

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

Justyna Homa

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

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

Kurzfassung

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Inhaltsverzeichnis

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

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

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

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