): Identification and quantitative determination of carbohydrates in ethanolic extracts of two conifers using ¹³C NMR spectroscopy. *Carbohydr. Res.* 343, 893-902.
- 49 Ebert, K.H., Schenk, G., Rupprecht, G., Brosche, M., Hsu Wei, W., Heinickes, D. (2003): Die Molekulargewichte nativer Dextrane. *Die Makromolekulare Chemie*, 96(1), 206-220.

- 50 Evenblij, H., Geilvoet, S., Graaf van der, J.H.J.M., Roest van der, H.F. (2005): Filtration characterisation for assessing MBR performance: three cases compared. *Desalination* 178, 115-124.
- 51 Faber, E.J., Zoon, P., Kamerling, J.P., Vliegthart, J.F.G. (1998): The exopolysaccharides produced by *Streptococcus thermophilus* Rs and Sts have the same repeating unit but differ in the viscosity of their milk cultures. *Carbohydr. Res.* 310, 269-276.
- 52 Fane, A.G., Beatson, P., Li, H. (1999): Membrane fouling and its control in environmental applications. In: *Proceedings of Membrane Technology in Environmental Management*. 12-19. Tokyo.
- 53 Field, R.W., Wu, D., Howell, J.A., Gupta, B.B. (1995): Critical flux concept for microfiltration fouling, *J. Membr. Sci.* 100, 259-272.
- 54 Flemming, H.-C. (1995): Sorption sites in biofilms. *Water Sci. Technol.* 32, 27-33.
- 55 Flemming, H.-C., Leis, A. (2002): Sorption properties of biofilms. In: Bitton, G. (Hrsg.): *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. 2958-2967. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 56 Flemming, H.-C., Wingender, J. (2001a): Biofilme - die bevorzugte Lebensform der Bakterien: Flocken, Filme und Schlämme. *Biologie in unserer Zeit* 31(3), 169-180.
- 57 Flemming, H.-C., Wingender, J. (2001b): Relevance of microbial extracellular polymeric substances (EPSs) - part I: structural and ecological aspects. *Water Sci. Technol.* 43, 1-8.
- 58 Flemming, H.-C., Wingender, J. (2003a): The crucial role of extracellular polymeric substances in biofilms. In: Wuertz, S., Bishop, P.L., Wilderer, P.A. (Hrsg.): *Biofilms in wastewater treatment - An interdisciplinary approach*. 178- 210. IWA Publishing, London.
- 59 Flemming, H.-C., Wingender, J. (2003b): Biofilms. In: Steinbüchel, A. (Hrsg.): *Biopolymers*. 209-245. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- 60 Flemming, H.-C., Wingender, J. (2002): Extracellular polymeric substances (EPS): Structural, ecological and technical aspects. In: Bitton, G. (Hrsg.): *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. 1223-1231. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 61 Flemming, H.-C. (1994): Biofilme, Biofouling und mikrobielle Schädigung von Werkstoffen, *Stuttgarter Berichte zur Siedlungswasserwirtschaft* 129, Oldenburg Verlag, München.
- 62 Friebolin, H. (2006): Ein- und zweidimensionale NMR-Spektroskopie - Eine Einführung. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- 63 Frimmel, F.H., Lankes, U., Lüdemann, H.-D., Müller, M. (2005): Characterisation of humic substances from waste water. In: Ghabbour E.A., Davies G. (Hrsg.): *Humics substances - Molecular details and applications in land and water conversation*. 3-22. Taylor and Francis Inc, New York.
- 64 Frølund, B., Palmgren, R., Kleiding, K., Nielsen, P.H. (1996): Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchanger resin. *Water Res.* 30, 1749-1758.
- 65 Frølund, B., Griebe, T., Nielsen, P.H. (1995): Enzymatic activity in the activated sludge floc matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 755-761.

- 66 Gacesa, P., Russell, N.J. (1990): The structure and properties of alginate. In: Gacesa, P., Russell, N.J. (Hrsg.): *Pseudomonas* infection and alginates. 29-49. Chapman and Hall, London.
- 67 Garnier, C., Görner, T., Lartiges, S.A., de Donato, P. (2005): Characterisation of activated sludge exopolymers from various origins: A combined size-exclusion chromatography and infrared microscopy study. *Water Res.* 39, 3044-3054.
- 68 Garret, J.M., Stairs, R.A., Annett, R.G. (1988): Thermal denaturation and coagulation of whey proteins: Effect of sugars. *J Dairy Sci* 71, 10-16.
- 69 Gehrke, T., Hallmann, R., Kinzler, K., Sand, W. (2001): The EPS of *Acidithiobacillus ferrooxidans* - a model of structure-function relationships of attached bacteria and their physiology. *Environ. Microbiol.* 64, 2743-2747.
- 70 Germain, E., Stephenson, T., Pearce, P. (2004): Biomass characteristics and membrane aeration: Toward a better understanding of membrane fouling in submerged membrane bioreactors (MBRs). *Biotechnol. Bioeng.* 90, 316-322.
- 71 Gibbs, P.A., Seviour, R.J. (1998): The production of exopolysaccharides by *Aureobasidium pullulans* in fermenters with low-shear configurations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 49, 168-174.
- 72 Gibson, L.H., Coughlin, R.W. (2002): Optimization of high weight pullulan production by *Aureobasidium pullulans* in batch fermentations. *Biotechnol. Prog.* 18, 675-678.
- 73 Golchin, A., Clarke, P., Oades, J.M. (1996): The heterogeneous nature of microbial products as shown by solid-state ¹³C CP/MAS NMR spectroscopy. *Biogeochemistry* 34, 71-97.
- 74 Goodwin, J.A.S., Forster, C.F. (1985): A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Water Res.* 19, 527-533.
- 75 Gorenflo, A. (2003): Rückhalt und Fouling von natürlichen organischen Substanzen bei der Nano- und Ultrafiltration. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH).
- 76 Görner, T., de Donato, P., Ameil, M.-H., Montarges-Pelletier, E., Lartiges, B.S. (2003): Activated sludge exopolymers: separation and identification using size exclusion chromatography and infrared micro-spectroscopy. *Water Res.* 37, 2388-2393.
- 77 Guibaud, G., Comte, S., Bordas, F., Dupuy, S., Baudu, M. (2005): Comparison of the complexation potential of extracellular polymeric substances (EPS), extracted from activated sludges and produced by pure bacteria strains, for cadmium, lead and nickel. *Chemosphere* 59, 629-638.
- 78 Günther, H. (1992): NMR- Spektroskopie. 3.Auflage. G. Thieme Verlag, Stuttgart-New York.
- 79 Haack, S.K., Garchow, H., Odelson, D.A., Forney, L.J., Klug, M.J. (1994): Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty-acid methyl-ester profiles of model bacterial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(7), 2483-2493.
- 80 Hanemaaijer, J.H., Robbertsen, Z., van den Boomgard, T., Gunnink, J.W. (1989): Fouling of ultrafiltration membranes-The role of protein adsorption and salt precipitation. *J. Membr. Sci.* 40(2), 199-2217.

- 81 Higgins, M.J., Novak, J.T. (1997): Characterization of exocellular protein and its role in bioflocculation. *J. Environ. Eng.* 123, 479-485.
- 82 Hirayama, K., Akashi, S., Furuya, M., Fukuhara, K.I. (1990): Rapid confirmation and revision of the primary structure of bovine serum albumin by ESIMS and FRIT-FAB LC/MS. *Biochem. Biophys. Res. Commu.* 173, 639-646.
- 83 Hong, S.P., Bae, T.H., Tak, T.M., Hong, S., Randall, A. (2002): Fouling control in activated sludge submerged hollow fiber membrane bioreactors, *Desalination* 143, 219-228.
- 84 Horan, N.J., Eccles, C.R. (1986): Purification and characterization of extracellular polysaccharide from activated sludges. *Water Res.* 20, 1427-1432.
- 85 Huang, X., Liu, R., Qian, Y. (2000): Behavior of soluble microbial products in a membrane bioreactor. *Process Biochem.* 36, 401-406.
- 86 Huber, S.A., Frimmel, F.H. (1991): Flow injection analysis of organic and inorganic carbon in the low-ppb range. *Anal. Chem.* 63, 2122-2130.
- 87 Huber, S. (1992): Entwicklung und Einsatz eines Analysenverbundsystems zur chromatographischen Charakterisierung natürlicher organischer Wasserinhaltsstoffe. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH).
- 88 Huber, S., Frimmel, F.H. (1996): Gelchromatographie mit Kohlenstoffdetektion (LC-DOC): Ein rasches und aussagekräftiges Verfahren zur Charakterisierung hydrophiler Wasserinhaltsstoffe. *Vom Wasser* 86, 277-290.
- 89 Iversen, V., Drews, A., Schmidt, T., Lesjean, B., Fatarella, E., Kraume, M. (2007): Textile Filtermedien für den Einsatz in Membranbelebungsanlagen. *Chem. Ing. Tech.* 79, 1945-1950.
- 90 Jacob, G.S., Schaefer, J., Wilson, G.E. (1985): Solid-state ^{13}C and ^{15}N nuclear magnetic resonance studies of alanine metabolism in *Aerococcus viridans* (*Gaffkya homari*). *J. Biol. Chem.* 260(5), 2777-2781.
- 91 Jahn, A., Griebe, T., Nielsen, P.H. (1998): Composition of *Pseudomonas putida* biofilms: Accumulation of protein in the biofilm matrix. *Biofouling* 14(1), 49-57.
- 92 Jang, N., Ren, X., Kim, G., Ahn, C., Cho, J., Kim, I.S. (2007): Characteristics of soluble microbial products and extracellular polymeric substances in the membrane bioreactor for water reuse. *Desalination* 202, 90-98.
- 93 Jernejc, K., Cimerman, A., Perdih, A. (1986): Comparison of different methods for protein determination in *Aspergillus niger* mycelium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 23, 445-448.
- 94 Jiang, T., Kennedy, M.D., van der Meer, W., Vanrolleghem, P.A., Schippers, J.C. (2003): The role of blocking and cake filtration in MBR fouling. *Desalination* 157, 335-343.
- 95 Jonsson, G., Pradanos, P., Hernandez, A. (1996): Fouling phenomena in microporous membranes - Flux decline kinetics and structural modifications. *J. Membr. Sci.* 112, 171-183.
- 96 Jorand, F., Boué-Bigne, F., Block, J.C., Urbain, V. (1998): Hydrophobic/hydrophilic properties of activated sludge exopolymeric substances. *Water Sci. Technol.* 37(4-5), 307-315.

- 97 Judd, S. (2008): The status of membrane bioreactor technology. *Trends Biotechnol.* 26(2), 109-116.
- 98 Kachlany, S.C., Levery, S.B., Kim, J., Reuhs, L., Lion, L.W., Ghiorse, W.C. (2001): Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environ. Microbiol.* 12, 774-784.
- 99 Kögel-Knaber, I. (2002): The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as inputs to soil organic matter. *Soil Biol. Biochem.* 34, 139-162.
- 100 Krampe J., Laufer R. (2006): Betriebserfahrungen der ersten zwei Betriebsjahre mit der Membranbelebungsanlage Waldmössingen der Stadtwerke Schramberg. Stadt Schramberg.
- 101 Kreysig, D. (2001): Der Biofilm - Bildung, Eigenschaften und Wirkungen. *Bioforum* 24, 40-43.
- 102 Kubin, K. (2004): Einfluss unterschiedlicher Verfahrenskonzepte auf Substratabbau und Nährstoffverwertung in Membranbelebungsanlagen zur kommunalen Abwasserreinigung. Dissertation, TU Berlin.
- 103 Laabs, C.N., Amy, G.L., Jekel, M. (2006): Understanding the size and character of fouling-causing substances from effluent organic matter (EfOM) in low-pressure membrane filtration. *Environ. Sci. Technol.* 40, 4495-4499.
- 104 Labare, M.P., Guthrie, K., Weiner, R.M. (1989): Polysaccharide exopolymer adhesives from periphytic marine bacteria. *J. Adhes. Sci. Technol.* 3, 213-223.
- 105 Lankes, U. (2001): Festkörper-NMR-Spektroskopie zur Charakterisierung von refraktären organischen Säuren in Gewässern. Dissertation, Universität Regensburg.
- 106 Lankes, U., Lüdemann, H.-D., Frimmel, F.H. (2008): Search for basic relationships between “molecular size” and “chemical structure” of aquatic natural organic matter – Answers from ^{13}C and ^{15}N CPMAS NMR spectroscopy. *Water Res.* 42, 1051-1060.
- 107 Lankes, U., Müller, M.B., Weber, M., Frimmel, F.H. (2009): Reconsidering the quantitative analysis of organic carbon concentrations in size exclusion chromatography. *Water Res.* 43, 915-924.
- 108 Lapidou, C.S., Rittmann, B.E. (2002): A unified theory for extracellular polymeric substances, soluble microbial products, and active and inert biomass. *Water Res.* 36, 2711-2720.
- 109 Lattner, D. (2003): Untersuchung schwacher Wechselwirkungen innerhalb von Biofilmen mittels ^{13}C - NMR – Spektroskopie. Dissertation, Universität Duisburg Essen.
- 110 Lazaridou, A., Biliaderis, C.G., Kontogiorgos, V. (2003): Molecular weight effects on the solution rheology of pullulan and mechanical properties of its films. *Carbohydr. Polym.* 52, 151-166.
- 111 Le-Clech, P., Chen, V., Fane, T.A.G. (2006): Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment. *J. Membr. Sci.* 284(1-2), 17-53.
- 112 Le-Clech, P., Chen, V., Fane, T. (2006a): Fouling in membrane bioreactors used in wastewater treatment - A review. *J. Membr. Sci.* 284, 17-53.

- 113** Lee, J., Ahn, W.-Y., Lee, C.-H. (2001a): Comparison of the filtration characteristics between attached and suspended growth microorganisms in submerged membrane bioreactors. *Water Res.* 35(19), 2435-2445.
- 114** Lee, J.-H., Kim, J.-H., Zhu, I.-H., Zhan, X.-B., Lee, J.-W., Shin, D.-H., Kim, S.-K. (2001): Optimization of conditions for the production of pullulan and high molecular weight pullulans by *Aureobasidium pullulans*. *Biotechnol. Lett.* 23, 817-820.
- 115** Lee, W., Kang, S., Shin, H. (2003): Sludge characteristics and their contribution to microfiltration in submerged membrane bioreactors. *J. Membr. Sci.* 216, 217-227.
- 116** Leppard, G.G., Droppo, I.G., West, M.M., Liss, S.N. (2003): Compartmentalization of metals within the diverse colloidal matrices comprising activated sludge microbial flocs. *J. Environ. Qual.* 32(6), 2100-2108.
- 117** Liang, S., Liu, C., Song, L. (2007): Soluble microbial products in membrane bioreactor operations: Behaviours, characteristics, and fouling potential. *Water Res.* 41, 95-101.
- 118** Liu, H., Fang, H.H.P. (2002): Extraction of extracellular polymeric substances (EPS) of sludges. *J. Biotechnol.* 95, 249-256.
- 119** Liu, H., Fang, H.H.P. (2003): Influences of extracellular polymeric substances (EPS) on flocculation, settling and dewatering of activated sludge. *Crit. Rev. Env. Sci. Technol.* 33, 237-273.
- 120** Liu, Y., Tay, J.H. (2002): The essential role of hydrodynamic shear force in the formation of biofilm and granular sludge. *Water Res.* 36, 1653-1665.
- 121** Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
- 122** Lucarini, A.C., Kilikian, B.V. (1999): Comparative study of Lowry and Bradford methods: interfering substances. *Biotechnol. Tech.* 13, 149-154.
- 123** Lyko, S., Al-Halbouni, D., Wintgens, T., Janot, A., Hollender, J., Dott, W., Melin, T. (2007): Polymeric compounds in activated sludge supernatant - Characterisation and retention mechanisms at a full-scale municipal membrane bioreactor. *Water Res.* 41, 3894-3902.
- 124** Malamis, S., Andreadakis, A. (2009): Fractionation of proteins and carbohydrates of extracellular substances in a membrane bioreactor system. *Biotechnol. Tech.* 100, 3350-3357.
- 125** Mao, J., Cory, R.M., McKnight, D.M., Schmidt-Rohr, K. (2007): Characterisation of a nitrogen-rich fulvic acid and its precursor algae from solid state NMR. *Org. Geochem.* 38, 1277-1292.
- 126** Mason, E.A., Lonsdale, H.K. (1993): Statistical-Mechanical Theory of membrane transport. *J. Membr. Sci.* 51, 1-81.
- 127** Mayer, C, Lattner, D., Schürks, N. (2001): ¹³C nuclear magnetic resonance studies on selectively labelled bacterial biofilms. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 26, 62-69.
- 128** McSwain, B.S., Irvine, R.L., Hausner, M., Wilderer, P.A. (2005): Composition and distribution of extracellular polymeric substances in aerobic flocs and granular sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 1051-1057.

- 129 Melin, T. (1998): Membranprozesse von den Grundlagen zu aktuellen Anwendungen (Hochschulkurs, Juni 1998, Aachen). Institut für Verfahrenstechnik der RWTH Aachen.
- 130 Melin, T., Rautenbach R. (2007): Membranverfahren. Grundlagen der Modul- und Anlagenauslegung. 3. Auflage. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg.
- 131 Meng, F., Zhang, H., Li, Y., Zhang, X., Yang, F. (2005): Application of fractal permeation model to investigate membrane fouling in membrane bioreactor. *J. Membr. Sci.* 262, 107-116.
- 132 Meng, F., Zhang, H., Yang, F., Li, Y., Xiao, J., Zhang, X. (2006): Effect of filamentous bacteria on membrane fouling in submerged membrane bioreactors. *J. Membr. Sci.* 272(1-2), 161-168.
- 133 Meng, F., Zhang, H., Yang, F., Liu, L. (2007): Characterisation of cake layer in submerged membrane bioreactor. *Environ. Sci. Technol.* 41, 4065-4070.
- 134 Merten, U. (1966): Desalination by reverse osmosis. The M.I.T. Press, Cambridge.
- 135 Metzger, U., Lankes, U., Hardy, E.H., Gordalla, B., Frimmel F.H. (2006): Monitoring the growth of an *Aureobasidium pullulans* biofilm in a bead-packed reactor via magnetic resonance imaging detection. *Biotechnol. Lett.* 28(16), 1305-1311.
- 136 Mitchell, D.A., Gumbira-Salid, E., Greenfield, P.F., Doelle, H.W. (1991): Protein measurement in solid-state fermentation. *Biotechnol. Tech.* 26. 437-442.
- 137 Müller, M.B.(2004): Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren für die strukturelle Charakterisierung der gelösten organischen Substanz in Gewässern. Dissertation, Universität Karlsruhe (TH).
- 138 Nagaoka, H., Ueda, S., Miya, A. (1996): Influence of bacterial extracellular polymers on the membrane separation activated sludge process. *Water Sci. Technol.* 34, 165-172.
- 139 Naylson Moreira, M. (2004): Extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) in vertikal durchströmten Pflanzenanlagen. Dissertation, TU Berlin.
- 140 Nelson, P.N., Baldock, J.A. (2005): Estimating the molecular composition of a diverse range of natural organic materials from solid-state ¹³C NMR and elemental analysis. *Biogeochemistry* 72, 1-34.
- 141 Ng, F. M.-W., Dawes, E.A. (1973): Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *J. Biochem.* 132, 129-140.
- 142 Nielsen, P.H., Jahn, A. (1999): Extraction of EPS. In: Wingender J., Neu T.R., Flemming H.-C. (Hrsg.): Microbial extracellular polymeric substances. Springer Verlag, Berlin.
- 143 Nielsen, P.H., Jahn, A. (1997): Conceptual model for production composition of exopolymers in biofilms. *Water Sci. Technol.* 36, 11-19.
- 144 Noguera, D.R., Araki, N., Rittmann, B.E. (1994): Soluble microbial products (SMP) in anaerobic chemostats. *Biotechnol. Bioeng.* 44, 1040-1047.
- 145 Nuengjamnong, C., Kweon, J.H., Cho, J., Polprasert, C., Ahn, K.-H. (2005): Membrane fouling caused by extracellular polymeric substances during microfiltration processes. *Desalination* 179, 117-124.

- 146** O'Leary, W.M. (1962): The fatty acids of bacteria. *Bacteriol. Rev.* 26(4): 421-447.
- 147** Okabe, S., Kuroda, H., Watanabe, Y. (1998): Significance of biofilm structure on transport of inert particulates into biofilms. *Water Sci. Technol.* 38, 163-170.
- 148** Okabe, S., Yasuda, T., Watanabe, Y. (1997): Uptake and release of inert fluorescence particles by mixed population biofilms. *Biotechnol. Bioeng.* 53, 459-469.
- 149** Palmgren, R., Nielsen, P.H. (1996): Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures. *Water Sci. Technol.* 34, 233-240.
- 150** Park, C., Novak, T. (2007): Characterisation of activated sludge exocellular polymers using several cation-associated extraction methods. *Water Res.* 41, 1679-1688.
- 151** Peberdy, J.F. (1990): Fungal cell walls – a review. In: Kuhn, P.J., Trinci, A.P.J., Jung, M.J., Goosey, M.W., Copping, L.G. (Hrsg.): *Biochemistry of cell walls and membranes in fungi.* 5-30. Springer Verlag, Berlin.
- 152** Perminova, I.V., Frimmel, F.H., Kovalenskii, D.V., Abbt-Braun, G., Kudryavtsev, A.V., Hesse, S. (1998): Development of a predictive model for calculation of molecular weight of humic substances. *Water Res.* 32, 872-882.
- 153** Peterson, G.L. (1979): Review of the folin protein quantification method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal. Biochem.* 100, 201-220.
- 154** Picioreanu, C., van Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. (2000): Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation - a two-dimensional modelling study. *Biotechnol. Bioeng.* 69, 504-515.
- 155** Pinnekamp, J., Beier, S., Arndt, D. (2007): Das Membranbelebungsverfahren bei der Abwasserbehandlung – Anwendung und Perspektiven. In: Melin, T., Pinnekamp, J., Dohmann, M. (Hrsg.): *“Membrantechnik in der Wasseraufbereitung und Abwasserbehandlung: 7. Aachener Tagung Wasser und Membranen“*, Aachen.
- 156** Pizzoferrato, L., Manzi, P., Bertocchi, F., Fanelli, C., Rotilio, G., Paci, M. (2000): Solid state ¹³C CP MAS NMR spectroscopy of mushrooms gives directly the ratio between proteins and polysaccharides. *J. Agric. Food Chem.* 48, 5484-5488.
- 157** Platt, R.M., Geesey, G.G., Davis, J.D., White, D.C. (1985): Isolation and partial chemical analysis of firmly bound exopolysaccharide from adherent cells of a freshwater sediment bacterium. *Can. J. Microbiol.* 31, 675-680.
- 158** Poxon, T.L., Darby, J.L. (1997): Extracellular polyanions in digested sludge: Measurement and relationship to sludge dewaterability. *Water Res.* 31(4), 749-758.
- 159** Priest, F.G. (1992): Enzymes, extracellular. In: Lederberg, J. (Hrsg.): *Encyclopedia of microbiology.* 81-93. Academic Press, San Diego.
- 160** Ramesh, A., Lee, D.J., Hong, S.G. (2006): Soluble microbial products (SMP) and soluble extracellular polymeric substances (EPS) from wastewater sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 73, 219-225.
- 161** Ramesh, A., Lee, D.J., Lai, J.Y. (2007): Membrane fouling by extracellular polymeric substances or soluble microbial products from membrane bioreactor sludge. *Environ. Biotechnol.* 74, 699-707.

- 162 Ras, M., Girbal-Neuhauser, E., Paul, E., Sperandio, M., Lefebure, M. (2008): Protein extraction from activated sludge: An analytical approach. *Water Res.* 42, 1867-1878.
- 163 Rautenbach, R. (1997): *Membranverfahren - Grundlagen und Modul- und Anlagenauslegung*. Springer Verlag, Berlin.
- 164 Reid, E., Liu, X., Judd, S.J. (2008): Sludge characteristics and membrane fouling in full-scale submerged membrane bioreactors. *Desalination* 219, 240-249.
- 165 Rode, A. (2004): *Isolierung und Charakterisierung von bakteriellen extrazellulären polymeren Substanzen aus Biofilmen*. Dissertation, Universität Duisburg.
- 166 Rodgers, H.J., Perkins, H.R., Ward, J.B. (1980): *Microbial cell walls and membranes*. Chapman & Hall, London.
- 167 Rosenberger, S. (2003): *Charakterisierung von belebtem Schlamm in Membranbelebungsreaktoren zur Abwasserreinigung*. Dissertation, TU Berlin.
- 168 Rosenberger, S., Evenblij, H., te Poele, S., Wintgens, T., Laabs, C. (2005): The importance of liquid phase analyses to understand fouling in membrane assisted sludge processes – six case studies of different European research groups. *J. Membr. Sci.* 263(1-2), 113-126.
- 169 Rosenberger, S., Kraume, M. (2002): Filterability of activated sludge in membrane bioreactors. *Desalination* 146, 373-379.
- 170 Rosenberger, S., Krüger, U., Witzig, R., Manz, W., Szewzyk, M., Kraume, M. (2001): Performance of a bioreactor with submerged membranes for aerobic treatment of municipal waste water. *Water Res.* 36, 413-420.
- 171 Roukas, T., Mantzouridou, F. (2001): Effect of the aeration rate on pullulans production and fermentation broth rheological properties in an airlift reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76, 371-376.
- 172 Santos, R.A., Tang, P., Harbison, G. (1989): Determination of the DNA sugar pucker using ^{13}C NMR spectroscopy. *Biochemistry* 28, 9372-9378.
- 173 Sato, T., Ose, Y. (1980): Floc forming substances extracted from activated sludge by sodium hydroxide solution. *Water Res.* 14, 333-338.
- 174 Sauer, K., Camper, A.K. (2002): *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J. Bacteriol.* 184, 1140-1154.
- 175 Schmitt, J., Flemming, H.-C. (1999): Water binding in biofilms. *Water Sci. Technol.* 39, 77-82.
- 176 SDBSweb Spectral database, 2009.
- 177 Seo, H.-P., Son, C.-W., Chung, C.-H., Jung, D.-I., Kim, S.-K., Gross, R.A., Kaplan, D.L., Lee, J.-W. (2004): Production of high molecular weight pullulan by *Aureobasidium pullulans* HP-2001 with soybean pomace as a nitrogen source. *Bioresour. Technol.* 95, 293-299.
- 178 Sheng, G.-P., Yu, H.-Q. (2006): Characterisation of extracellular polymeric substances of aerobic and anaerobic sludge using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. *Water Res.* 40, 1233-1239.

- 179** Sheng, G.-P., Yu H.-Q., Yu Z. (2005): Extraction of extracellular polymeric substances from the photosynthetic bacterium *Rhodospirillum rubrum*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 67, 125-130.
- 180** Smiths, S., Judd, S., Stephenson, T., Jefferson, B. (2003): Membrane bioreactors - hybrid activated sludge or a new process?. Membr. Technol. 12, 5-8.
- 181** Smucker, R.A., Kim, C.K. (1991): Chitinase activity in estuarine waters. In: Chróst, R.J. (Hrsg.): Microbial enzymes in aquatic environments. 249-269. Springer Verlag, New York.
- 182** Staude, E. (1992) Membranen und Membranprozesse - Grundlagen und Anwendungen. Wiley-VCH Verlag, Weinheim.
- 183** Steidle, A., Allesen-Holm, M., Riedel, K., Berg, G., Givskov, M., Molin, S., Eberl, L. (2002): Identification of an N-acylhomoserin lactone-dependent quorum-sensing system in *Pseudomonas putida* strain IsoF. Appl. Environ. Microbiol. 68, 6371-6382.
- 184** Stephenson, T., Judd, S., Jefferson, B., Brindle, K. (2000): Membrane bioreactors for wastewater treatment, IWA Publishing, London.
- 185** Steinberger, R.E., Holden, P.A. (2005): Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 71(9), 5404-5410.
- 186** Sutherland, I.W. (1994): Structure-function relationships in microbial exopolysaccharides. Biotechnol. Adv. 12, 393-448.
- 187** Tapia, J.M., Munoz, J.A., Gonzales, F., Blazquez, M.L., Malki, M., Ballester, A. (2009): Extraction of extracellular polymeric substances from the acidophilic bacterium *Acidiphilium 3.2Sup(5)*. Water Sci. Technol. 59(10), 1959-1967.
- 188** Tardieu, E., Grasmick, A., Geaugey, V., Manem, T. (1998): Hydrodynamic control of bioparticle deposition in a MBR applied to wastewater treatment. J. Membr. Sci. 147, 1-12.
- 189** Traficante, D.D. (1996): Relaxation: An Introduction. In: Grant, D.M., Harris, R.K. (Hrsg.): Encyclopedia of Nuclear Magnetic Resonance. John Wiley & Sons, Chichester.
- 190** Uhlinger, D.J., White, D.C. (1983): Relationship between physiological status and formation of extracellular polysaccharide glycocalyx in *Pseudomonas atlantica*. Appl. Environ. Microbiol. 45, 64-70.
- 191** Urbain, V., Block, J.C., Manem, J. (1993): Bioflocculation in activated sludge: an analytic approach. Water Res. 27, 829-838.
- 192** van Loosdrecht, M.C.M., Eikelboom, D., Gjaltema, A., Mulder, A., Tjihuis, L., Heijnen, J.J. (1995): Biofilm structures. Water Sci. Technol. 32, 35-43.
- 193** Wang, X.-M., Li, X.-Y., Huang, X. (2007): Membrane fouling in a submerged membrane bioreactor (SMBR): Characterisation of the sludge cake and its high filtration resistance. Sep. Purif. Technol. 52, 439-445.
- 194** Wang, Z., Wu, Z., Tang, S. (2009): Characterisation of dissolved organic matter in a submerged membrane bioreactor by using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy. Water Res. 43, 1533-1540.
- 195** Wimpenny, J., Manz, W., Szewzyk, U. (2000): Heterogeneity in biofilms. FEMS Microbiol. Rev. 24, 661-671.

- 196** Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (1999): Microbial extracellular polymeric substances. Springer Verlag, Berlin.
- 197** Wingender, J., Jäger, K.-E. (2002): Extracellular enzymes in biofilms. In: Bitton, G. (Hrsg.): Encyclopedia of environmental microbiology. 3. Auflage. 1207-1223. John Wiley & Sons, Inc., New York.
- 198** Wu, J., Le-Clech, P., Stuetz, R., Fane, A.G., Chen, V. (2008a): Novel filtration mode for fouling limitation in membrane bioreactors. *Water Res.* 42(14), 3677-3684.
- 199** Wu, J., Le-Clech, P., Stuetz, R., Fane, A.G., Chen, V. (2008b): Effects of relaxation and backwashing conditions on fouling in membrane bioreactors. *J. Membr. Sci.* 324, 26-32.
- 200** Wuertz, S., Bishop, P.L., Wilderer, P.A. (2003): Biofilms in wastewater treatment. An interdisciplinary approach. Part two: Architecture, population structure and function. 121-295. IWA Publishing, Cornwall.
- 201** Yamato, N., Kimura, K., Miyoshi, T., Watanabe, Y. (2006): Differences in membrane fouling in membrane bioreactors (MBRs) caused by membrane polymer materials. *J. Membr. Sci.*, 280, 911-919.
- 202** Yoon, S.-H., Kim, S.-S., Yeo, I.-T. (2004): The operational condition of membrane bioreactor (MBR): Cost estimation of aeration and sludge treatment. *Water Res.* 38, 37-46.
- 203** Zelles, L. (1999): Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: A review. *Biol. Fert. Soils* 29, 111-129.
- 204** Zhang, X., Bishop, P.L., Kinkle, B.K. (1999): Comparison of extraction methods for quantifying extracellular polymers in biofilms. *Water Sci. Technol.* 39(7), 211-218.
- 205** Zhang, G., Ji, S., Gao, X., Liu, Z. (2008): Adsorptive fouling of extracellular polymeric substances with polymeric ultrafiltration membranes. *J. Membr. Sci.* 309, 28-35.
- 206** Zhou, J., Bruns, M.A., Tiejie, J.M. (1996): DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (3), 316-322.
- 207** Zhou, L.X., Liang, J.R., Zhan, X.H., Wong, J.W.C. (2001): Fractionation and characterisation of sludge extracellular polymers by FT-IR, ¹³C-NMR, ¹H-NMR. *Water Sci. Technol.* 44(10), 71-78.

Verzeichnis der Abbildungen

Abbildung 1: Schematischer Aufbau der Architektur eines überströmten Biofilms auf einer inerten Oberfläche.....	7
Abbildung 2: Die verschiedenen Stufen der Biofilmentwicklung.....	8
Abbildung 3: Differenzierung zwischen eEPS und SMP.	14
Abbildung 4: Strukturmodell des Polysaccharides Pullulan.....	17
Abbildung 5: Strukturmodell des Polysaccharides Dextran.	18
Abbildung 6: Strukturmodell eines MG Blocks des Polysaccharides Alginat.	18
Abbildung 7: Aufspaltung der Energieniveaus in Abhängigkeit des äusseren Magnetfeldes B_0	24
Abbildung 8: Entwicklungsstufen des Magnetisierungsvektors M_z für verschiedene Wartezeiten τ bei einem „inversion recovery“-Experiment.....	27
Abbildung 9: Einordnung der Membranverfahren.	32
Abbildung 10: Getauchtes Hohlfasermodule der Firma Zenon (A) und Membranmodule UNSW (B, C, D).....	33
Abbildung 11: Einfluss der Reinigung auf das Netto-Permeatvolumen.	34
Abbildung 12: Schematische Darstellung des Dead-End-Betriebs.....	36
Abbildung 13: Schematische Darstellung des Cross-Flow-Betriebs.	37
Abbildung 14: Unterschiedliche Foulingmechanismen.....	40
Abbildung 15: Vergleich konventioneller (A) und MBR-Verfahren ((B) MBR Querstromverfahren, (C) MBR Submersverfahren) zur Wasseraufbereitung.....	45
Abbildung 16: Fraktionierungsverfahren der SMP-Probe aus dem MBR WM.....	53
Abbildung 17: Schematische Darstellung des MBR UNSW ((a) Belüftungsbecken, (b) Membrantank).....	54
Abbildung 18: Schematische Darstellung des MBR Waldmössingen.	58
Abbildung 19: TMP-Verlauf der verschiedenen Betriebsweisen nach 20 h Filtrationszeit.	60
Abbildung 20: Fraktionierung der Membranfoulingsschicht in eine obere, mittlere und untere Schicht.	61
Abbildung 21: Standardpulsprogramm der ^{13}C CPMAS NMR-Messungen.....	66
Abbildung 22: Pulsprogramm des „inversion recovery“-Experiments zur T_1 -Zeit-Bestimmung.....	71
Abbildung 23: Bestimmung der Protonenrelaxationszeit T_{1H}	73
Abbildung 24: Integrale verschiedener chemischer Verschiebungsbereiche bei variierenden Kontaktzeiten (0- 5000 μs).	75
Abbildung 25: Relative Standardabweichung der Integrale in Abhängigkeit des S/N-Verhältnisses.....	78

Abbildung 26: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum von Pullulan (oben) und vier an das Spektrum angepasste Gauß-Kurven (unten).	79
Abbildung 27: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Polysaccharide Pullulan, Dextran und Alginat.....	80
Abbildung 28: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum von BSA und Strukturmodell einer Peptidbindung.	84
Abbildung 29: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum eines Kohlenhydrat/Protein-Gemischs (75 % BSA, 25 % Dextran, bezogen auf C-Anteil).	88
Abbildung 30: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum eines Kohlenhydrat/Protein-Gemischs (45 % BSA, 55 % Dextran, bezogen auf C-Anteil).	89
Abbildung 31: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum von DNA und Strukturmodell von DNA. .	90
Abbildung 32: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren von Biofilm <i>A. pullulans</i> gezüchtet in Erlenmeyer-kolben (EK) und im Festbettreaktor (FB), Biofilm <i>P. putida</i> sowie das Spektrum von Pullulan.	95
Abbildung 33: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Biofilm- und der verschiedenen EPS-Proben von <i>P. putida</i>	103
Abbildung 34: ^{13}C CPMAS NMR Differenzspektren. Das Biofilm-Spektrum von <i>P. putida</i> wurde von dem jeweiligem EPS-Spektrum abgezogen.	103
Abbildung 35: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Biofilm- und der verschiedenen EPS-Proben von <i>A. pullulans</i>	106
Abbildung 36: ^{13}C CPMAS NMR-Differenzspektren. Das Biofilm Spektrum von <i>A. pullulans</i> wurde von dem jeweiligen EPS-Spektrum abgezogen.	106
Abbildung 37: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der EPS EDTA-Proben von <i>P. putida</i> und <i>A. pullulans</i> (skaliert auf die gleiche Fläche) und Strukturmodell von EDTA.	108
Abbildung 38: SEC-Chromatogramme der eEPS WM Hitze-Probe vor und nach Dialyse: (a) DOC- (b) UV ₂₅₄ -Signal.	118
Abbildung 39: SEC-Chromatogramme der dialysierten Probe (a) eEPS WM Hitze und (b) eEPS WM F-NaOH mit DOC- und UV ₂₅₄ -Detektion.	120
Abbildung 40: SEC-Chromatogramme der dialysierten eEPS-Proben mit DOC- und UV ₂₅₄ -Detektion (a) eEPS UNSW Hitze (b) eEPS UNSW F-NaOH.	122
Abbildung 41: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der eEPS WM F-NaOH, eEPS WM Hitze und der Biomasse aus dem MBR WM.	126
Abbildung 42: Differenzspektren der eEPS-Proben MBR WM.....	126
Abbildung 43: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der eEPS UNSW F-NaOH, eEPS UNSW Hitze und der Biomasse aus dem MBR UNSW.....	129
Abbildung 44: Differenzspektren der eEPS UNSW-Proben.	129
Abbildung 45: SEC-Chromatogramme der mst-UF-Fractionen mit OC- und ON-Detektor (SEC-Fraktion A: hochmolekular, B: mittelmolekular, C: niedermolekular).	135
Abbildung 46: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Probe SMP K und der SMP-Fractionen F1 - F3.	139

Abbildung 47: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der eEPS-Proben und SMP-Probe aus WM (0,45 μm -1 kDa).....	142
Abbildung 48: SEC-Chromatogramme der 1 kDa filtrierten Probe eEPS WM Hitze (a) und der eEPS WM F-NaOH mit DOC- und UV ₂₅₄ -Detektion.	144
Abbildung 49: Entwicklung des transmembranen Druckes (TMP) bei verschiedenen Betriebsweisen (gleicher Netto-Permeatfluss) innerhalb von 24 h.	146
Abbildung 50: Foulingraten bei verschiedenen Betriebsweisen zu verschiedenen Zeiten des Foulingexperiments (logarithmische Darstellung).....	147
Abbildung 51: Gesamt-Biopolymer-Masse der verschiedenen Foulingschichten (Kuchenfouling, Porenfouling reversibel, Fouling irreversibel) in Abhängigkeit von der Betriebsweise.	150
Abbildung 52: Gelöste Biopolymer-Masse der verschiedenen Schichten (Kuchenfouling, Porenfouling reversibel, Fouling irreversibel) in Abhängigkeit von der Betriebsweise.	151
Abbildung 53: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Biomasse MBR UNSW sowie der Deckschichten verschiedener Betriebsweisen (Relaxation und Kontinuierlich).....	154
Abbildung 54: Differenzspektren von Deckschichten verschiedener Betriebsweisen (Kontinuierlich und Relaxation) im Bezug auf die Biomasse aus MBR UNSW.....	154
Abbildung 55: Hydraulischer Widerstand der verschiedenen Schichten (R_{Gesamt} , R_{K} , R_{RP} , R_{IF}) in Abhängigkeit von der Betriebsweise.....	156
Abbildung 56: Spezifischer Widerstand der einzelnen Foulingschichten in Abhängigkeit von der Betriebsweise.	159
Abbildung 57: Mögliche Foulingmechanismen für den kontinuierlichen Modus und den Rückspül-Modus.	160
Abbildung 58: TMP in Abhängigkeit der Masse der gelösten Biopolymere pro m^2 Membranfläche in mg der irreversiblen Foulingschicht.....	163
Abbildung 59: Vereinfachte schematische Darstellung des Vorgehens und der Ergebnisse der vorliegenden Dissertation.	173
Abbildung 60: Bestimmung der Protonenrelaxationszeit $T_{1\text{H}}$. Probe: A) Biofilm <i>A. pullulans</i> + Cu^{2+} , B) Pullulan.....	205
Abbildung 61: Signal/Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit von der Anzahl der Aufnahmen..	206
Abbildung 62: ^{13}C CPMAS NMR-Spektren der Probe Biofilm <i>A. pullulans</i> FB bei unterschiedlichen Kontaktzeiten.	206
Abbildung 63: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum des Polysaccharides Chitin.....	207

Verzeichnis der Tabellen

Tabelle 1: Vorteile der Lebensform Biofilm für Mikroorganismen.	6
Tabelle 2: Zusammensetzung von EPS und Konzentrationsbereiche der Komponenten.	12
Tabelle 3: Übersicht über die Funktionalität von EPS innerhalb von Biofilmen.	13
Tabelle 4: Prozessparameter für MBR mit getauchten und externen Membranmodulen.	45
Tabelle 5: Operationelle Konditionen im MBR UNSW während der Extraktions- und Foulingexperimente.	56
Tabelle 6: Charakteristische Kenndaten der Membranen im MBR UNSW.	57
Tabelle 7: Membrantechnische Kennwerte der ZeeWeed-Membranen und Abmessungen des MBR WM.	57
Tabelle 8: Abwasser- und Biomasse-Kenndaten des MBR WM.	59
Tabelle 9: Brutto-Permeatflüsse und Filtrationszeiten der Betriebsweisen.	60
Tabelle 10: Experimentelle Angaben zu den analytischen SEC-Systemen.	65
Tabelle 11: Ausgewählte NMR-Aufnahmeparameter bei ^{13}C CPMAS NMR-Messungen.	67
Tabelle 12: Chemische Verschiebungsbereiche und deren Zuordnung zu Strukturelementen in ^{13}C NMR-Spektren von EPS (TMS-Skala).	69
Tabelle 13: Chemische Verschiebungsbereiche und Zuordnung zu chemischen Strukturen.	70
Tabelle 14: T_{1H} -Zeiten verschiedener chemischer Verschiebungsbereiche für die Proben Biofilm <i>A. pullulans</i> , Biofilm <i>A. pullulans</i> + Cu^{2+} und Pullulan.	74
Tabelle 15: Vergleich der Integrale des ^{13}C CPMAS NMR- und des ^{13}C DPMAS NMR-Spektrums der Probe Biofilm <i>A. pullulans</i>	76
Tabelle 16: Integrale und Regressionskoeffizient der an das ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum von Pullulan angepassten Gaußkurven und basierend auf der Strukturformel berechnete Integralwerte der Signale.	80
Tabelle 17: Vergleich der mittels ^{13}C CPMAS NMR-Spektren und auf Basis von Strukturmodellen berechneten Intensitäten in %.	81
Tabelle 18: Chemische Verschiebungsbereiche der Kohlenstoffatome der 20 häufigsten Aminosäuren.	83
Tabelle 19: Vergleich der mittels ^{13}C CPMAS NMR-Spektroskopie erhaltenen und berechneter Intensitäten anhand der Aminosäureverteilung von BSA.	85
Tabelle 20: Berechnete chemische Verschiebungsintensitäten anhand der Aminosäureverteilung verschiedener Proteine.	85
Tabelle 21: Integrale der chemischen Verschiebungsbereiche verschiedener BSA/Dextran-Mischungen.	87
Tabelle 22: Chemische Verschiebungsbereiche der DNA-Komponenten.	91

Tabelle 23: Theoretische Vorgaben zur quantitativen Interpretation der NMR-Daten von Biofilmen und EPS.	92
Tabelle 24: Trockenmasse(TM), Aschegehalt und elementare Zusammensetzung von Modell-Biofilmen.	93
Tabelle 25: EPS-Ausbeuten (n=3) für <i>P. putida</i> und <i>A. pullulans</i> Biofilme für verschiedene Extraktionsmethoden in Massenprozent der Biofilm-Trockenmasse und Nachweis des Cytoplasma-Enzyms G6PDH.	98
Tabelle 26: Elementaranalytische Daten der Biofilm- und EPS-Proben von <i>P. putida</i> und <i>A. pullulans</i>	100
Tabelle 27: Integrationsdaten der Spektren von <i>P. putida</i> und <i>A. pullulans</i> Biofilm- und EPS-Proben.	101
Tabelle 28: Berechnete Protein-, Kohlenhydrat und n-Alkan-Anteile von <i>P. putida</i> und <i>A. pullulans</i> Biofilm und EPS.	102
Tabelle 29: Berechnungsschema zur Quantifizierung von EDTA aus ¹³ C CPMAS NMR-Spektren der EPS EDTA-Proben.....	108
Tabelle 30: Protein (P)- und Kohlenhydrat (KH)-Gehalt der biochemischen und NMR-spektroskopischen Untersuchungen sowie P/KH-Verhältnisse und auf Grundlage des N-Gehalts abgeschätzte maximale Protein-Gehalte.....	110
Tabelle 31: Ausbeute der EPS-Extraktion aus MBR WM und MBR UNSW in Massenprozent der organischen Biofilm-Trockenmasse (TM).	116
Tabelle 32: Einfluss der Dialyse auf die eEPS-Ausbeute in mg/L gelöster organischer Kohlenstoff (DOC).	116
Tabelle 33: Einfluss der Dialyse auf Protein (P)- und Kohlenhydrat (KH)-Konzentrationen in eEPS-Proben (In Klammern sind die P/KH-Verhältnisse angegeben).	119
Tabelle 34: Intensitätsverhältnisse der UV/DOC-Signale der verschiedenen Elutionsbereiche und DOC-Wiederfindung bei gelchromatographischer Analyse.	123
Tabelle 35: Integralwerte der chemischen Verschiebungsbereiche der Proben aus MBR WM und MBR UNSW.	124
Tabelle 36: Elementaranalytische Daten der Biomasse und eEPS-Proben aus den MBR WM und MBR UNSW.	124
Tabelle 37: Protein(P)- und Kohlenhydrat(KH)-Konzentration und -Verhältnis der Biomasse und eEPS WM basierend auf biochemischen und ¹³ C CPMAS NMR-spektroskopischen Ergebnissen.....	127
Tabelle 38: Protein(P)- und Kohlenhydrat(KH)-Konzentration und -Verhältnis der Biomasse und eEPS UNSW basierend auf biochemischen und ¹³ C CPMAS NMR spektroskopischen Ergebnissen.....	130
Tabelle 39: Basisparameter und DOC-Bilanz der mst-UF-Fraktionierung der Probe SMP WM.....	133

Tabelle 40: N/C-Verhältnisse der mst-UF-Fractionen anhand von Elementaranalyse, Bypass- und säulenchromatographischen Messungen sowie DOC-Wiederfindungsraten der säulen-chromatographischen Trennung in %.....	136
Tabelle 41: Relativer Massenanteil an DOC in % und N/C-Verhältnisse der drei Größenbereiche (A, B, C) der Probe SMP WM K und der drei SMP-Fractionen bestimmt mittels organischem Kohlenstoff und Stickstoff Detektor.	137
Tabelle 42: Integrationsdaten der chemischen Verschiebungsbereiche der ¹³ C CPMAS NMR-Spektren der Probe SMP K und der SMP-Fractionen F ₁ - F ₃	138
Tabelle 43: Ausbeuten der SMP K und der eEPS WM F-NaOH- (>1 kDa) und eEPS WM Hitze-(> 1kDa) Proben bezogen auf die organische Biofilm-Trockenmasse (TM).	141
Tabelle 44: Integrationsdaten der chemischen Verschiebungsbereiche der ¹³ C CPMAS NMR-Spektren der Proben SMP K, eEPS WM F-NaOH und eEPS WM Hitze (0,45 µm - 1 kDa).....	142
Tabelle 45: Relativer C-Anteil in % der Kohlenhydrat- und Protein-Strukturen der Proben SMP K, eEPS WM F-NaOH und eEPS WM Hitze (0,45 µm - 1 kDa).....	142
Tabelle 46: Hydraulische Leistung bei verschiedenen Betriebsweisen nach 24 h.	146
Tabelle 47: Protein/Kohlenhydrat-Verhältnis der Gesamt-Biopolymere und der gelösten Biopolymere in den verschiedenen Foulingschichten und Anteil der gelösten Fraktion an der Gesamt-Fraktion in %.	152
Tabelle 48: Zusammensetzung Isolierungspuffer (pH = 7).....	203
Tabelle 49: Zusammensetzung der synthetischen Abwasserlösung für MBR UNSW. .	203
Tabelle 50: Parameter des Aminoquant-Systems zur Aminosäure-Analyse.	204
Tabelle 51: Aminosäureverteilung in % verschiedener EPS-Proteine und des Standardproteins BSA.	208
Tabelle 52: Aminosäureverteilung in % verschiedener tierischer und mikrobieller Proteine.....	209
Tabelle 53: Signal/Rausch-Verhältnisse sämtlicher Biofilm- und EPS-Proben.....	210
Tabelle 54: Kohlenhydrat-C-Anteil der verschiedenen EPS und Biofilmproben berechnet über die Summe des O-Alkyl-Bereich und anhand der anomeren C-Atome aus den ¹³ C CPMAS NMR-Spektren.....	211

Abkürzungen und Symbolverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

Probenabkürzungen

A	<i>Aureobasidium pullulans</i>
BF	Biofilm
CER	„cation exchange resin“, Kationenaustauscher
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEPS	extrahierbare extrazelluläre polymere Substanzen
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
F	Fraktion
F-NaOH	Formaldehyd-Natriumhydroxid
K	Konzentrat
P	<i>Pseudomonas putida</i>
SMP	„soluble microbial products“, gelöste mikrobielle Substanzen
UNSW	University of New South Wales
WM	Waldmössigen
UZ	Ultrazentrifugation

Abkürzungen

<i>A. pullulans</i>	<i>Aureobasidium pullulans</i>
AS	Aminosäure
a.u.	„arbitrary units“, willkürliche Einheiten
BSA	„bovine serum albumin“, Rinderserumalbumin
CP	cross polarization“, Kreuzpolarisation
CPMAS	„cross polarization/ magic angle spinning“, Kreuzpolarisation/ Rotation um den magischen Winkel
CT	„contact time“, Kontaktzeit
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DOC	„dissolved organic carbon“, gelöster organischer Kohlenstoff
DON	„dissolved organic nitrogen“, gelöster organischer Stickstoff
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEPS	extrahierbare extrazelluläre polymere Substanzen
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
FID	„free induction decay“, freier Induktionsabfall

F-NaOH	Formaldehyd-Natriumhydroxid
FTIR-Spektroskopie	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
HOC	hydrophobic organic carbon“, hydrophober organischer Kohlenstoff
HPLC	„high performance liquid chromatography“, Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
HRT	„hydraulic retention time“, hydraulische Verweilzeit
LC-UV/OCD	„liquid chromatography-ultraviolet absorbance/organic carbon detector“, Größenausschlusschromatographie mit UV-und OC-Detekt
MBR	Membranbioreaktor
MAS	„magic angle spinning“, Rotation um den magischen Winkel
MF	Mikrofiltration
mst-UF	mehrstufige Ultrafiltration
MWCO	„molecular weight cut-off“, Trenngrenze
NF	Nanofiltration
NMR	„nuclear magnetic resonance“, kernmagnetische Resonanz
PES	Polyethersulfon
PIA	<i>Pseudomonas</i> Isolierungsagar
<i>P. putida</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SEC	„size exclusion chromatography“, Größenausschlusschromatographie
SMP	„soluble microbial products“, gelöste mikrobielle Substanzen
SRT	„solid retention time“, Feststoffverweilzeit
SUVA	„specific ultraviolet absorption“, spezifische UV-Absorption
TM	Trockenmasse
TMP	„transmembrane pressure“, transmembraner Druck
TMS	Tetramethylsilan
UF	Ultrafiltration
UNSW	University of New South Wales
UO	Umkekrosmose
WM	Waldmössingen

Symbole

Symbol	Bedeutung
α	spektraler dekadischer Absorptionskoeffizient
$\alpha_{\text{Biopolymer}}$	spezifischer Widerstand der Biopolymere
A_M	Membranfläche
B	magnetische Induktion
B_0	Stärke des äußeren Magnetfeldes
B_{eff}	effektives Magnetfeld
c	Stoffmengenkonzentration
D_p	Biopolymer-Konzentration
D_s	Diffusionskoeffizient
ds	Teilchendurchmesser
d_h	Kapillardurchmesser
E_0	Energieniveau
E_{α}, E_{β}	Energieniveaus (Kern- Zeeman-Niveaus)
E_{NZ}	Energiedifferenz zum entarteten Energieniveau
ε	molarer Absorptionskoeffizient
γ	gyromagnetische Verhältnis
h	Membrandicke
\hbar	Planckschen Wirkungsquantum
I	Kernspin
J	Spezifischer Permeatfluss/Filtratfluss
J_{CF}	kritischer Permeatfluss
J_{kap}	Volumenstrom durch eine Kapillare
k_B	Boltzmann-Konstante
L_p	Hydraulische Permeabilität
λ	Wellenlänge
M_0	makroskopische Kernmagnetisierung
M_z, M_y	Quermagnetisierung
m_l	magnetische Quantenzahl
$\bar{\mu}$	kernmagnetisches Moment/magnetisches Dipolmoment
N_{α}	Anzahl der Kernspins
η	dynamische Viskosität
P	Druck
p_F	Feedseitiger Druck
p_K	Konzentratseitiger Druck
p_P	Permeatseitiger Druck
Q_F	Volumenstrom des Feed

Q_K	Volumenstrom Konzentratseite
Q_P	Volumenstrom Permeatseite
R	hydraulischer Widerstand
R_{KF}	Widerstand der Kuchenfoulingschicht
R_{IF}	Widerstand der irreversiblen Foulingschicht
R_{irr}	Widerstand des irreversiblen Fouling
R_m	Widerstand der sauberen Membran
R_{rev}	Widerstand des reversiblen Fouling
R_{RP}	Widerstand der reversiblen Porenfoulingschicht
R_{TF}	Widerstand der gesamten Foulingschicht
ρ	Massenkonzentration
$\Delta\sigma$	Abschirmungskonstanten
t	Zeit
T_1	longitudinale Relaxationszeit (Spin-Gitter Relaxation)
T_2	transversale Relaxationszeit (Spin-Spin-Relaxation)
t_0	Faktor zur Berücksichtigung der Tortuosität der Poren
τ	Impulsabstand
τ_F	Umwegfaktor (engl.: tortuosity, Windung)
Θ	magischer Winkel
ν	Resonanzfrequenz
ν_0	Präzessionsfrequenzen
ω_0	Kreisfrequenz
ω_L	Larmor-Frequenz

Anhang

Anhang A: Anhang zu Kapitel 3

Durchführung biochemischer Analyse-Methoden

Kohlenhydrat-Bestimmung [Dubois et al. 1956]

Chemikalien:

- konzentrierte Schwefelsäure
- Phenol-Lösung 5 % (w/v) in MilliQ-Wasser
- Standardlösung
 - 100 µg/mL Pullulan + 100 µg/mL Glucose

Durchführung:

5 mg der gefriergetrockneten EPS werden in 10 mL MilliQ-Wasser gelöst. Zu 0,25 mL Probe bzw. Standard- oder Blindprobe (MilliQ-Wasser) werden 0,25 mL Phenol-Lösung in ein Reaktionsgefäß gegeben und das Gefäß auf einem Reagenzglasschüttler geschüttelt. Anschließend werden 1,25 mL konzentrierte Schwefelsäure zugegeben und das Gefäß erneut geschüttelt. Es ist darauf zu achten, dass Phenol und Schwefelsäure möglichst zeitnah zugegeben werden. Nach 10 min Abkühlung bei Raumtemperatur wird das Reaktionsgefäß für 15 min im Wasserbad bei 30°C temperiert. Bevor die Proben im Photometer bei 485 nm im Photometer gemessen werden, werden sie für 5 min auf Raumtemperatur abgekühlt. Alle Bestimmungen werden in Doppelbestimmung durchgeführt.

Zur Konzentrationsbestimmung von flüssigen EPS- und SMP-Proben aus den MBR werden die Proben auf den messbaren Konzentrationsbereich verdünnt und ohne vorheriges Gefriertrocknen gemessen.

Protein-Bestimmung [Lowry et al. 1951, modifiziert nach Frølund et al. 1996]

Chemikalien:

Lösung 1:

- 0,143 M NaOH
- 0,270 M Na₂CO₃
- MilliQ-Wasser

Lösung 2:

- 0,057 M Kupfersulfat
- Milli-Q-Wasser

Lösung 3:

- 0,124 M Natriumtartrat-Dihydrat
- Milli-Q-Wasser

Lowry-Reagenz:

Mischung aus Lösung 1, Lösung 2 und Lösung 3 im Volumenverhältnis 100:1:1

Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz-Lösung:

- 2,5 mL Folin-Ciocalteu-Phenolreagenz
- 3 mL MilliQ-Wasser

Standardlösung:

- 100 µg/mL Rinderserumalbumin (BSA)

Durchführung:

5 mg der trockenen EPS-Konzentrate werden in 10 mL MilliQ-Wasser gelöst. Zu 0,5 mL Probe bzw. Standard- oder Blindprobe (MilliQ-Wasser) werden 0,7 mL Lowry-Reagenz in ein Reaktionsgefäß gegeben und auf einem Reagenzglasschüttler gemischt. Nach 10 min bei Raumtemperatur werden 0,1 mL der Folin-Ciocalteus-Phenol-Reagenz-Lösung hinzugegeben und die Proben erneut gemischt. Nach einer Inkubation von 45 min bei Raumtemperatur erfolgte die Messung der Absorption bei 750 nm. Alle Bestimmungen werden in Doppelbestimmung durchgeführt.

*Untersuchungen zum Zellaufschluss [Ng & Dawes 1973]***Chemikalien:****Substratlösung:**

- 0,5 mL Tris/HCl-Puffer (pH 8,6)
- 0,375 mL 20 mM Glucose-6-phosphat-Lösung (frisch hergestellt)
- 0,25 mL 10 mM β-NADP-Lösung
- 0,09 mL 250 mM MgCl₂-Lösung
- 0,235 mL MilliQ-Wasser

Standard-Lösungen:

- 0,05 µg Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
- 0,5 µg Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase
- jeweils 10 µL MilliQ-Wasser

Durchführung:

Die Lösungen werden auf 37°C temperiert. Anschließend werden 50 µL der Probelösung oder Standardlösung zu 1,45 mL Substratlösung gegeben und gemischt. Sofort nach dem Mischen wird der Nullwert der Probe im Photometer bei 340 nm gemessen.

Über einen Zeitraum von bis zu 2 h wird in einem Abstand von 5 min die Zunahme der Absorption gemessen. Zum Vergleich werden zwei Positivkontrollen mit unterschiedlichen Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase-Konzentrationen aus *Leuconostoc mesenteroides* gemessen.

Durchführung gravimetrischer Analyse-MethodenTrockenmassebestimmung [DIN EN 12880]**Durchführung:**

Ein 20 mL-Becherglas wird im Trockenschrank für mindestens 30 min bei 95°C getrocknet und nach Abkühlung im Exsikkator gewogen (m_a). In das getrocknete Becherglas wird homogenisierte Biofilmprobe überführt und das Becherglas erneut gewogen (m_b). Dabei muss eine ausreichende Menge der Biofilmprobe eingefügt werden, so dass die erhaltene Trockenmasse mindestens 0,5 g beträgt. Das Becherglas wird mit der Probe über Nacht im Trockenschrank bei 95°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und nach erneutem Abkühlen im Exsikkator gewogen (m_c).

Berechnung der Trockenmasse und des Wassergehaltes:

$$\text{Trockenmasse (}m_{dr}\text{):} \quad m_{dr} = m_c - m_a \text{ [g]}$$

$$\text{Trockenrückstand (}w_{dr}\text{):} \quad w_{dr} = \frac{m_c - m_a}{m_b - m_a} \times 100 \text{ [%]}$$

$$\text{Wassergehalt (}w_w\text{):} \quad w_w = \frac{m_b - m_c}{m_b - m_a} \times 100 \text{ [%]}$$

mit:

m_a : Masse des leeren Becherglases [g]

m_b : Masse des Becherglases mit der Biofilmprobe [g]

m_c : Masse des Becherglases mit der Trockenmasse des Biofilms [g]

Glührückstand [DIN EN 12879]

Der Massenanteil des Rückstands nach dem Glühen der Trockenmasse eines Schlamms unter festgelegten Bedingungen wird als Glührückstand bezeichnet. Er wird aus die Trockenmasse bezogen und in Prozent angegeben [DIN EN 12879].

Die Bestimmung des Glühverlustes erfolgt im Anschluss an die Bestimmung des Trockenrückstands und Wassergehalts. Zwei Glühtiegel werden im Muffelofen zwei Stunden ausgeglüht und anschließend im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt und gewogen (m_1). In etwa 5 g der getrockneten Probe wird eingewogen (m_2) und im Muffelofen auf 550 °C erhitzt und mindestens 60 min geglüht. Der heiße Tiegel wird zum Abkühlen in den Exsikkator gesetzt. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur im Exsikkator wird der Tiegel zum ersten Mal ausgewogen (m_3). Die Masse des Glührückstandes und folglich der Glühverlust waren als konstant anzusehen, wenn die Masse nach einer weiteren halbstündigen Glühdauer bei 550 °C, um nicht mehr als 0,5 % vom vorhergehenden Wert abweicht. Andernfalls wird das Glühen, bis Massenkonstanz erreicht ist, wiederholt. Der Glührückstand (Aschegehalt) A wird in Prozent der Trockenmasse angegeben und errechnet sich aus dem Glühverlust wie folgt:

$$\text{Glühverlust (}w_v\text{):} \quad w_v = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \times 100 \text{ [\%]}$$

$$\text{Glührückstand (}w_r\text{):} \quad w_r = 100 - w_v \text{ [\%]}$$

Zusammensetzung Isolierungspuffer Kationenaustauscher-Extraktionsmethode

Tabelle 47: Zusammensetzung Isolierungspuffer (pH = 7).

Chemikalie	Konzentration in mM
Na ₃ PO ₄	2
Na ₂ HPO ₄	4
NaCl	9
KCl	1

Zusammensetzung synthetisches Abwassers MBR UNSW

Tabelle 48: Zusammensetzung der synthetischen Abwasserlösung für MBR UNSW.

Chemikalie	Konzentration in g/L
Glucose	31,6
Natriumacetat	12,7
Pepton	7,0
Fleischextrakt	31,6
Mg SO ₄	2,5
K ₂ HPO ₄	1,3
Fe ₂ (SO ₄) ₃	1,3

Parameter des Aminoquant-Systems zur Aminosäure-Analyse

Tabelle 49: Parameter des Aminoquant-Systems zur Aminosäure-Analyse.

Parameter	
Vorsäule Aminosäuresäule	Hypersil ODS, 20 x 2.1mm Agilent 200 x 2.1mm Agilent
Derivatisierungsreagenzien	OPA: 10mg/mL in 0.4M Boratpuffer Agilent ; FMOC: 2.5mg/mL in Acetonitril Agilent;
LC Parameter	Flow: 0.45 mL/min Solvent A: 0.0% NaOAc 100mM pH:7.2 + 80% ACN B:100.0% NaOAc 30mM pH:7.2 + 0.5% THF OvenTemp: 35°C Max Pressure: 400 bar Min Pressure: 50 bar Injection Volume: injector programm
Eluent	A) 1.64g Na-acetat (wasserfrei) 1000mL HPLC-Wasser 1mL EDTA-Lösung (1.85g/50mL) 180µL TEA (Triethylamin) mit 1N NaOH bzw. 1N Hac auf pH 7.2 einstellen 3mL THF B) 1.64g Na-acetat (wasserfrei) 1mL EDTA-Lösung 200mL HPLC-Wasser mit 1N NaOH bzw. 1N Hac auf pH 7.2 einstellen 800mL Acetonitril
Detektion	Fluoreszenz Detektor Excitation: 340nm Emission: 450nm

Anhang B: Anhang zu Kapitel 4.1.1

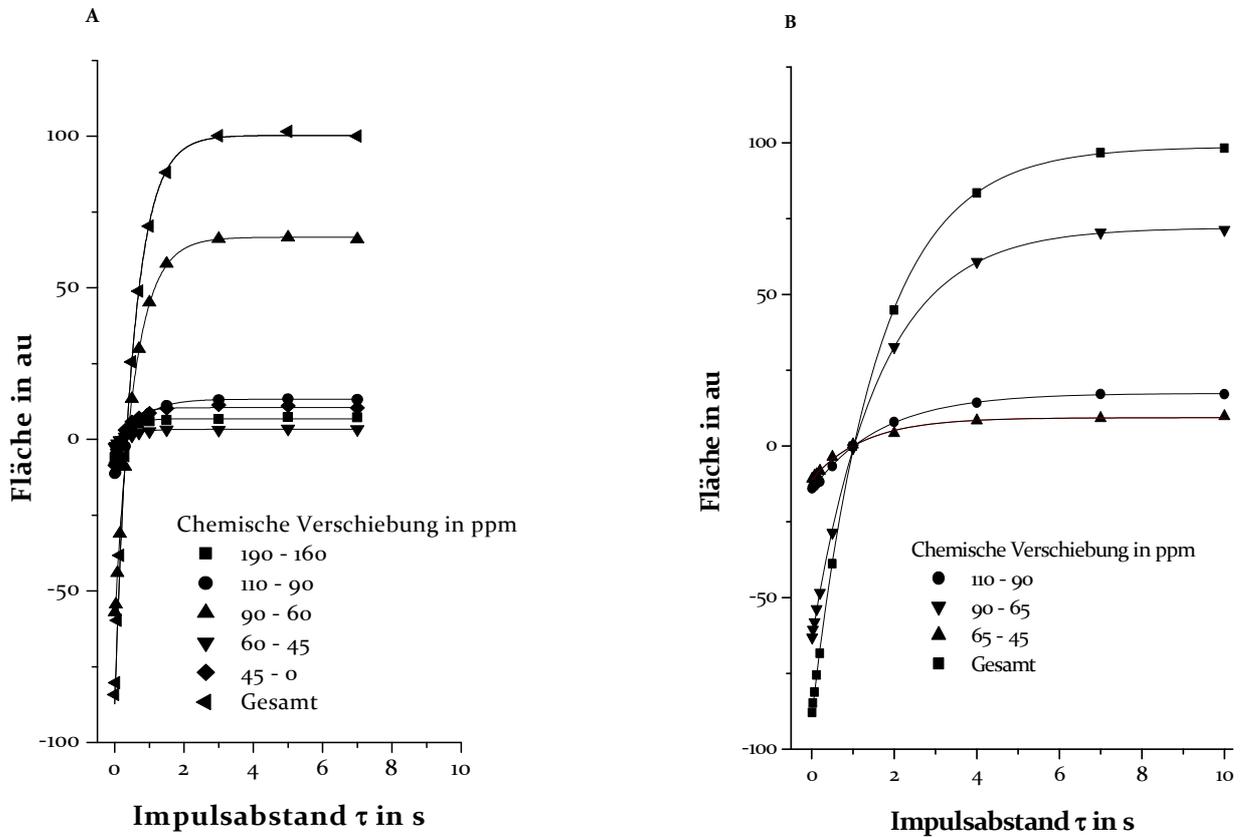
Protonenrelaxationszeit T_{1H} -Bestimmung

Abbildung 60: Bestimmung der Protonenrelaxationszeit T_{1H} . Probe: A) Biofilm *A. pullulans* + Cu^{2+} , B) Pullulan.

Signal/Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit von der Anzahl der Aufnahmen

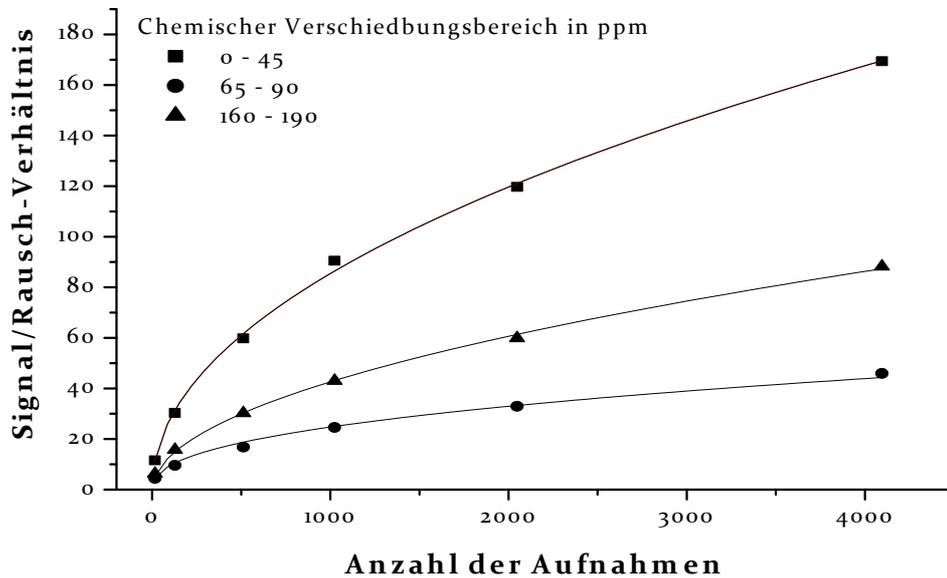


Abbildung 61: Signal/Rausch-Verhältnis in Abhängigkeit von der Anzahl der Aufnahmen (Punkte geben jeweils Mittelwerte aus 5 Messungen an).

¹³C CPMAS NMR-Spektren bei unterschiedlichen Kontaktzeiten

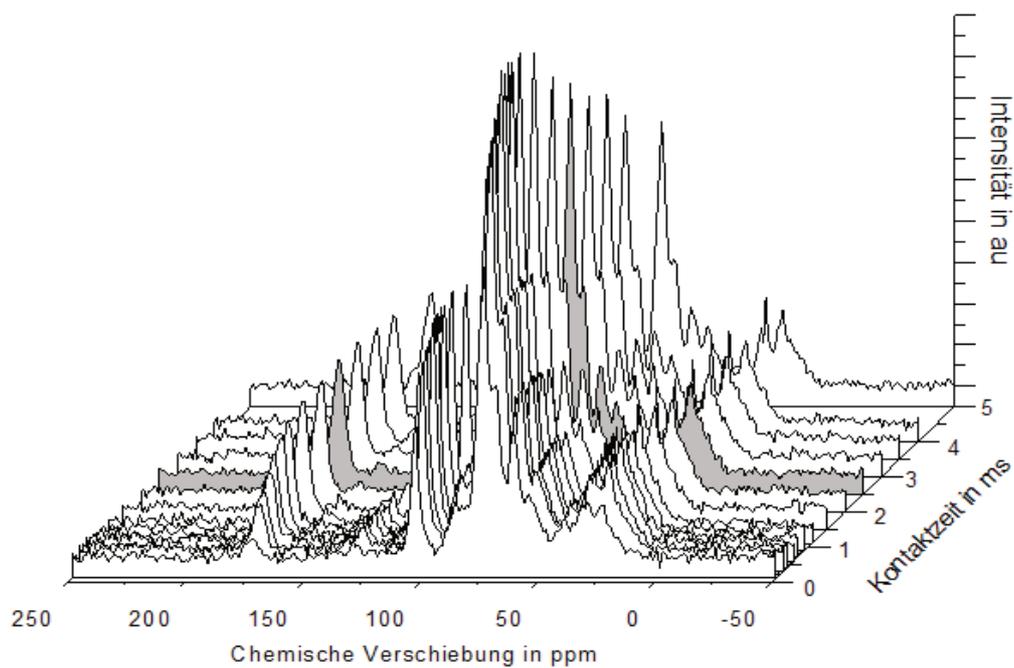


Abbildung 62: ¹³C CPMAS NMR-Spektren der Probe Biofilm *A. pullulans* FB bei unterschiedlichen Kontaktzeiten.

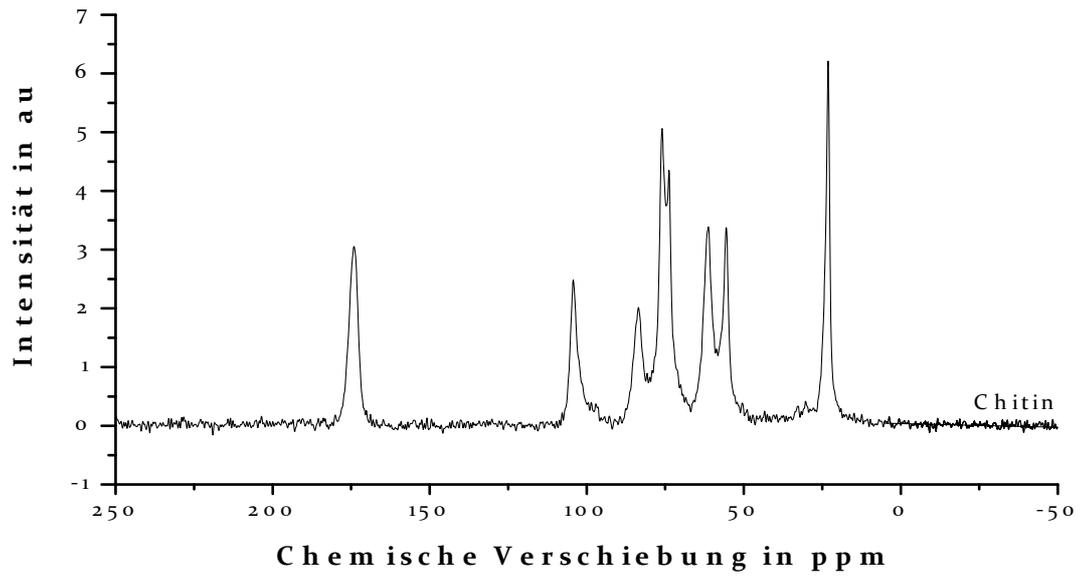
^{13}C CPMAS NMR-Spektrum Chitin

Abbildung 63: ^{13}C CPMAS NMR-Spektrum des Polysaccharides Chitin.

Anhang C: Anhang zu Kapitel 4.1.2

Aminosäureverteilungen

Tabelle 50: Aminosäureverteilung in % verschiedener EPS-Proteine und des Standardproteins BSA.

(eigene Messungen)

Probe Aminosäure	EPS WM F-NaOH	EPS UNSW FNaOH	EPS <i>P. putida</i> FNaOH	EPS <i>A. pullulans</i> FNaOH	BSA (EBI)
L-Alanin	12,08	11,95	15,94	6,84	9,43
L-Arginin	3,85	2,11	3,71	5,64	6,61
L-Asparagin	14,35	15,34	9,78	15,39	9,97
L-Asparaginsäure	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
L-Cystein	0,00	0,00	0,89	0,14	3,11
L-Glutamin	11,33	10,96	15,03	10,00	14,42
L-Glutaminsäure	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Glycin	14,57	15,55	11,41	10,54	3,00
L-Histidin	1,34	1,70	0,87	1,57	3,57
L-Isoleucin	4,00	3,86	1,06	3,39	1,78
L-Leucin	6,49	5,41	4,95	6,99	10,69
L-Lysin	1,05	0,55	8,32	0,30	10,00
L-Methionin	0,15	0,00	0,00	0,00	0,00
L-Phenylalanin	3,20	2,98	1,06	3,39	1,78
L-Prolin	2,95	4,42	4,00	4,65	7,26
L-Serin	8,18	8,23	7,24	12,02	6,46
L-Threonin	8,23	9,36	11,41	10,54	3,00
L-Tryptophan	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
L-Tyrosin	1,96	1,86	0,57	1,76	3,95
L-Valin	6,27	5,72	3,76	6,85	4,97

**Tabelle 51: Aminosäureverteilung in % verschiedener tierischer und mikrobieller Proteine.
(Literaturdaten)**

Probe Aminosäure	BSA 1	Lysozym A	Flagellin <i>P. putida</i>	EPS Biomasse
L-Alanin	7,91	11,01	16,90	8,20
L-Arginin	4,28	9,77	2,00	6,10
L-Asparagin	9,06	18,12	13,60	11,70
L-Asparaginsäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
L-Cystein	5,77	n.d.	n.d.	n.d.
L-Glutamin	13,01	4,53	11,30	12,40
L-Glutaminsäure	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Glycin	2,80	10,48	10,50	7,30
L-Histidin	2,64	0,89	1,50	2,70
L-Isoleucin	2,47	5,24	3,80	5,70
L-Leucin	10,71	7,28	8,10	7,50
L-Lysin	9,88	5,15	2,90	6,60
L-Methionin	0,82	1,69	0,71	2,00
L-Phenylalanin	4,94	3,02	2,40	3,70
L-Prolin	4,61	1,69	1,50	5,40
L-Serin	5,27	7,64	8,50	5,10
L-Threonin	5,60	5,95	7,80	6,20
L-Tryptophan	0,49	n.d.	n.d.	n.d.
L-Tyrosin	3,46	2,84	0,85	3,80
L-Valin	6,26	4,71	7,80	6,40

(BSA [Hirayama et al. 1990], Lysozym, Flagellin [Kachlany et al. 2001], Protein EPS Biomasse [Dignac et al. 1998])

Anhang D: Anhang zur Auswertung der NMR-Spektren.

Signal/Rausch-Verhältnisse

Tabelle 52: Signal/Rausch-Verhältnisse sämtlicher Biofilm- und EPS-Proben.

Probe	Signal/Rausch-Verhältnis					
	I ₁	I ₂	I ₃	I ₄	I ₅	I ₆
	200-160 ppm	160-110 ppm	110-90 ppm	90-65 ppm	65-45 ppm	45-0 ppm
Pullulan	--	--	41	164	47	--
Dextran	--	--	117	330	183	--
Alginate	65	--	52	124	--	--
BSA	91	19	6	31	49	62
DNA	19	38	15	53	30	26
Dex/BSA (50:50)	29	9	31	109	35	22
Dex/BSA (25:75)	65	16	25	87	38	47
Biofilm <i>P. putida</i>	40	7	8	37	27	41
EPS P F-NaOH	59	9	12	36	32	34
EPS P CER	63	11	11	37	34	41
EPS P UZ-	83	14	14	57	58	52
EPS P Hitze-	86	22	20	53	40	59
EPS P EDTA	125	15	9	36	81	23
<i>Biofilm A. pullulans</i>	116	29	46	106	79	93
EPS A F-NaOH	51	9	12	35	40	48
EPS A CER	69	13	14	44	48	51
EPS A UZ-	17	3	6	11	11	18
EPS A EDTA	65	10	9	25	52	16
<i>Biomasse MBR WM</i>	44	11	16	33	16	36
EPS WM F-NaOH	100	18	29	74	47	76
EPS WM Hitze	75	16	33	89	44	51
SMP K	29	8	10	28	14	26
SMP F1	28	11	9	25	16	66
SMP F2	29	9	9	27	15	32
SMP F3	84	18	25	59	42	66
EPS WM F-NaOH (> 1 kDa)	116	21	34	81	51	85
EPS WM Hitze (> 1 kDa)	46	16	30	78	44	36
<i>Biomasse MBR UNSW</i>	98	24	15	46	46	86
EPS UNSW F-NaOH	88	19	27	55	38	64
EPS UNSW Hitze	47	11	15	41	23	42
UNSW Deckschicht 1	58	13	11	31	27	52
UNSW Deckschicht 2	72	19	13	39	35	65

Kohlenhydrat-C-Anteil basierend auf O-Alkyl-Bereich und anomeren C-Atom

Tabelle 53: Kohlenhydrat-C-Anteil der verschiedenen EPS und Biofilmproben berechnet über die Summe des O-Alkyl-Bereich und anhand der anomeren C-Atome aus den ^{13}C CPMAS NMR-Spektren.

Probe	Relativer Kohlenstoffanteil in %	
	Kohlenhydrate	
	O-Alkyl C	anomeres C
Biofilm <i>P. putida</i>	21	22
EPS P F-NaOH	22	22
EPS P CER	19	17
EPS P UZ	16	13
EPS P Hitze	18	17
EPS P EDTA	10	8
Biofilm <i>A. pullulans</i>	23	31
EPS A F-NaOH	17	13
EPS A CER	16	14
EPS A UZ	21	---
EPS A EDTA	16	18
Biomasse MBR WM	21	18
EPS WM F-NaOH	24	22
EPS WM Hitze	36	35
EPS WM F-NaOH (> 1 kDa)	22	20
EPS WM Hitze (> 1 kDa)	44	45
SMP K	27	26
Biomasse MBR UNSW	17	15
EPS UNSW F-NaOH	24	29
EPS UNSW Hitze	30	33

Curriculum vitae
Ulrich-Matthias Metzger

Geboren am 27. Januar 1976 in Bad Harzburg
Staatsangehörigkeit: Deutsch
Familienstand: ledig

Beruflicher Werdegang

- | | |
|-------------------|---|
| 1995 | Abitur am Otto-Hahn-Gymnasium, Bergisch Gladbach |
| 10/1997 - 10/2003 | Studium der Lebensmitteltechnologie/-biotechnologie an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität, Bonn |
| 08/2000 - 05/2001 | Studium an der Washington State University, Pullman, WA, USA (Stipendium des Akademischen Auslandsamtes Uni Bonn) |
| 03/2002 - 07/2002 | Studium an der Griffith University, Brisbane, Australien (DAAD-Stipendium) |
| 10/2003 | Abschluss als Diplom-Ingenieur für Lebensmitteltechnologie |
| seit 03/2004 | Promotion am Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe (TH) (DFG Graduiertenkolleg 366) |
| 03/2004 - 08/2009 | Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe (TH) |
| 11/2005 - 04/2006 | Forschungsarbeiten an der University of New South Wales, Sydney, Australien (DFG-Reisestipendium) |
| seit 09/2009 | Projektingenieur (F&E) bei der Sachsenmilch AG, Leppersdorf |



Ulrich-Matthias Metzger

Dresden, 20.01.2011

Verzeichnis der Veröffentlichungen

- (1) Ulrich Metzger, Ulrich Lankes, Edme Hardy, Fritz Frimmel (2006): *Monitoring the growth of an Aureobasidium pullulans biofilm in a bead-packed reactor via Magnetic Resonance Imaging detection of the non-stationary flow*. Biotechnology Letters 28, 1305-1311.
- (2) Ulrich Metzger, Pierre LeClech, Richard Stuetz, Fritz Frimmel, Vicky Chen (2007): *Characterisation of polymeric fouling in membrane bioreactors and the effect of different filtration modes*. Journal of Membrane Science 301, 180-189.
- (3) Oxana Nosyk, Eike ter Haseborg, Ulrich Metzger, Fritz Frimmel (2008): *A standardized pre-treatment method of biofilm flocs for fluorescence microscopic characterization*. Journal of Microbiology Methods 75, 449-456.
- (4) Ulrich Metzger, Ulrich Lankes, Kai Fischpera, Fritz Frimmel (2009): *The concentration of polysaccharides and proteins in EPS of Pseudomonas putida and Aureobasidium pullulans as revealed by ¹³C CPMAS NMR spectroscopy*. Applied Microbiology and Biotechnology 85, 197-206.
- (5) Michael Abert, Ulrich Metzger, Fritz H. Frimmel, Stefan A. Huber (2011): *Online Coupling of Asymmetric Flow Field Flow Fractionation (AF4) to Organic Carbon-Organic Nitrogen Detection: A Method for the Analysis of Water soluble Biopolymers*. Zur Veröffentlichung eingereicht.

Schriftenreihe des Lehrstuhls für Wasserchemie und
der DVGW-Forschungsstelle am Engler-Bunte-Institut
des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

Band 35: Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment – ROSE, 1997, 248 S., 12,80 €.

Band 36: Symposium on Refractory Organic Substances in the Environment – ROSE II, 2000, 265 S., 12,80 €.

Band 37: Thomas Brinkmann: Alkalischer und solarinduzierter Abbau von natürlicher organischer Materie, 2003, 212 S., 15,00 €.

Band 38: Andreas Gorenflo: Rückhalt und Fouling von natürlichen organischen Substanzen bei der Nano- und Ultrafiltration, 2003, 219 S., 18,00 €.

Band 39: Philip Hörsch: Einfluss der chemischen Oxidation auf das toxische Potenzial und das biologische Abbauverhalten von Industrieabwässern, 2004, 210 S., 20,00 €.

Band 40: Margit B. Müller: Bewertung von Anreicherungs- und Fraktionierungsverfahren für die strukturelle Charakterisierung der gelösten organischen Substanz in Gewässern, 2004, 185 S., 18,00 €.

Band 41: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen, 2004, 158 S., 18,00 €.

Band 42: Tusnelda E. Doll: Photochemischer und photokatalytischer Abbau von Carbamazepin, Clofibrinsäure, Iomeprol und Iopromid, 2004, 158 S., 18,00 €.

Band 43: Ayşe B. Değer: Entfernung von organischen Schadstoffen aus Wasser mit Hilfe von Poly(ϵ -caprolacton), 2005, 205 S., 18,00 €.

Band 44: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Wassertechnologisches und wasserchemisches Praktikum, 2005, 201 S., 20,00 €.

Band 45-I, 45-II: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun (Eds.): Humic Substances – Linking Structure to Functions. Proceedings of the 13th Meeting of the International Humic Substances Society, July 30 to August 4, 2006, Universität Karlsruhe, 2006, 492 S. (45-I), 623 S. (45-II), 50,00 €.

Band 46: Fritz H. Frimmel, Gudrun Abbt-Braun: Praktikum Allgemeine Chemie und Chemie in wässrigen Lösungen – Qualitative und quantitative Bestimmungen II, 2. verbesserte und ergänzte Neuauflage 2007, 139 S., 20,00 €.

Band 47: Thomas Glauner: Aufbereitung von Schwimmbeckenwasser – Bildung und Nachweis von Desinfektionsnebenprodukten und ihre Minimierung mit Membran- und Oxidationsverfahren, 2007, 233 S., 20,00 €.

Band 48: George Metreveli: Kolloidale Wechselwirkungen und kolloidgetragener Transport von Metall(oid)en in porösen Medien, 2008, 215 S., 20,00 €.

Band 49: Florencia Saravia: Entfernung von organischen Spurenstoffen und Untersuchung von Foulingprozessen in getauchten Membranen und Hybridverfahren, 2009, 213 S., 20,00 €.

Band 50: Markus Delay: Dynamische versus statische Elutionsversuche – Ein Beitrag zur Beurteilung der Wiederverwertbarkeit von Abfallmaterialien, 2010, 206 S., 20,00 €.

Band 51: Luis A. Tercero Espinoza: Heterogeneous photocatalysis with titanium dioxide suspensions containing bromide and dissolved organic matter, 2010, 172 S., 20,00 €.

Band 52: Ulrich-M. Metzger: Extrazelluläre polymere Substanzen aus Biofilmen – Aufklärung von Strukturen und ihr Einfluss auf die Foulingbildung in Membranbioreaktoren, 2011, 211 S., 20,00 €.

Preise verstehen sich zzgl. der gesetzlichen Mehrwertsteuer und Versandkosten.

Bestellungen über:

Lehrstuhl für Wasserchemie und DVGW-Forschungsstelle
am Engler-Bunte-Institut des Karlsruher Instituts für Technologie (KIT)

Engler-Bunte-Ring 1

D-76131 Karlsruhe

Tel.: +49-(0)721-608-42580

Fax: +49-(0)721-699154

E-mail: fritz.frimmel@kit.edu