

Biofilter – biologische, kinetische und thermodynamische Charakterisierung

Im Department Chemie und Chemietechnik
der Universität Paderborn vorgelegte

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –

von Diplom-Chemikerin

Patricia Bargel

Paderborn 2004

Tatsachen hören nicht auf zu bestehen, weil sie unbeachtet bleiben.

Aldous Huxley

für J.

Die vorliegende Arbeit war Teil des DFG-Projekts **Thermodynamische und kinetische Parameter der Biozöenose in Biofiltern**(WA 557/7-1) und wurde im *Fach für Technische Chemie* der Universität Paderborn im Zeitraum von Juli 1999 bis März 2004 unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. - Ing. H.- J. Warnecke angefertigt.

1. Gutachter: Prof. Dr. - Ing. H. - J. Warnecke

2. Gutachter: Prof. Dr. H. H. Paradies

Dissertation eingereicht: 01. März 2004

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Mai 2004

Herrn Prof. Dr. - Ing. H.-J. Warnecke danke ich für die gewährte Freizügigkeit bei der Bearbeitung der Thematik und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Herrn Prof. Dr. H. H. Paradies danke ich für die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. A. Lipski für die Übernahme der FAME-Auswertung sowie der Unterstützung bei der Identifizierung der Isolate und seiner unermüdlichen Diskussionsbereitschaft.

Dem Arbeitskreis vom Herrn Prof. Dr. R. Amann insbesondere Herrn A. Gieseke danke ich für die fachliche Beratung in Fragestellungen bezüglich der FISH-Technologie und dem Umgang mit arb.

Bei Frau Dr. C. Schmidt sowie Herrn F. Kleinschmidt möchte ich mich für die Durchführung der NMR-Messungen bedanken.

Herrn PD Dr. D. Bothe möchte ich für die Übernahme der mathematischen Modellierung danken.

Marina Lovrinović danke ich für die experimentellen Arbeiten mit den Gen-Sonden während ihrer Diplomarbeit.

Ferner gilt mein Dank allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Arbeitskreise von Herrn Prof. Dr. - Ing. Warnecke, die durch ihre große Hilfsbereitschaft sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Nicht zuletzt gilt mein herzlicher Dank meiner Familie und all denen, die mich in irgendeiner Weise bei meiner Arbeit unterstützt haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Zielsetzung	1
1.2	Stand des Wissens	2
2	Materialien und Methoden	11
2.1	Versuchsbiofilter	11
2.1.1	Detektion des Styrolabbaus	13
2.1.2	Inbetriebnahme des Biofilters	13
2.2	Mikrobiologische Untersuchungen	13
2.2.1	Bestimmung der Biomasse	14
2.2.2	Lebend-Gesamtzellzahl-Bestimmung	14
2.2.3	Isolierung der Reinkulturen	15
2.3	Chemotaxonomische Charakterisierung	15
2.3.1	Extraktion der Membranlipide	16
2.3.2	Gaschromatographie	17
2.4	Molekularbiologische Methoden	17
2.4.1	16S rDNA-PCR	17
2.4.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	18
2.4.2.1	Entwicklung von rRNA-gerichteten Oligo- nukleotidsonden	18
2.4.2.2	Zellfixierung	18
2.4.2.3	Beschichtung der Objektträger	19
2.4.2.4	Hybridisierungs- und Waschbedingungen . .	19
2.4.2.5	Hybridisierungsprozedur	20
2.4.2.6	Verwendete Oligonukleotide	22
2.4.2.7	Bestimmung relativer Populationsanteile durch Kombination von Einzelzellhybridi- sierung mit DAPI-Färbung	23
2.4.2.8	Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch Epifluoreszenz	23

2.5	Bestimmung thermodynamischer und kinetischer Parameter	23
2.5.1	Extraktion der EPS	24
2.5.2	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten	24
2.5.3	Bestimmung des Diffusionskoeffizienten	25
2.5.4	Sauerstoff- und Styrolverbrauchsmessungen	26
3	Ergebnisse und Diskussion	29
3.1	Abbauleistung des Versuchsbiofilter	29
3.2	Mikrobiologische Untersuchungen	30
3.2.1	Bestimmung der Biomasse	30
3.2.2	Gesamtzellzahl/Lebendzellzahl-Bestimmung	32
3.2.3	Isolierung der Reinkulturen	33
3.3	Chemotaxonomische Charakterisierung	34
3.3.1	Fettsäureprofile der Isolate	34
3.3.2	Fettsäureprofile der Biofilterproben	37
3.4	Molekularbiologische Methoden	42
3.4.1	16S rDNA-PCR	42
3.4.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung	42
3.4.2.1	Entwicklung der klassen- und isolatspezifischen Sonden	42
3.4.2.2	Populationsuntersuchungen an den Biofilterproben	43
3.5	Bestimmung der kinetischen und thermodynamischen Parameter	50
3.5.1	Extraktion der EPS	50
3.5.2	Bestimmung des Verteilungskoeffizienten Styrol/EPS/Luft	50
3.5.3	Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Styrol in EPS	52
3.6	Sauerstoff- und Styrolverbrauchsmessungen	54
4	Zusammenfassung	67
	Literaturverzeichnis	71
	Symbolverzeichnis	81
	Anhang	83

Kapitel 1

Einleitung

1.1 Zielsetzung

Die Biozönose in einem Biofilm setzt sich aus lebenden und toten Zellen der Primär- und Sekundärabbauer, Parasiten und Protozoen, sowie der Extrazellulären Substanzen (EPS) zusammen. Es sind somit komplexe Systeme, in denen vielfältige Prozesse simultan ablaufen können. In bestehenden Biofilmmodellen wird dieser Sachverhalt nur hinreichend bzw. gar nicht berücksichtigt. Ziel der mathematisch-mechanistischen Beschreibung der Abluftreinigung ist die Optimierung des Verfahrens in Abhängigkeit der Anlagen- und Betriebsparameter sowie Minimierung der Kosten. Durch eine Identifizierung funktioneller Bakteriengruppen und mit Untersuchungen zu populationsdynamischen Zusammenhängen können Prozessbeschreibungen zur Abluftreinigung mittels mathematischer Modelle deutlich effizienter simuliert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es die mikrobiologische Besiedlungs- und Diversitätsstruktur in einer Laborbiofilteranlage über mehrere Monate aufzuzeigen. Für diese Bestimmungen werden neben der klassischen mikrobiologischen Methode, ein Verfahren zur chemotaxonomischen Charakterisierung und ein molekularbiologisches Verfahren angewendet. Zudem bietet das chemotaxonomische Verfahren durch die zuvorige Inkubation mit deuteriertem Substrat, die Möglichkeit zwischen maßgeblichen Primärabbauern zu unterscheiden.

Der grösste Teil der bisherigen Erkenntnisse über die Biofilme sind mit Hilfe von Biotricklingfilterstudien gewonnen worden, da diese dickere sowie schneller wachsende Biofilme aufweisen als die reinen Gasphasen-Biofilter. Diese Studien sind zum besseren Verständnis durchaus dienlich, dennoch kann davon ausgegangen werden, dass Unterschiede zwischen einem Bio-

film in einer mit Wasser gesättigten Gasphase und dem in einer Wasserphase bestehen. Deshalb ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit die Parameter zur Kinetik direkt aus der Substrat- und Sauerstoffabnahmen in der Gasphase über dem Biofilm zu bestimmen und mit den Kinetikparameter, die mit der gleichen Kultur unter submersen Bedingungen erhalten wurden, zu vergleichen.

Schließlich ist die Bestimmung des Einflusses der extrazellulären Polysaccharide auf das Löslichkeits- und Diffusionsverhalten des Substrates erforderlich, um eine mathematische-mechanistische Beschreibung der Vorgänge im Biofilm zu ermöglichen.

1.2 Stand des Wissens

Aufgrund der relativ geringen Investitions- und Betriebskosten sowie der einfachen Handhabung ist die biologische Abluftreinigung eine interessante Alternative zu anderen Verfahren wie Adsorption, Chemische Gaswäsche, Kondensation, Thermische Nachverbrennung oder Nichtthermische Plasmabehandlung [VAN GROENESTIJN und HESSELINK 1993, OTTENGRAF 1986]. Etablieren konnte sich der Biofilter, der Biowäscher und der Biotricklingfilter, wobei der Biofilter das am häufigsten eingesetzte Verfahren ist. Dennoch wird das Potential der biologischen Abluftreinigung zur Zeit nur zu etwa 2 % genutzt [OTTOW und BIDLINGMAIER 1997]. Bei für den großtechnische Prozess ausgelegten Biofiltern nimmt häufig bereits nach kurzen Betriebszeiten die Abbauleistung deutlich ab. Ein Grund dafür ist die unzureichende Kenntnis der mikrobiellen Prozesse. Um diese Prozesse jedoch besser verstehen zu können ist die Kenntnis der Art und der Zusammensetzung der Mikroorganismen im Biofilm nötig.

Die klassischen Methoden zur Bakterienidentifizierung basieren auf physiologischen und morphologischen Eigenschaften der Mikroorganismen und setzen eine Kultivierung der Mikroorganismen voraus. Die selektiven Kultivierungsbedingungen und die unterschiedliche Kultivierbarkeit einzelner Bakterien können jedoch zu einem verzerrten Bild der natürlichen Populationszusammensetzung führen [WAGNER et al. 1994, AMANN et al. 1995, KÄMPFER et al. 1996]. Dies deutet darauf hin, dass die Mikroorganismen auf die komplexen sowie spezifischen Bedingungen in ihrem Habitat angewiesen sind, dem die Kultivierungsverfahren nicht gerecht werden können. Zu diesen spezifischen

Bedingungen für die sich ausbildenden Lebensgemeinschaften in Biozöosen gehören die sich auf natürliche Weise einstellenden Konzentrationsgradienten für Nährstoffe, Substrate, Sauerstoff und Wasser sowie der pH-Wert. Aber auch die Trägermaterialien, auf denen sich die Biofilme ausbilden, haben einen nicht zu vernachlässigenden Einfluss auf die Zusammensetzung der Gemeinschaft. Somit werden unter Laborbedingungen die Mikroorganismen bevorzugt wachsen, die am besten an diese Bedingungen angepasst sind. Auf der anderen Seite bedeutet dies, dass diese isolierten Mikroorganismen, selbst wenn sie in hoher Zahl auftreten, im Habitat nicht unbedingt auch eine dominierende Population darstellen [WHITE 1983]. Dies gilt in gleichem Maße für die unter Laborbedingungen nachgewiesenen ökologischen Leistungen. Auch diese können nicht immer auf die in situ-Stoffwechselleistung übertragen werden [VESTAL und WHITE 1989]. Mit Hilfe von spezifisch markierten genetisch veränderten Organismen (GVO's) wurde eine sehr gute Strategie entwickelt, um das Schicksal einzelner Bakterien in der Umwelt zu verfolgen. Dennoch lässt sich mit dieser Methode die Bedeutung der GVO's in und für die Bakteriengemeinschaft nicht herausarbeiten, da auf diese Weise die Artenvielfalt nicht mitberücksichtigt werden kann. Hierzu sind genetische Analysemethoden wie die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sequenzierungsverfahren deutlich besser geeignet (Abbildung 1.1). Untersuchungen der mikrobiellen Diversität in Umweltproben durch die Erstellung von 16S rRNA-Klonbibliotheken zeigen, dass ein großer Teil der Mikroorganismen zu bisher nicht kultivierten Spezies gehören [HUGENHOLTZ et al. 1998]. Amann et al. [AMANN et al. 1995] geben in Abhängigkeit vom Habitat 0.001 % bis 15 % kultivierbare Mikroorganismen an.

Die bakterielle Diversität in Biofiltern ist oft so hoch, daß Analyseverfahren, die auf einer PCR beruhen, mitunter nicht praktikabel erscheinen. Deshalb bieten sich Verfahren an, die sich auf die Bestimmung phylogenetisch oder physiologisch definierte Gruppen beschränken. Die Beschränkung auf phylogenetisch definierte Gruppen bringt zudem Vorteile, da die Sequenzdaten der 16S rDNA die derzeit größte verfügbare Datenbasis bildet. Zudem lässt sich die kultivierungsbedingte Verschiebung der mengenmäßigen Anteile einzelner Bakteriengruppen durch eine Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) vermeiden [AMANN et al. 1995, ZARDA et al. 1997]. Die rRNA-gerichteten Sonden können zur Identifizierung und Quantifizierung phylogenetisch definierter Bakteriengruppen in komplexen Habitaten eingesetzt werden [MOLLER et al. 1998]. Dadurch wird eine Möglichkeit

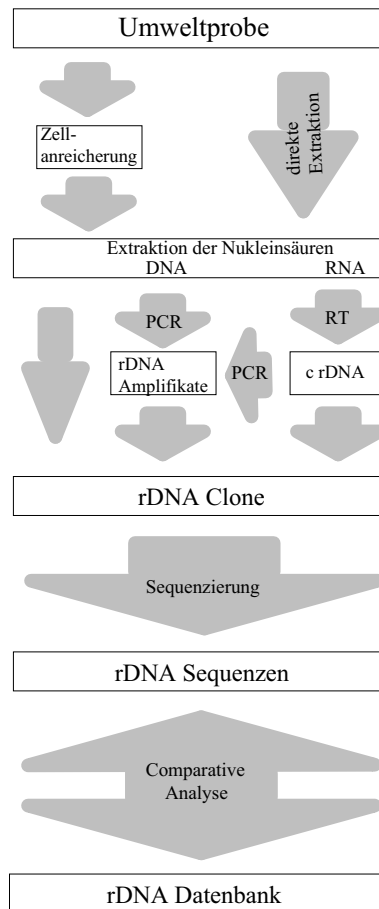


Abbildung 1.1: Fließschema zur Darstellung der verschiedenen Möglichkeiten zur Charakterisierung einer Umweltprobe durch comparative rRNA Sequenzierung nach M. Bauer [AMANN et al. 1995]

geboten die Populationsdynamik von Primärabbauern in der mikrobiologischen Gemeinschaft verfolgen zu können. Das Vorhandensein von konservativen und variablen Regionen innerhalb der 16S-rRNA ermöglicht den Einsatz von allgemeinen und spezifischen Markern. Desweiteren liegen sie in hoher Kopienzahl vor und bisher konnte kein horizontaler Gentransfer zwischen den Arten gezeigt werden [AMANN et al. 1995].

Diese Untersuchungen lassen aber nur bedingt Rückschlüsse auf das Abbaupotential der verschiedenen Gruppen zu. Deshalb sind physiologische Verfahren für die Beurteilung der Abbauleistung von besonderem Interesse. Eine Methode ist die Extraktion und Analyse von Fettsäuren, wie z.B. Phospholipid-Fettsäuren (PLFS). Spezifische Fettsäuren, insbesondere Phospholipide, sind die Hauptbestandteile von Membranen aller lebender Zellen und sind über Esterbindungen mit Glycerolmolekülen verknüpft. In Abbildung 1.2 ist der Aufbau der Cytoplasmamembran skizziert.

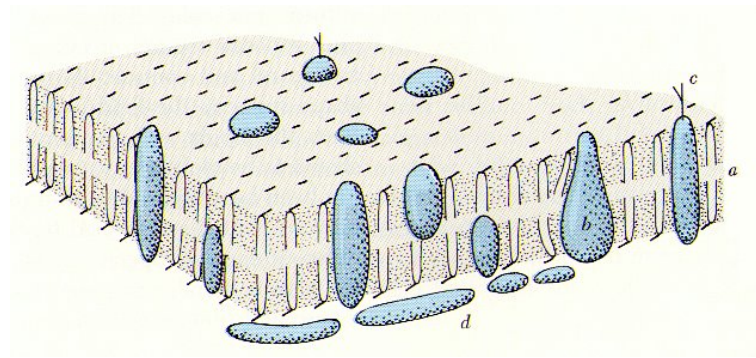


Abbildung 1.2: Struktur der Cytoplasmamembran. Aufbau einer Doppelschicht (lipid bilayer (a)) aus Phospholipiden mit hydrophoben Gruppen (innen) und hydrophilen Gruppen (außen) sowie Transmembranproteinen (b, c). Die Grundstruktur der Cytoplasmamembran ist bei Prokaryonten und Eukaryonten ähnlich aufgebaut (nach Singer und Nicolson [SWANSON und WEBSTER 1977]).

Membranfettsäuren wie die PLFS werden in der Taxonomie von Mikroorganismen verwendet. Aufgrund gruppenspezifischer Fettsäuren können Aussagen über die Zusammensetzung mikrobieller Gemeinschaften in Umweltproben gemacht werden [BOSSIO und SCOW 1998, ZELLES 1999]. Der Vorteil dieser Methode liegt in der nahezu ubiquitären Verbreitung der PLFS. Die einzige bekannte Ausnahme sind die *Archaea*. Ihre Lipide beinhalten anstelle von Fettsäuren sich wiederholende Einheiten von Isoprenen, deren hydrophobe Seitenketten über Etherbindungen mit den Glycerolmolekülen verbunden sind [BROCK et al. 2000]. Dadurch, dass die PLFA's innerhalb weniger Tage nach dem Absterben der Zellen abgebaut werden [BOSCHKER und MIDDELBURG 2002], wird zum größten Teil die lebende Biomasse charakterisiert. Durch die Verwendung von Substraten, die mit stabilen Isotopen markiert sind, kann zudem eine Aussage über die Abbauprodukte von Mikroorganismen gemacht werden. Diese werden in die Biomasse eingebaut und taxonomische Markermoleküle können bezüglich ihrer Markierung ausgewertet werden [ALEXANDRINO et al. 2001, PELZ et al. 2001, BOSCHKER und MIDDELBURG 2002].

Die Abbauleistung eines Biofilters für eine spezifische Komponente ist abhängig von der verwendeten mikrobiellen Gemeinschaft, dem Anteil der Biomasse und den Betriebsbedingungen, die sich auf die Biologie und die Zugänglichkeit des abzubauenen Substrates auswirkt [VAN GROENESTIJN und HESSELINK 1993].

Für das Scaling up werden mathematische Modelle herangezogen. Ottengraf und Van den Oever [OTTENGRAF und VAN DEN OEVER 1983] entwickelten ein allgemeines mathematisches Modell für Biofilter, welches die Diffusion der Schadstoffe von der Gasphase in den Biofilm und den Abbau im Biofilm berücksichtigt. In diesem Modell wird davon ausgegangen, dass es sich bei dem Biofilm um eine dünne homogene Schicht aktiver Zellen handelt und die Biozönose wird einzig über die Biofilmdichte charakterisiert. Andere Biofiltermodelle setzen ebenfalls eine gleichmäßige Verteilung der Biomasse über den ganzen Biofilter voraus. Ebenso wird davon ausgegangen, dass es sich bei allen Zellen um Primärabbauer handelt [DESHUSSES et al. 1995, HODGE und DEVINNY 1995, SHAREEFDEEN und BALTZIS 1994, DECRESSIN 1997, FORELL 1999]. Die Bestimmung der kinetischen Parameter erfolgt oftmals in submersen Kulturen. Studien von Stoffels et al. [STOFFELS et al. 1998] mit 16S rRNA-gerichteten Oligonucleotidsonden zeigen, daß signifikante Unterschiede zwischen einer Submerskultur und der Kultur in einem Biotricklingfilter bezüglich der Zusammensetzung der Mikroorganismen bestehen. Da sich die Abbaukinetiken der Mikroorganismenpopulationen deutlich unterscheiden, ergeben sich abhängig von der jeweiligen Mischkultur andere Kinetiken. Zudem muß berücksichtigt werden, daß der Biofilm aus lebenden und toten Zellen der Primär- und Sekundärabbauer, Parasiten und Proteozoten sowie der EPS besteht. Werden nun die kinetischen Parameter auf die Gesamtbiofilmdichte bezogen, kann es zu abweichenden Kurvenverläufen zwischen experimentell bestimmten und simulierten Abbaugeschwindigkeiten in Biofilmen kommen.

Die mikrobiologische EPS sind Biopolymere, die gerade in neuerer Zeit immer mehr als Schlüsselkomponenten für Biofilmbildung, Wachstum, physiologische Funktionen sowie physiko-chemische Eigenschaften gesehen werden [FLEMMING und WINGENDER 2001]. EPS werden definiert als extrazelluläre Polymer-Substanzen biologischen Ursprungs, die an der Bildung von mikrobiologischen Aggregaten beteiligt sind [GEESEY 1982]. Eine andere Definition der EPS lautet: Bei der EPS handelt es sich um organische Polymere mikrobiologischen Ursprungs, durch die es Biofilmsystemen ermöglicht wird, an Zellen sowie andere Partikel (Kohäsion) und an Oberflächen (Adhäsion) zu binden [CHARACKLIS und WILDERER 1989]. Es wird angenommen, dass Polysaccharide die Hauptkomponente in der EPS eines Biofilms sind [COSTERON und IRVIN 1981]. Aber auch Proteine und Nucleinsäuren [DIGNAC et al. 1998, NIELSEN und JAHN 1999] sowie amphiphile Komponenten, die (Phospho)-Lipide enthalten [NEU 1996],

können insbesondere in Klärschlämmen, bei Biofilmen in Abwasseranlagen oder Trickingfiltern in signifikanten Anteilen vorliegen. Zu den vornehmlichen Funktionen der EPS zählen die Adhäsion auf Oberflächen, Aggregation der Zellen sowie der Bildung von Flocken und Biofilmen. Sie dient als Schutzbarriere und verbessert die Sorptionseigenschaften, wie die Akkumulation der Nährstoffe, Wasserretention und Akkumulation von Schadstoffen in Schlämmen. Zudem gehört sie zu den strukturgebenden Elementen in Biofilmen. Sie sorgt für mechanische Stabilität, Entwicklung der Mikroconsortia, Bildung von Konzentrationsgradienten, konvektiven Massentransport durch Bildung von Kanälen, Retention von extrazellulären Enzymen sowie Enzyminteraktionen und horizontalen Gentransfer [FLEMMING und WINGENDER 2001].

Die in dieser Arbeit verwendete Modellsubstanz für die Biofiltration ist der aromatische Kohlenwasserstoff Styrol, auch bekannt als Vinylbenzol bzw. Phenylethylen. Styrol ist eine farblose, brennbare, leicht polymerisierende Flüssigkeit mit süßlichem Geruch. Die Wasserlöslichkeit für Styrol beträgt bei 20 °C 300 mg/l [STYROL 1990] und der Verteilungskoeffizient bei 25 °C $c(\text{Gasphase})/c(\text{Wasserphase}) = 0,11$ [RUTENFRANZ et al. 1994]. Unter Lichteinfluß werden leicht Oxidationsprodukte wie Aldehyde und Ketone mit unangenehmem Geruch gebildet. Der größte Teil der industriell erzeugten Emissionen gelangt in die Atmosphäre. In der Atmosphäre reagiert Styrol sehr schnell mit Ozon und nimmt somit Einfluß auf die Bildung des photochemischen Smog. Die WHO [WHO 1987] hat zwei Richtwerte für die maximal zulässige Konzentration von Styrol in die Umwelt herausgegeben: 800 μm^3 über 24 Stunden und 70 μm^3 für 30 Minuten. Als maximale Arbeitsplatzkonzentration (MAK) wird für Styrol 85 mg/m³ bzw. 20 ppm angegeben [RÖMPP 1997]. Styrol gehört gemäß TA-LUFT [JOST 1998] der Klasse II für organische Stoffe an: Die Emission darf bei einem Massenstrom von 2 kg/h Styrol oder mehr die Massenkonzentration von 0,10 g/m³ nicht überschreiten. Die DEUTSCHE FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT [FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT 1998] hat Styrol in die neue Kategorie 5 für krebserzeugende Arbeitsstoffe eingestuft - dabei handelt es sich um Stoffe mit krebserzeugender und genotoxischer Wirkung, deren Wirkungsstärke jedoch als so gering erachtet wird, dass unter Einhaltung des MAK-Wertes kein nennenswerter Beitrag zum Krebsrisiko für den Menschen zu erwarten ist.

Die Inoculation der Biofilterträgermedien mit spezifischen, adaptierten Mikroorganismen soll die Start up Periode und die Anlagengröße reduzieren [SHAREEFDEEN und BALTZIS 1994, ACUNA et al. 1999]. Die meisten Studi-

en zum mikrobiellen Styrolabbau wurden mit aeroben Bakterien durchgeführt, und zwar hauptsächlich an *Pseudomonas* spp. [OMORI et al. 1974, OMORI et al. 1975, SHIRARI und HISATSUKA 1979, BAGGI et al. 1983, HIGASHIMURA et al. 1983, UTKIN et al. 1991, O'CONNOR et al. 1995], wobei die Fähigkeit zum Styrolabbau als plasmidkodiert angenommen wird [BESTETTI et al. 1984, GOLOVLEVA et al. 1988, RUZZI und ZENNARO 1989]. Andere bekannte aerobe Styrolabbauer gehören zur Genera *Alcaligenes* [TSUCHII et al. 1977], *Bacillus* [SRIVASTAVA 1995], *Mycobacterium* [BURBACK und PERRY 1993], *Nocardia* [OTTENGRAF et al. 1986], *Rhodococcus* [WARHURST et al. 1994] und *Xanthobacter* [HARTMANS et al. 1989]. Als anaerobe Abbauer sind nur *Clostridium* spp. und *Enterobacter* spp. bekannt [GRBIC-GALIC et al. 1990]. Bei den Pilzen wird nur von einer schwarzen Hefe *Exophiala jeanselmei* [COX et al. 1993a] und einigen weiss-roten Pilzen *Bjerkandera adusta*, *Trametes versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* und *Pleurotus ostreatus* [BRAUN-LÜLLEMANN et al. 1997] als Styrolabbauer berichtet. Arnold et al. [ARNOLD et al. 1997] führten Untersuchungen zur Gesamtbiozönose an einem Torf Biofilter durch und konnte sieben Stämme mit der Fähigkeit zum Styrolabbau isolieren. Diese konnten als zur Genera *Tsukamurella*, *Pseudomonas*, *Sphingomonas*, *Xanthomonas* und einem nicht identifizierten Genus der gamma-Gruppe der *Proteobacteria* gehörend bestimmt werden.

Für den aeroben mikrobiellen Abbau von Styrol sind zwei Abbauewege bekannt, der eine beginnt mit der Oxidation der vinylischen Seitenkette [O'CONNOR und DOBSON 1996] und der andere basiert auf dem direkten Angriff des aromatischen Kerns [WARHURST et al. 1994] (Abbildung 1.3).

Der Abbaueweg über die Seitenkettenoxidation führt zur Epoxidation der vinylischen Seitenkette durch einen Flavin Adenin Dinukleotid Zusammenschluß. Zwei Untereinheiten der Monooxygenase führen durch anschließende Isomerisation des Epoxidstyrols zur Bildung des Phenylacetaldehyds. Diese Verbindung wird durch die Wirkung von einer NAD^+ -oder Phenazinmethosulfat abhängigen Dehydrogenase zu Phenylacetatsäure. Die Umwandlung von Styrol zu Phenylacetatsäure repräsentiert den Hauptabbaueweg von Styrol und wird für die meisten der untersuchten Styrolabbauer angegeben.

Rhodococcus rhodochrous NCIMB 13259 baut Styrol durch direkte Oxidation des aromatischen Rings ab. Für diesen Abbaueweg wird eine NAD^+ abhängige *cis*-Glycoldehydrogenase verantwortlich gemacht. 3-Vinylcatechol wird im weiteren durch eine *meta*-Spaltung zu Acetaldehyd und Pyruvat abgebaut.

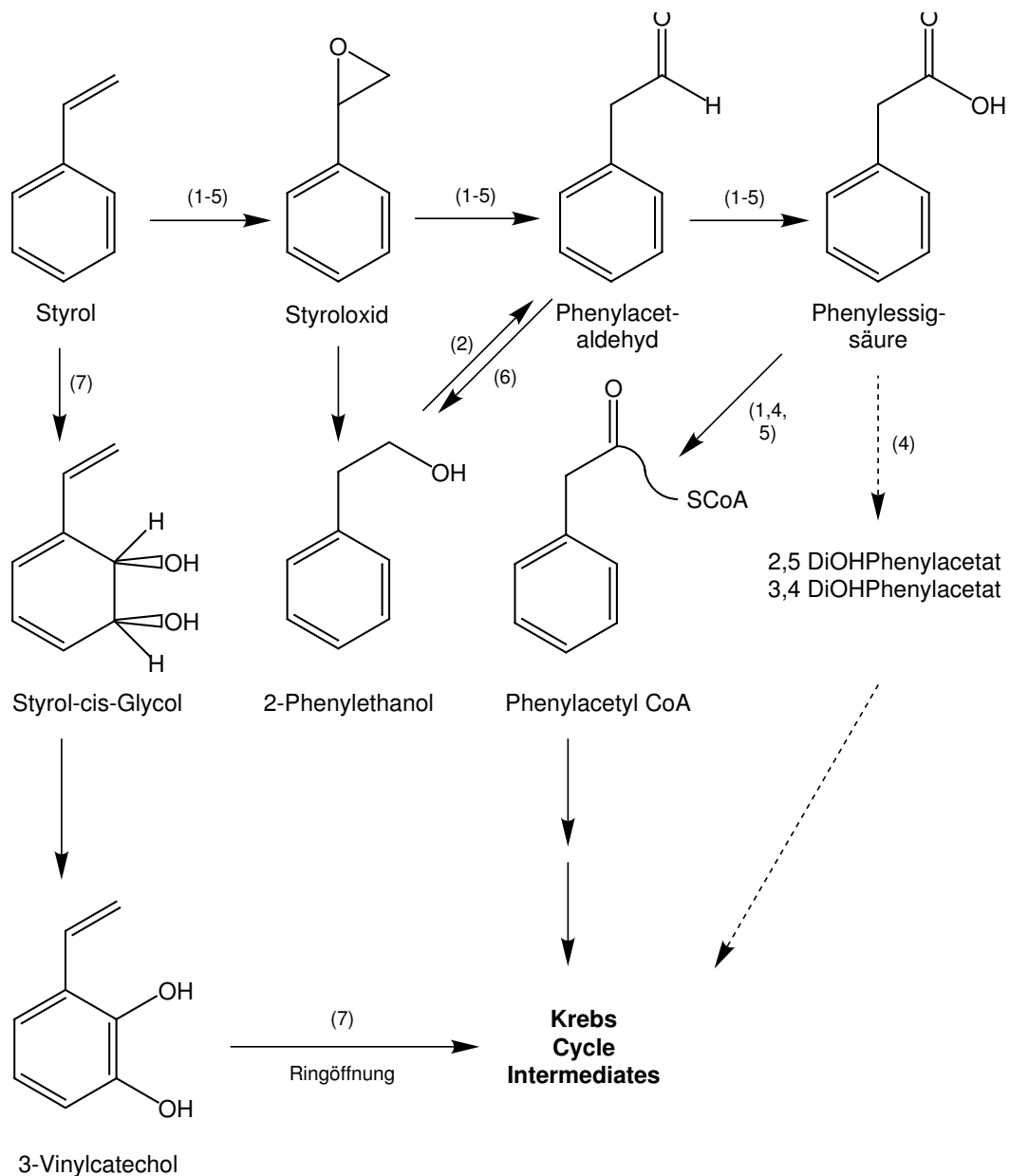


Abbildung 1.3: Zusammenfassung der wichtigen Möglichkeiten für den bakteriellen Styrolabbau. Die Nummern repräsentieren die Mikroorganismen, von denen bekannt ist, dass sie diesen Weg bevorzugen: 1. *P. putida* CA-3; 2. *Xanthobacter* strain 124X; 3. *Xanthobacter* strain S5; 4. *P. fluorescens* ST; 5. *Pseudomonas* sp. strain Y2; 6. *Corynebacterium* strain ST-10; 7. *Rhodococcus rhodochrous* NCIMB 13259 [O'LEARY et al. 2002]

Kapitel 2

Materialien und Methoden

2.1 Versuchsbiofilter

Zur Untersuchung des Styrolabbaus steht ein Laborbiofilter mit PORAVER-Partikeln (Dennert) mit einer Korngröße von $d=4$ mm als Schüttung zur Verfügung.

PORAVER dient in der Bauindustrie als Grundlage zur Herstellung von Mauersteinen oder als Schüttgut für Hohl- und Zwischenräume, Balkendecken und Fußböden zur Dämmung. PORAVÉR wird aus Recycling-Glas hergestellt. Dazu werden dem Glasmehl in einer Mischanlage Wasser, Bindemittel und Blähmittel beigelegt. Das Granulat wird im Drehofen bei ca. $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ gebläht. Der Blähprozess lässt ein feinporiges, creme-weißes Rundgranulat entstehen, das in seinem Inneren feine Luftkammern einschließt.

Aufgrund seiner relativ großen, porösen Oberfläche bietet es eine gute Ansiedlungsmöglichkeit für die Mikroorganismen. Der geringe Druckverlust ermöglicht eine gute Durchströmbarkeit auch bei größeren Schütthöhen. Zudem zeichnet es sich durch ein geringes Eigengewicht und eine geringe Wasseraufnahme (1-2 %) aus. Studien von Senthuran [SENTHURAN et al. 1997] zeigten, dass PORAVER auf Grund seiner guten mechanischen Eigenschaften auch für Festbett-Reaktoren geeignet ist.

Als Biofilterreaktor (Abbildung 2.1) dient eine segmentierte Kolonne aus PVC. Durch die Segmentierung soll eine bessere Zugänglichkeit zur Probenentnahme in verschiedenen Filterhöhen ermöglicht werden. Perforierte Metallplatten sorgen für das Zurückhalten des Trägermaterials in den verschiedenen Segmenten.

Das PVC-Rohr besitzt einen Innendurchmesser von 0.225 m. Die Kolonne besteht aus drei Filtersegmenten, die je eine Höhe von 0.3 m aufweisen. Die Filtermaterialschüttung beträgt 0.2 m. Oberhalb von 0.05 m der Schüttung

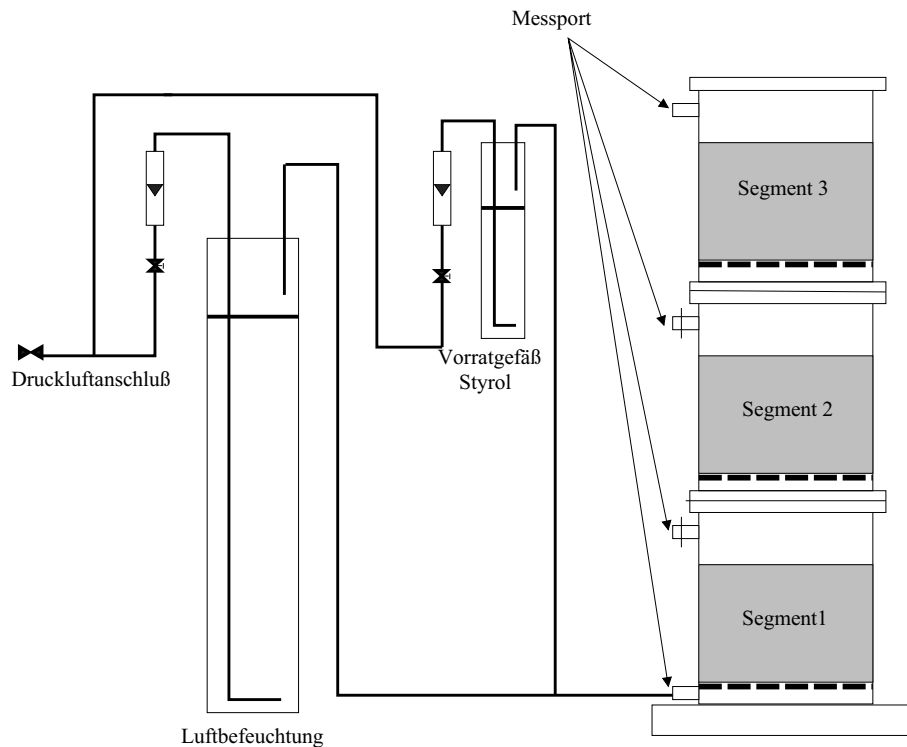


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung des Versuchsbiofilters

sowie am Eingang befinden sich je ein Port zur Detektion der dort vorherrschenden Styrolkonzentration.

Der Trägergasstrom wird dem Druckluftnetz entnommen und auf einen Vordruck von 1.2 bar gedrosselt. Die Druckluft wird mit Hilfe eines Massendurchflußreglers auf einen konstanten Wert von $0.6 \text{ m}^3/\text{h}$ gehalten. Der geregelte Luftstrom wird zur Sättigung mit Wasserdampf durch eine mit destilliertem Wasser befüllte Gaswaschflasche in die Filterkolonne geleitet. Zudem wird ein zweiter Luftstrom durch eine weitere, mit Styrol befüllte, Gaswaschflasche zur Beladung mit dem Substrat geleitet. Die Dosierung der Substratzufuhr erfolgt manuell über ein Ventil. Zu Beginn der Studie wurde die Eingangs-Styrol-Konzentration auf $80 \mu\text{g}/\text{l}$ gehalten. Nach einer zweimonatigen Inokulation ist die Eingangskonzentration auf $160 \mu\text{g}/\text{l}$ und nach einer zweijährigen Betriebszeit nochmals auf $350 \mu\text{g}/\text{l}$ erhöht worden.

Um eine ausreichende Befeuchtung zu gewährleisten, ist zusätzlich vierzehntägig über einen Zeitraum von 18 Monaten je 200 ml Minimalnährlösung von oben über die einzelnen Segmente gegossen worden.

Der befeuchtete Substratstrom tritt unten in die Kolonne ein, durchströmt die mit Biofilm bewachsenen Filterschüttung und verläßt am Kolonnenkopf den Reaktor in die Atmosphäre.

2.1.1 Detektion des Styrolabbaus

Die Gesamtkohlenstoff-Konzentration des Eingangstroms sowie an jedem Port wird mit einem Flammenionisationsdetektor (FID) Modell 3006 der Firma Bernath Atomic (Wennigsen) detektiert.

Gasproben aus dem Reaktor sind in Dichlormethan absorbiert und mit einem Gaschromatographen CP9000 der Firma Chrompack (Varian) mit FID analysiert worden. Es ist nur ein Peak detektiert worden, der durch Vergleichsmessungen als Styrol identifiziert wurde, so dass ein Ausstoß von Metaboliten ausgeschlossen werden kann.

2.1.2 Inbetriebnahme des Biofilters

Um eine hygienisch unbedenkliche Bakterienkultur mit einem hohen Abbaupotenzial zu gewährleisten werden als Inokulum die Stämme *Pseudomonas* D21 und *Rhodococcus* D1 eingesetzt. Diese Stämme sind aus einem Biofilter zum Styrolabbau an der Universität Osnabrück/Abteilung Mikrobiologie isoliert worden und als Styrolabbauer charakterisiert [DRÖGE 1996]. Der Reaktor und das PORAVER sind nicht gereinigt worden, so dass eventuell anhaftende Biofilmreste ebenfalls als Animpfkultur dienen.

Da die Stämme *Pseudomonas* D21 und *Rhodococcus* D1 im Fermenter nur mäßiges Wachstum zeigen, wird dazu übergegangen, auf Malz-Agar-Platten (Merck) zu kultivieren. Nach einer Inkubationszeit von 4 Tagen bei 30 °C werden die Kolonien von je 15 Platten mit Minimalnährlösung abgeschlämmt und zu gleichen Teilen über die einzelnen Filtersegmente gegossen. Diese Prozedur wird wöchentlich über einen Zeitraum von zwei Monaten wiederholt.

2.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Die Charakterisierung der Biomasse in den verschiedenen Segmenten des Versuchsbiofilters über die Biomassen-Entwicklung sowie über den Lebend-Gesamtzell-Anteil stellt einen wichtigen Gesichtspunkt in der Fragestellung dar, ob der gesamte Biofilm als aktive Masse angesehen werden kann. Ebenso gilt es zu klären, welche mikrobielle Diversität sich nach der Inokulation ausbildet. Die Bestimmung der Biomassenentwicklung und des Leben-Gesamtzell-Anteils wird halbjährlich vorgenommen. Die Isolierung

von Reinkulturen nach vier und neun Monaten nach Beginn der Inbetriebnahme des Biofilters.

2.2.1 Bestimmung der Biomasse

Zur Bestimmung der Biomasse werden zunächst Proben aus den drei Segmenten der Biofilteranlage bei 110 °C über 24 Stunden getrocknet. Nach dem Auswiegen werden die getrockneten Proben bei 650 °C über 2 Stunden verglüht und erneut gewogen. Von jeder Probe wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Da der Biofilm nicht aus einem Vollnährmedium stammt, kann davon ausgegangen werden, dass sich nur geringste Anteile anorganischer Mineralien im Biofilm angesammelt haben. Somit werden die bestimmbaren Auswägungen direkt der Biomasse zugeordnet.

2.2.2 Lebend-Gesamtzellzahl-Bestimmung

Die Lebend-Gesamtzellzahl-Bestimmung wird nach Färbung der Zellen mit 2,4-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) und 5-Cyano-2,3-ditoloyl-tetrazolium-chlorid (CTC) nach Villaverde et al. [VILLAYERDE und FERNANDEZ-POLANCO 1999] durchgeführt. Tetrazoliumsalze dienen als cytochemische Indikatoren für oxidative Metabolismen in Bakterien [TREVORS 1984]. Der Farbstoff passiert in einer farblosen oxidierten Form die Zelle und wird in der Anwesenheit von aktiven Elektronentransportsystemen in der Zelle zu einem rotfluoreszierenden Formazankristall reduziert. Das blaue Fluorochrom DAPI bindet dagegen bevorzugt in die kleinen Furchen der AT-reichen Regionen der DNA [KAPUSCINSKI 1995] und kann somit zur Bestimmung der Gesamtzellzahl verwendet werden.

Proben aus dem Biofilter werden in Ringers Reagenz (1:10; v/v) (Fisher Chemicals, Leics) aufgenommen und durch kräftiges Schütteln über 30 Minuten bei 160 U/min suspendiert. Von diesen Proben werden 10 ml einer 1:100 Verdünnung angesetzt und diese über einen schwarzen Polycarbonatfilter mit der Porengröße von 2 µm abfiltriert. Die Filter werden in eine mit feuchtem Filterpapier ausgelegte Petrischale gegeben, um ein Austrocknen zu vermeiden. Auf die abfiltrierten Zellen werden 0.6 ml CTC-Lösung (1.56 mg/ml, pH 6.5) (AppliChem) pipettiert und 3-4 Stunden im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend werden die Filter erneut in die Filtrationsapparatur eingespannt, mit 0.1 ml einer 37 % Formaldehydlösung versehen und 5-10 Minuten fixiert. Für die DAPI-Färbung werden die Filter mit 0.5 ml einer

DAPI-Lösung (1 mg/ml) (AppliChem) versetzt und weitere 10 Minuten inkubiert. Abschließend wird das überschüssige DAPI durch Waschen mit sterilem Wasser entfernt.

Die mikroskopische Auswertung erfolgt unter dem Mikroskop Leitz DMR-BE (Leica, Wetzlar). Dabei werden PL Fluotar und N Plan Objektive mit 40- und 100-facher Vergrößerung eingesetzt. Die Kenndaten des verwendeten Filtersystems sind in der Tabelle 2.1 aufgeführt. Die Dokumentation erfolgt

Tabelle 2.1: Filtersysteme für die CTC/DAPI-Färbung

Filtersystem	Anregungsfilter	Farbteiler [nm]	Emissionsfilter	Verwendung
I 3	BP 450-490	RKP 510	LP 515	DAPI/CTC

photographisch mit Hilfe einer automatischen Kamera (Wild MPS52, Leica, Wetzlar). Als Filmmaterial werden Agfa Vista 400 ASA Filme verwendet.

2.2.3 Isolierung der Reinkulturen

Die Isolierung der Reinkulturen erfolgt nach vier Monaten auf Malz-Agar. Dafür werden aus den verschiedenen Segmenten Proben in Ringers Reagenz (1:10; v/v) aufgenommen und durch kräftiges Schütteln über 30 Minuten bei 160 U/min suspendiert. Von der Suspension wird eine dezimale Verdünnungsreihe in 0.9 % NaCl-Lösung bis zum Verdünnungsfaktor von 10^3 erstellt. 100 μ l aus jeder Verdünnungsstufe werden anschließend auf den Agarplatten ausgespatelt und 3 Tage bei 30 °C inkubiert. Die Isolierung erfolgt durch wiederholtes Ausstreichen (3er-Ausstrich) der gewachsenen Kolonien, die durch ihre Morphologie voneinander unterscheidbar sind.

Da nach neun Monaten kein weiteres Wachstum von Kolonien auf Malz-Agar beobachtet wird, erfolgt die zweite Isolierung auf Trypticase-Soja-Agar (Becton Dickinson, Cockeyville). Dabei wird wie oben beschrieben vorgegangen.

2.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Die Taxonomie beschäftigt sich mit der Schaffung von Ordnungssystemen für Organismen. Eine Möglichkeit der Diversitätsbeschreibung der isolierten Bakterien sowie der Biofilterproben stellt die chemotaxonomische Charakterisierung, d.h. die Zuordnung der Organismen auf Grundlage chemi-

scher Merkmale, über die Analyse von Fettsäuremustern membrangebundener Phospholipide dar. Die Methode gilt als empfindlich und gut reproduzierbar zur Analyse von bakteriellen Besiedlungsstrukturen.

Die Extraktion der Lipide erfolgt in veränderter Form in Anlehnung an die Methode von Bligh und Dyer [BLIGH und DYER 1959], modifiziert von Lipski und Altendorf [LIPSKI und ALTENDORF 1997]. Grundlage der Untersuchungen durch Isotopenmarkierung von Membranfettsäuren von *in situ*-Abbauern ist die von Alexandrino et al. [ALEXANDRINO et al. 2001] etablierte Methode durch Verwendung von deuteriertem Styrol als Kohlenstoff-Quelle.

2.3.1 Extraktion der Membranlipide

Die Extraktion der Membranfettsäuren erfolgt nach fünf Tagen Inkubation von 20 g Biofiltermaterial mit 20 μ l deuteriertem Styrol (D_8 -Styrol, Promochem) bei 30 °C . Anschließend wird das Filtermaterial in 50 ml Spitzkolben überführt und mit Phosphatpuffer (50 mM, pH 7.5), Methanol und Chloroform (1:3:1.25; v/v/v) versetzt. Nach zweistündigem heftigem Schütteln wird erneut Chloroform und Wasser (1:1; v/v) zugegeben. Nach der Phasentrennung wird die Chloroformphase abgenommen und auf ca. 1 ml im Rotationsverdampfer eingeeengt. Die Elution in neutrale, Glyco- und Phospholipide wird mittels einer Silicagelsäule mit 0.5 g Sorbent und 10 ml Reservoir (Isolute, ICT, Bad Homburg) durchgeführt, die mit Chloroform vorkonditioniert wurde. Die Elutionsfolge ist:

1. neutrale Lipide mit Chloroform,
2. Glycolipide mit Aceton und
3. Phospholipide mit Methanol.

Die Phospholipidfraktion wird bis zur Trockne eingeeengt und in Methanol/Toluol (1:1; v/v) aufgenommen. Anschließend werden die Phospholipide durch alkalische Methanolyse in Fettsäuremethylester (FAME) überführt. Hierzu wird frische methanolische KOH (0.2 N) zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von Hexan, Essigsäure (1 M) und H_2O_{bidest} (1:0.15:1; v/v/v) werden die Probe über fünf Minuten kräftig geschüttelt. Nach erfolgter Phasentrennung wird die Hexanphase abgenommen und auf ca. 100 μ l eingeeengt.

Die Bestimmung der FAME der Reinkulturen sind von PD Andre Lipski auf der Grundlage der von Sasser [SASSER 1990, LIPSKI und ALTENDORF 1997] entwickelten Methode zur Identifikation von Bakterien durch

Fettsäureanalyse an der Universität Osnabrück/Abteilung Mikrobiologie durchgeführt worden.

2.3.2 Gaschromatographie

Die Identifikation der FAME wird mittels GC-MS von PD Andre Lipski an der Universität Osnabrück/Abteilung Mikrobiologie durchgeführt. Es wird ein Gaschromatograph (GC5890 Series II Plus, Hewlett Packard) mit einer Kapillarsäule (HP5MS, Phase: 5 % Phenyl Methly-Silicone, 30 m x 0.25 mm) und angeschlossenen Massenspektrometer (MS5972 Series, Hewlett Packard) verwendet. Aus den Retentionszeiten der FAME werden mit Hilfe eines FAME-Standards (Calibration Standard Kit for the Microbial Identification System, Agilent) ECL-Werte (Equivalent chain length) für jeden Peak ermittelt. ECL-Werte ergeben sich aus einer linearen Interpolation der Retentionszeiten zwischen zwei geradkettigen, gesättigten Fettsäuren. Die ermittelten ECL-Werte werden mit den ECL-Werten bereits bekannter FAME von Referenzstämmen verglichen. Diese Ergebnisse werden durch den Vergleich des Massenspektrums eines Peaks mit Massenspektren bekannter FAME verifiziert [LIPSKI und ALTENDORF 1997].

2.4 Molekularbiologische Methoden

Unter den verschiedenen molekularbiologischen Methoden, welche sich zur Bestimmung bakterieller Diversität heranziehen lassen (Dot Blot, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Spacer Polymorphismen, Restriktions Fragment Längen Polymorphismen (RFLP), denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE), werden in der vorliegenden Arbeit die Fluoreszenz *in situ* Hybridisation (FISH), sowie für einige ausgewählte Isolate die Sequenzanalyse ihrer Polymerase-Kettenreaktion(PCR)-Produkte, herangezogen.

Neben der zeitlichen und räumlichen Diversitätsbestimmung im Biofilter, sollen diese Methoden dazu dienen, den Anteil der nach der PLFA-Methode bestimmten maßgeblichen Primärabbauer prozentual zu erfassen.

2.4.1 16S rDNA-PCR

Die Extraktion der genomischen DNA sowie die Amplifikation der 16SrRNA sind an der Universität Osnabrück/Abteilung Mikrobiologie durch-

geführt worden. Die Sequenzierung der ersten ca. 500-700 Basen der 16SrDNA erfolgte in der Universität Osnabrück/Abteilung Spezielle Botanik. Die Proben PB2, PB3.2, PB3.3 und PB4 sind vom Sequenzierservice GAG Bioscience GmbH (Bremen) sequenziert worden.

2.4.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Unter der *in situ* Hybridisierung versteht man die sequenzabhängige Paarung von einzellsträngigen RNA- und DNA-Molekülen zu einem DNA:DNA, RNA:RNA bzw. RNA:DNA-Hybrid. Seine Bindung findet statt, wenn die Bausteine der zufällig zusammentreffenden Moleküle zueinander komplementär sind und sich über Wasserstoffbrückenbindungen verbinden können. Die Detektion der zu analysierenden DNA- oder RNA-Zielregion findet über die sequenzspezifische Anlagerung von komplementären, markierten Nukleinsonden statt. Die Stringenz, mit der die *in situ* Hybridisierung durchgeführt wird, bestimmt den Prozentsatz korrekt gepaarter Nukleotide im gebildeten Doppelstrang aus Sonde und Zielsequenz.

2.4.2.1 Entwicklung von rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden

Die Entwicklung von spezifischen Oligonukleotidsonden wird durch vergleichende Analyse der in der Datenbank der TU München enthaltenen 16S-rDNA-Sequenzen durchgeführt. Für den Entwurf neuer Sonden werden Programme des Softwarepakets ARB (Stunk, 1993) verwendet. Die verwendeten Oligonukleotidsonden sind bei Interaktiva (Ulm) bereits markiert bestellt worden.

2.4.2.2 Zellfixierung

1fach PBS (phosphatgepufferte Kochsalzlösung) pH 7,4

130 mM NaCl

10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄

4 %ige Paraformaldehydlösung

4 g Paraformaldehyd (Merck) wird in 60 ml H₂O_{bidest} auf 60 °C erwärmt und durch Zugabe von 1-2 Tropfen 1N NaOH gelöst. Anschließend werden 33.2 ml 3fach PBS zugegeben und der pH mit HCl auf 7.2 eingestellt. Die mit H₂O_{bidest} auf 100 ml aufgefüllte Lösung wird mit 0.2 µm Einwegfiltern (Millipore) sterilfiltriert. Die Haltbarkeit beträgt bei 4 °C ca. 1-2 Tage.

Für die Paraformaldehydfixierung werden jeweils 1-4 ml der Proben-suspension (Biofiltermaterial in Ringersreagenz 1:10; v/v verdünnt) in einer Zentrifuge (10000 U/min, 10 min) pelletiert und in 1fach PBS resuspendiert. Drei Teile frisch hergestellter Paraformaldehydlösung und ein Teil Zellsuspension werden gemischt und über Nacht bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation (10000 U/min, 20 min) wird das Zellpellet mit 1fach PBS gewaschen, abzentrifugiert, in 1fach PBS resuspendiert und mit demselben Volumen Ethanol_{abs} versetzt. Die so fixierten Zellen werden bei -20 °C gelagert.

Für die Ethanolfixierung werden 1-2 ml der Probensuspension (Biofiltermaterial in Ringersreagenz 1:10; v/v verdünnt) in einer Zentrifuge (10000 U/min, 10 min) pelletiert, in 1fach PBS resuspendiert und, mit demselben Volumen Ethanol_{abs} versetzt und bei -20 °C gelagert.

2.4.2.3 Beschichtung der Objektträger

Die sauberen, teflonbeschichteten Objektträger (10 Aussparungen, Paul Marientfeld) werden langsam in die noch warme Gelatine-Lösung (1 % Gelatine (Sigma), 0.01 % Kaliumchromsulfat, zum Lösen auf 60 °C erhitzen) getaucht. Danach werden die Objektträger mindestens 3 h an einem staubfreien Ort bei RT getrocknet.

2.4.2.4 Hybridisierungs- und Waschbedingungen

Für bereits beschriebene Sonden ist bei der jeweils angegebenen Stringenz gearbeitet worden. Für die im Rahmen dieser Arbeit neu entwickelten Sonden sind die Hybridisierungsbedingungen empirisch bestimmt worden. Alle Hybridisierungen werden bei einheitlicher Temperatur von 46 °C durchgeführt. Die für die jeweilige Sonde notwendige Stringenz wird durch Zugabe von Formamid zum Hybridisierungspuffer eingestellt. Formamid destabilisiert Hybride und wirkt so stringenzerhöhend. Im Waschpuffer wird die identische Stringenz durch eine entsprechende Absenkung der Kationenkonzentration eingestellt (Tabelle 2.4.2.4. Dadurch können große Abfallmengen an Formamid verhindert werden. Die NaCl-Konzentration für den Waschpuffer wird mit folgender Formel berechnet:

$$0.5 \cdot (\% \text{ Formamid}) = -16.6 \log[\text{Na}^+] \quad (2.1)$$

Hybridisierung bei 46 °C		Waschung bei 48 °C	
% Formamid bei der Hybridisierung	[NaCl] in mM	μ l NaCl auf 50 ml ^a	
0	900	9000	
5	636	6300	
10	450	4500	
15	318	3180	
20	225	2150	
25	159	1490	
30	112	1020	
35	80	700	
40	56	460	
45	40	300	
50	28	180	
55	20	100	
60	14	40	
65	10	-	

^aab 20 % Formamid: Zusatz von 5 mM EDTA zum Waschpuffer, da bereits Spuren zweiwertiger Kationen durch ihre starke Hybridstabilisierung die Stringenz beeinflussen.

Die genaue Festlegung der Hybridisierungsstringenz für jede der neu entwickelten Sonden ist in Formamidreihen vorgenommen worden. Die optimale Stringenz ist bei den Bedingungen erreicht, bei denen mit Zielorganismen starke Signale erzielt werden und gleichzeitig alle Nicht-Zielorganismen diskriminierbar sind, also keine Signale mehr zeigen.

2.4.2.5 Hybridisierungsprozedur

Der Hybridisierungspuffer wird je nach benötigter Stringenz (Tabelle 2.2) durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Formamid (Merck) modifiziert.

Tabelle 2.2: Hybridisierungspuffer

Formamid	x μ l
5 M NaCl	360 μ l
1 M Tris/HCl	50 μ l
10 % SDS	2 μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 2 ml

Die benötigte Stringenz wird im Waschpuffer durch Variation der NaCl-Konzentration eingestellt. Die NaCl-Konzentration ergibt sich entsprechend nach Tabelle 2.3.

Tabelle 2.3: Waschpuffer

5 M NaCl	x ml
1 M Tris/HCl	1 ml
10 % SDS	50 μ l
H ₂ O _{bidest}	ad 50 ml

Von den fixierten Zellsuspensionen werden eine 8 μ l Probe auf die Aussparungen der beschichteten Objektträger pipettiert, bei 46 °C getrocknet und in H₂O_{bidest} gewaschen.

Auf die getrockneten Objektträger werden auf jedes Feld 8 μ l Hybridisierungspuffer und je 1 μ l des markierten Oligonukleotids (Konz. 30 - 50 ng/ μ l) zupipettiert und, ohne die fixierten Zellen vom Objektträger abzulösen, vermischt. Kompetitorsonden werden im Verhältnis 1:1 zum fluoreszenzmarkierten Oligonukleotid eingesetzt. Anschließend werden die Objektträger in ein 50 ml Probengefäß (Laborhandel), das mit 2 ml Hybridisierungspuffer befeuchteten Zellstoff ausgelegt ist, überführt und verschlossen. Die Objektträger werden anschließend 2 h bei 46 °C in horizontaler Lage inkubiert. Anschließend werden die Objektträger sofort mit etwas 48 °C warmen Waschpuffer abgespült und in ein mit Waschpuffer gleicher Temperatur gefülltes Probengefäß überführt. Nach einem 20minütigen Waschschrift bei 48 °C werden die Objektträger entnommen, vorsichtig mit H₂O_{bidest} gespült und im Dunkeln luftgetrocknet.

2.4.2.6 Verwendete Oligonukleotide

Sonde	Zielorganismen	rRNA, Bin- dungsstelle ^a	Stringenz	Referenz
EUB338	<i>Bacteria</i>	16S, 338-355	20 %	[AMANN et al. 1990]
NON338	Komplementärsonde zu EUB338	16S, 338-355	20 %	[MANZ et al. 1992]
HGC69a	Grampositive Bakterien mit hohem G+C Gehalt der DNA	23S, 1901-1918	20 %	[ROLLER et al. 1994]
LGCa+b+c	Grampositive Bakterien mit niedrigen G+C Gehalt der DNA	16S, 354-371	35 %	[MEIER et al. 1999]
ALF968	α -Subklasse der <i>Proteobacteria</i>	16S, 968-985	20 %	[NEEF 1997]
BET42a	β -Subklasse der <i>Proteobacteria</i>	23S, 1027-1043	35 %	[MANZ et al. 1992]
GAM42a	γ -Subklasse der <i>Proteobacteria</i>	23S, 1027-1043	35 %	[MANZ et al. 1992]
CF319a	Cytophaga-Flavobacterium-Gruppe	16S, 319-336	35 %	[MANZ et al. 1996]
XAN818	Bakterien der Gattung <i>Xanthomonas</i>	16S, 818-835	10 %	[FRIEDRICH et al. 1999]
RHO576	Bakterien der Gattung <i>Rhodococcus</i>	16S, 576-593	0 %	diese Studie
CHR1255	Bakterien der Gattung <i>Chryseobacterium</i>	16S, 1255-1272	10 %	diese Studie
MIC845	Bakterien der Gattung <i>Microbacteriaceae</i>	16S, 845-863	10 %	diese Studie
CLA65	<i>Clavibacter xyli</i>	16S, 65-82	10 %	diese Studie

^aPosition bezogen auf die E.coli Sequenz nach Brosius [BROSIUS et al. 1981]

2.4.2.7 Bestimmung relativer Populationsanteile durch Kombination von Einzelzellhybridisierung mit DAPI-Färbung

Zur Bestimmung des Anteils der mit spezifischen Sonden erfaßten Populationen im Verhältnis zur Gesamtzellzahl wird im Anschluß an die Hybridisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI nachgefärbt.

Dazu wird nach dem Trocknen der Objektträger 10 µl der DAPI-Lösung (5 µg/ml) pipettiert und 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wird der Objektträger mit H₂O_{bidest} gespült und erneut im Dunkeln luftgetrocknet.

2.4.2.8 Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch Epifluoreszenz

Die Objektfelder der Objektträger werden vor der mikroskopischen Auswertung zur Verzögerung von Ausbleicheffekten der Fluoreszenzfarbstoffe in Vectashield (Vector, Burlingame) eingebettet.

Die mikroskopische Auswertung erfolgt unter dem Mikroskop Leitz DM-RBE. Dabei werden PL Fluotar und N Plan Objektive mit 40- und 100-facher Vergrößerung eingesetzt. Die Kenndaten der verwendeten Filtersysteme sind in der Tabelle 2.4 aufgeführt. Die Dokumentation erfolgt photo-

Tabelle 2.4: Filtersysteme für die FISH/DAPI-Färbung

Filtersystem	Anregungsfilter	Farbteiler [nm]	Emissionsfilter	Verwendung
A,L	BP 340-380	RKP 400	LP 425	DAPI
Y3, L	BP 535/50	RKP 565	BP 610/75	Cy3

graphisch mit Hilfe einer automatischen Kamera. Als Filmmaterial werden Agfa Vista 400 ASA Filme verwendet.

2.5 Bestimmung thermodynamischer und kinetischer Parameter

Für das Biofilmmodel ist die Kenntnis der thermodynamischen und kinetischen Parameter von erheblicher Bedeutung. Die mathematische Modellierung berücksichtigt die Transportvorgänge der Substrate im Biobeech und die sich anschließende Reaktion. Dabei wird die Matrix des Biofilms als wässriges System angenommen. Der Biofilm besteht aus Mikroorganismen,

ihren extrazellulären polymeren Substanzen (EPS) und eingeschlossenen Partikeln, wobei die EPS mit 60 bis zu 90 % den Hauptteil der organischen Substanzen bilden kann [FLEMMING 1991].

Um zu prüfen inwieweit es zulässig ist, den Biofilm als rein wässriges System zu betrachten, sind in dieser Studie der Verteilungs- sowie der Diffusionskoeffizient von Styrol in EPS bestimmt worden.

Die Ermittlung der kinetischen Parameter erfolgte mittels Messungen der Abbaugeschwindigkeit des Styrols und der Sauerstoffzehrung zum Einen aus einer Suspension des Biofiltermaterials und zum Anderen direkt aus der Gasphase.

2.5.1 Extraktion der EPS

Für die Extraktion der EPS werden Biofilterproben in Ringersreagens (1:2; v/v) suspendiert. Die Suspension wird vorsichtig vom Trägermaterial getrennt und in sterile 0.14 M NaCl (1:16; v/v) aufgenommen. Diese Suspension wird 30 Minuten bei RT auf einem Magnetrührer kräftig gerührt.

Das extrazelluläre Material wird von den Bakterien durch Zentrifugation bei 10000 U/min bei 10 °C über 2 Stunden entfernt. Die Trennung über Hochgeschwindigkeitszentrifugation stellt eine gute physikalische Methode dar, die oft für die Separation von löslicher EPS von Bakterienzellen aus Reinkulturen genutzt wird [NIELSEN und JAHN 1999]. Nach der Zentrifugation werden restliche Mikroorganismen mittels Filtration des Überstandes durch Zellulose-Acetat-Filter (Millipore, Porendurchmesser 0.2 µm) entfernt. Das klare Filtrat repräsentierte eine sterile Lösung von niedrig-molekularen extrazellulären Substanzen. Die EPS wird mittels Rotationsverdampfer eingeengt und anschließend gefriergetrocknet.

2.5.2 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten

Die Bestimmung des Verteilungskoeffizienten von Styrol zwischen den Phasen des Stoffsystems, Gas und EPS, erfolgt unter der Annahme, dass es sich bei der EPS um ein homogenes, einphasiges System handelt. Die unter Gleichgewichtsbedingungen resultierenden Konzentrationsverhältnisse zwischen den Phasen werden durch den folgenden Verteilungskoeffizienten beschrieben:

$$H_{\text{Styrol, Gas, EPS}} = \frac{c_{\text{Styrol, Gas}}}{c_{\text{Styrol, EPS}}} \quad (2.2)$$

Die experimentelle Bestimmung des Verteilungskoeffizienten erfolgt mittels Headspace-Gaschromatographie. Es wird ein Gaschromatograph (Autosystem, Perkin Elmer, HS 40 Probensampler) mit einer Kapillarsäule (Crossbond Rtx-5, Restek, Phase: Diphenyl-dimethyl-polysiloxane, 60 m x 0.32 mm) verwendet. Aus der konstanten Gasphasenkonzentration sowie der dazu korrespondierenden EPS-Phasenkonzentration läßt sich der unter den Versuchsbedingungen gültige Verteilungskoeffizient berechnen.

$$c_{\text{Styrol, Gas}} = \frac{n_{\text{Styrol, Gas}}}{V_{\text{Gas}}} \quad (2.3)$$

$$c_{\text{Styrol, EPS}} = \frac{n_{\text{Styrol}_{\text{zugegeben}}, \text{Gas}} - n_{\text{Styrol, Gas}}}{V_{\text{EPS}}} \quad (2.4)$$

Dazu werden 22 ml Headspacegläschen je mit 2 ml einer 2 %igen EPS-Lösung bestückt und fest verschlossen. Anschließend werden in die einzelnen Gläschen 0.2, 0.4, 0.6 und 0.8 μl Styrol (Sigma) durch das Septum in die Gasphase zudosiert und diese im Schüttelinkubator bei 25 °C und 120 U/min 24 Stunden lang inkubiert.

Für die Beurteilung der experimentellen Sicherheit wird der gleich Versuch mit dem System Styrol/Gas/Wasser durchgeführt.

2.5.3 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten

Die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Styrol in EPS erfolgt nach der von Stejskal und Tanner [TANNER und STEJSKAL 1995] etablierten Methode der Spin Diffusion Messung durch das resultierende Spin-Echo in der Anwesenheit eines zeitabhängigen Gradientenfeldes. Demnach läßt sich der Diffusionskoeffizient aus der Echo-Amplitude nach folgender Gleichung ermitteln:

$$S(g)/S(0) = \exp[-\gamma^2 g^2 \delta^2 D(\Delta - \delta/3)] \quad (2.5)$$

Mit Die Messungen werden an der Universität Freiburg/Abteilung Makro-

$S(g)/S(0)$ = Intensitätsverhältnis der Amplituden

γ = gyromagnetisches Verhältnis

g = Gradientenstärke

δ = Länge des Gradientenpulses

Δ = Diffusionszeit

D = Diffusionskoeffizient

molekulare Chemie an dem NMR 500Mhz Avace (Bruker) mit einer 2 %igen EPS-Lösung in 99,96 % Deuteriumoxid (Merk) bei 25 °C durchgeführt. Die

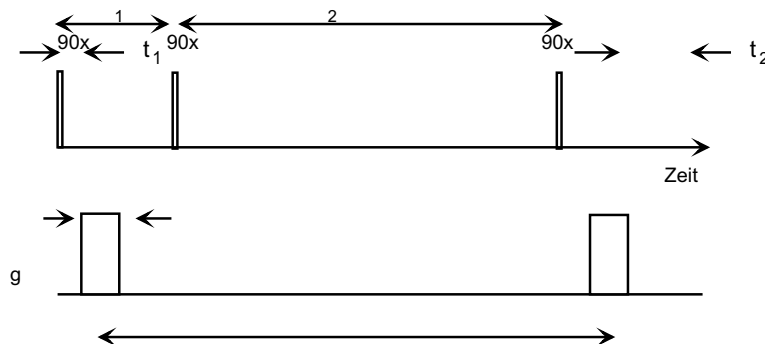


Abbildung 2.2: Stimuliertes Echo Methode des pulsed gradient spin echo (PGSE)

Diffusionszeit zwischen den beiden Gradientenimpulsen δ beträgt 7.5 ms und das gyromagnetische Verhältnis der Protonen $\gamma = 26751.5255 \text{ Hz/G}$. Dabei wird die Methode des Stimulierten Echos angewendet (Abbildung 2.2). Dies bringt den Vorteil, dass durch die Anwendung dreier 90° Impulse die Diffusionszeit Δ erhöht werden kann und somit eine Auslöschung der relative geringen t_2 -Zeit vermieden wird.

2.5.4 Sauerstoff- und Styrolverbrauchsmessungen

Die Untersuchungen zum Sauerstoff- und Styrolverbrauch durch die Biozönose erfolgen zum Einen in der Gasphase des Systems styrolbeladene Luft/ biofilmbelegte Pellets und zum Anderen in mit Styrol und Luft angereicherter wässriger Phase, in welcher biofilmtragende Biofilterpellets suspendiert sind.

Die Messungen der Sauerstoffzehrung werden jeweils mit einem faseroptischen Sauerstoffsensor-System (MOPS, COMTE, Hannover) durchgeführt. Das Meßprinzip dieses Sauerstoffsensors beruht auf der Messung der Fluoreszenzintensitätsänderung des metallorganischen Farbstoffs Tris(2,2Bipyridin)-ruthenium(II)-chlorid (RuBPY). Der Farbstoff ist in Silikon immobilisiert und am Ende einer Single-Glasfaser mit einem Kerndurchmesser von 600 μm aufgebracht. Durch eine blaue Leuchtdiode (LED) wird der Farbstoff zur Fluoreszenz angeregt und die resultierende Fluoreszenzintensität von einem Miniaturphotodetektor erfaßt. Das Fluoreszenz-Quenching ist proportional zur Sauerstoffkonzentration.

Der faseroptische Sensortyp hat gegenüber den herkömmlichen amperometrischen Sensoren folgende Vorteile:

- universell einsetzbar zur Sauerstoffmessung in flüssiger wie in gasförmiger Phase
- kein Verbrauch von Sauerstoff während der Messung
- strömungsunabhängige Messung
- keine Beeinflussung des Probenmaterials und geringste Querempfindlichkeit
- hohe Sensitivität bei geringen Sauerstoffkonzentrationen
- Sauerstoffmessungen in diffusionslimitierten Bereichen
- keine Störanfälligkeit gegenüber elektrischen oder magnetischen Feldern

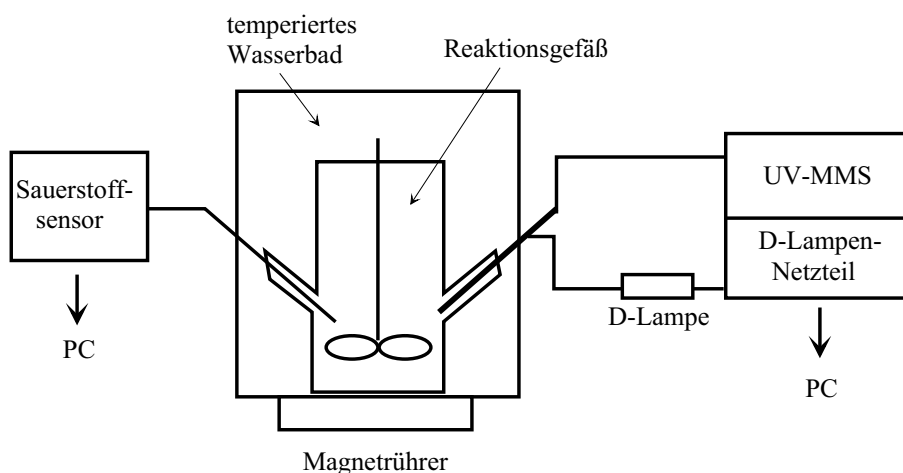


Abbildung 2.3: Schematische Darstellung des Aufbaus der Messapparatur

Für die Messungen zum Styrolverbrauch wird ein monolithisches Miniatur-Spektrometer MMS UV-VIS (Zeiss) mit einer 1 cm Tauchküvette (HELLMA) und entsprechender 14-Bit Steuerungselektronik (tec5) verwendet.

Die Messungen werden in einem 1 Liter Reaktionsgefäß mit zwei seitlichen Stutzen für die Messsonden durchgeführt, indem sich ein von oben eingebrachter Propellerrührer befindet, der über einen Magnetrührer angetrieben wird (Abbildung 2.3). Auf diese Weise kann eine ausreichende Durchmischung der Suspension, als auch der Gasphase gewährleistet werden.

Um für die Messungen der Styrolabnahme und Sauerstoffzehrung aus dem Gasraum eine ausreichende Gasdichtigkeit sicher zu stellen, wird die Versuchsanordnung während dieser Messungen zusätzlich vollständig in ein auf 25 °C temperiertes Wasserbad getaucht. Die Messapparatur wird als gasdicht bezeichnet, wenn eine zuvor mit Stickstoff reduzierte Sauerstoffatmosphäre über 20 Stunden konstant bleibt.

Die Messungen werden zunächst an Proben aus einem Biofilter durchgeführt, der mit dem Stamm *Pseudomonas citronellolis* inokuliert wurde. Nach einer zwölfwöchigen Betriebszeit wurde über ein Ausstrich des Biofiltermaterials sowie über die Hybridisierung mit ALF968, der für die α -Subklasse der *Proteobacteria* spezifischen Sonde, die Anwesenheit des Stammes überprüft, um sicherzustellen, dass es sich weiterhin um einen Biofilter mit einer Reinkultur handelt. Die Abbauleistung des einsegmetigen Biofilters beträgt 67 %, die Biotrockenmasse 1.96 % und die Lebendzellzahl bezogen auf DAPI 82 %.

Es war zunächst angedacht die Bestimmung der Sauerstoffzehrung und der Styrolabnahme an Proben aus dem dreifach segmentierten Biofilter vorzunehmen, wenn sich die Biozoonose in einem stationären Zustand befindet. Die chemotaxonomischen und molekularbiologischen Methoden zeigen jedoch, dass die mikrobiologische Gemeinschaft einer ständigen Wandlung unterliegt. Deshalb werden die Messungen nach 900 Betriebstagen begonnen.

Für die Messungen in der Suspension wird die Messapparatur mit einer auf 25 °C temperierten Ringersreagenz-Lösung befüllt und ca. 10 Minuten styrolgesättigte Luft eingeleitet. Anschließend wird ein aliquoter Teil des Biofiltermaterials dazugegeben, die Aparatur sofort blasenfrei verschlossen und die Messung gestartet.

Für die Messungen aus dem Gasraum wird die Messapparatur ca. 10 Minuten mit styrolgesättigte Luft gespült. Dann wird gerade soviel Biofiltermaterial in das Reaktionsgefäß eingebracht, dass sich auf dem Boden lediglich eine Schicht mit Biofilm bewachsene Glaskugeln befindet, das Gefäß verschlossen und die Messung gestartet.

Die mathematische Auswertung der gemessenen Verbrauchskurven erfolgt von D. Bothe Universität Paderborn/Fakultät für Naturwissenschaften mit dem Softwareprogramm Mathematika.

Kapitel 3

Ergebnisse und Diskussion

3.1 Abbauleistung des Versuchsbiofilter

Um die Inokulationsphase zu verringern werden als Inokulum die Stämme *Pseudomonas* D21 und *Rhodococcus* D1, die unter Laborbedingungen ein hohes Abbaupotenzial zeigen, eingesetzt. Doch während der Inokulationsphase kommt es zu mehreren Einbrüchen in der Abbauleistung, die zum Teil trotz zusätzlicher Befeuchtung irreversibel sind und nur durch erneutes Animpfen kurzzeitig behoben werden können. Nach einer 100tägigen Betriebszeit scheint der Biofilter sich soweit stabilisiert zuhaben, dass weitere Inokulationsmassnahmen nicht mehr erforderlich sind. Die Abbauleistung der Laborbiofilteranlage ist nach einer 200tägigen Betriebszeit mit 99 % nahezu vollständig. In der Abbildung 3.1 ist der Wirkungsgrad des Laborbiofilters über den gesamten Betriebszeitraum dargestellt. Wird nur der Wirkungsgrad gemessen am Ein- und Ausgang betrachtet (Abbildung 3.1a), so seint der Versuchsbiofiter nach 200 Betriebstagen in einem stabilen und stationären Zustand zu sein. Die Darstellung des Wirkungsgrades (Abbildung 3.1b) unter Berücksichtigung der Abbauleistung nach den einzelnen Segmenten zeigt, dass der Abbau von Styrol im Biofilter nicht homogen verläuft. Besonders im ersten (unteren) Segment kommt es immer wieder zu erheblichen Einbrüchen in der Abbauleistung. Diese Einbrüche werden vom zweiten (mittleren) Segment und teilweise auch vom dritten (oberen) Segment aufgefangen, so dass es zu keinen Einbrüchen in der Gesamtabbauleistung kommt. Im Gegensatz zur Inokulationsphase sind diese Einbrüche im ersten Segment reversibel und können duch kräftiges Spülen mit Nährlösung behoben werden. Der Anteil des dritten Segmentes der Biofilteranlage an der Abbauleistung tritt während der Betriebszeit immer mehr zurück und ist nach 648 Tagen, obwohl die Eingangskonzentration von Sty-

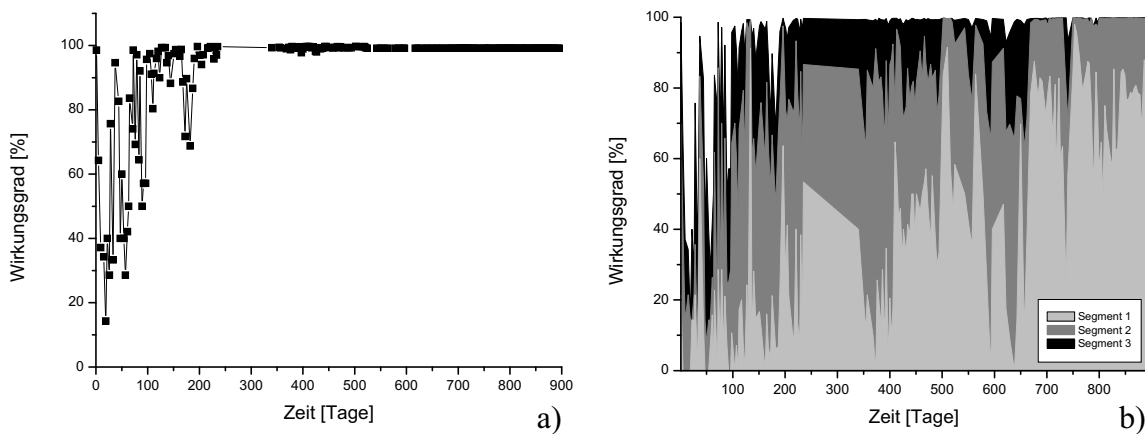


Abbildung 3.1: a) Wirkungsgrad der Laborbiofilteranlage; b) Wirkungsgrad der Laborbiofilteranlage unter Berücksichtigung der Abbauleistung der einzelnen Segmente

rol auf $350 \mu\text{g/l}$ erhöht wird, vollständig verdrängt. Zu diesem Zeitpunkt ist die Abbauleistung im ersten Segment auf ca. 80 % der Gesamtabbauleistung angestiegen. Dadurch steht dem zweiten Segment nur eine Eingangsstyrolkonzentration von ca. $40 - 80 \mu\text{g/l}$ zur Verfügung, so dass auch hier eine Inaktivierung durch zunehmende Substratlimitierung angenommen werden muss.

3.2 Mikrobiologische Untersuchungen

3.2.1 Bestimmung der Biomasse

Die Bestimmung der Biotrockenmassenzunahme in den drei Segmenten des Biofilters (Abbildung 3.2) zeigt, dass im ersten Segment die Biotrockenmassenzunahme nicht kontinuierlich, sondern eher sprunghaft erfolgt. So erfolgt eine Verdoppelung der Biotrockenmasse zwischen der 90 - und 150tägigen sowie nach der 360 - und 780tägigen Betriebszeit des Filters. In der Zeit zwischen der 2. und 4. Analyse erscheint die Biotrockenmasse nahezu konstant.

Für das zweite Segment kann die Biotrockenmasse über den gesamten Betriebszeitraum als konstant angenommen werden.

Im dritten Segment erfolgt dagegen wieder ein leichter Anstieg der prozentualen Biotrockenmasse zwischen 360 und 600 Tagen.

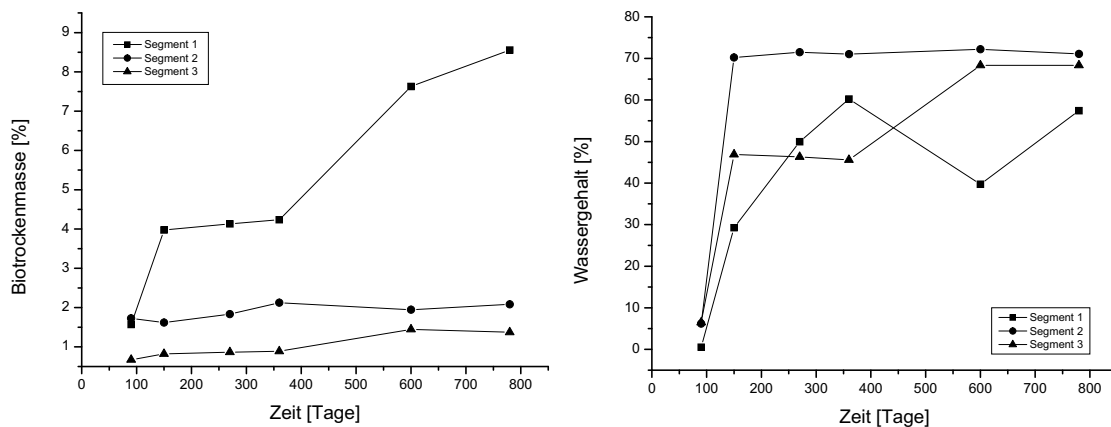


Abbildung 3.2: Biomassen- und Wasserzunahme in den drei Segmenten des Biofilters

Die Biotrockenmasse im ersten Segment ist über den gesamten Betriebszeitraum deutlich höher als in den anderen Segmenten. So ist sie in der ersten Hälfte der Versuchsdauer um das 2.7fache höher als im zweiten Segment und um das 4fache höher als im dritten Segment, in der zweiten Hälfte sogar um das 4fache gegenüber dem zweiten Segment und um das 5.3fache gegenüber dem dritten Segment. In dieser deutlichen Zunahme der Biotrockenmasse im ersten Segment gegenüber den anderen Segmenten liegt die hohe Abbauleistung in diesem Segment, besonders nach 650 Tagen Betriebszeit, begründet.

Die Bestimmung des Wassergehaltes in den drei Segmenten zeigt, dass im ersten Segment der Wassergehalt im Biofilm nur langsam ansteigt und mit 60 % seinen Maximalwert erreicht. Nach 600 Betriebstagen fällt er sogar auf 40 % ab, steigt in diesem Segment jedoch bis zum 780ten Tag wieder auf ca. 60 % an.

Im zweiten Segment erreicht der Wassergehalt dagegen bereits nach der 150tägigen Betriebszeit 70 % der Gesamtbiomasse und kann über den gesamten Versuchszeitraum als konstant angenommen werden.

Im dritten Segment steigt der Wassergehalt des Biofilms zunächst nur auf 45 % und bleibt bis zum 350ten Betriebstag ohne eine weitere Zunahmen. Nach 600 Betriebstagen ist aber auch hier der Wassergehalt auf 68 % angestiegen. Für einen optimalen Betrieb einer Biofilteranlage ist ein Wassergehalt von 40 - 65 % erforderlich [CORSI und SEED 1995]. Ist der Wassergehalt geringer, kommt es zu einer Abnahme in der Abbauleistung [LESON und WINER 1991]. Ist er dagegen zu hoch kann es zur Bildung von

anaeroben Zonen und Clogging kommen [CORSI und SEED 1995]. Auria et al. [AURIA et al. 1998] konnten ebenfalls durch die Überwachung der Befeuchtung hinsichtlich einer Austrocknung oder Verwässerung zeigen, dass der Wassergehalt sich auf die mikrobiologische Aktivität und somit auf die Abbauleistung des Biofilters auswirkt. Die Kontrolle des Wassergehaltes in dieser Studie lässt für das erste Segment vermuten, dass, bedingt durch den geringeren Wassergehalt im Biofilm, die Einbrüche in der Abbauleistung des Biofilters durch eine Austrocknung des Biobeets begründet liegen. In gleicher Weise spricht der konstante Wassergehalt sowie die konstante Bio-trockenmasse für das stabile Abbaupotential im zweiten Segment.

3.2.2 Gesamtzellzahl/Lebendzellzahl-Bestimmung

Die Ergebnisse der Bestimmung der Lebendzellzahl zur Gesamtzellzahl wird in Abbildung 3.3 dargestellt. Zu Beginn zeigt sich das zweite Segment mit einer Lebendzahl von 63 % als das stärkste Segment. Dies steht in guter Korrelation zu dem guten Abbaupotential in diesem Segment zu Beginn der Versuchsphase. Nach 250 Tagen wird in allen drei Segmenten ein deutlicher Verlust an lebenden Zellen beobachtet. Doch nach 350 Tagen Betriebszeit ist der Anteil an lebenden Zellen in allen drei Segmenten wieder deutlich angestiegen (65 % Segment 1, 82 % Segment 2 und 45 % Segment 3). Während nach 600 Tagen im ersten und dritten Segment die Zahl der lebenden Zellen noch weiter ansteigt, fällt im zweiten Segment die Lebendzellzahl um 28 % und nach 800 Tagen um weitere 25 %. Nach der 800tägigen Betriebszeit geht auch der Anteil der lebenden Zellen im dritten Segment deutlich zurück. Dies steht ebenfalls in guter Korrelation zu der abnehmenden Abbaupotential im zweiten und dritten Segment zum Ende der Versuchsphase.

Über die Bestimmung des Lebendanteils über eine Färbung mit CTC und DAPI an Proben aus Biofilteranlagen liegen zur Zeit keine weiteren Untersuchungen vor. Durch Untersuchungen mittels Mikroelektroden [BARGEL 1998] können Aussagen über die Dicke des aktiven Biofilms gemacht werden. Dennoch besteht für diese Untersuchungen weiterhin die hypothetische Annahme, dass der Anteil lebender Zellen in diesem aktiven Biofilm 100 % ausmacht. Die Begutachtung der in dieser Studie angefertigten Bilder lässt jedoch nicht den Schluß zu, dass der obere Teil des abgelösten Biofilms ausschließlich aus lebenden Zellen besteht. Vielmehr scheint es sich dabei um Cluster aus lebenden Zellen zu handeln, die von toten Zellen umgeben sind. Dennoch muss auch hier eingewendet werden, dass es sich, bedingt durch die Aufarbeitung der Proben für die Färbung,

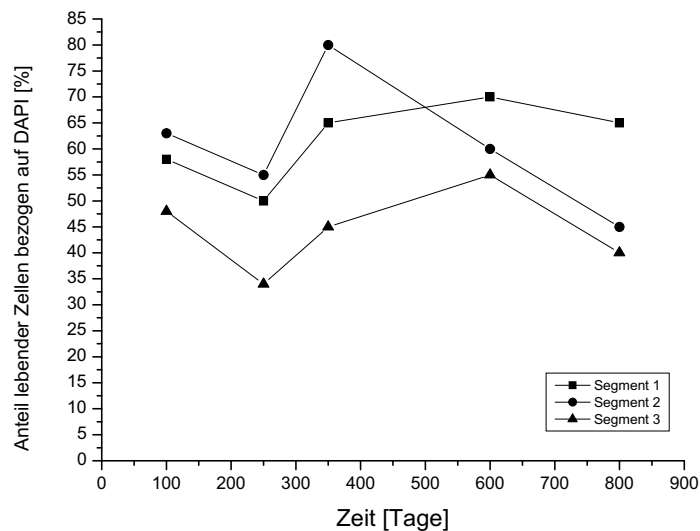


Abbildung 3.3: Anteil der lebenden Zellen bezogen auf DAPI

nur um Artefakte handelt, die nicht die tatsächlichen Verhältnisse im Biofilter widerspiegeln können. Dennoch lässt sich zeigen, dass bei einer gravimetrischen Bestimmung des Biomassenanteils davon ausgegangen werden kann, dass nur ca. 50 - 70 % der Biomasse aus aktiven Zellen besteht.

Auch lässt sich deutlich erkennen, dass sich bei Substratmangel ein Aktivitätsverlust bzw. Absterben der Mikroorganismen nicht unmittelbar einstellt. Dies kann bedingt sein durch einen zunehmenden Kanibalismus innerhalb des Biofilms oder einer Verringerung der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen. Bei einer Verringerung der Stoffwechselaktivität, ist eine Reaktivierung der entsprechenden Biofilterabschnitte durch eine Erhöhung des Substratangebots denkbar. Dies steht in Einklang mit der im Kapitel 3.1 beschriebenen Beobachtung, dass bei einem Einbruch der Abbauleistung im ersten Segment, die Biologie im zweiten Segment unmittelbar in der Lage ist, das erhöhte Substratangebot zu verstoffwechseln.

3.2.3 Isolierung der Reinkulturen

Vom Malz-Agar werden die Kulturen PB 1, PB 2, PB 3 und PB 4 isoliert. PB 3 erweist sich im folgenden als Mischkultur, so dass von dieser Kultur eine weitere Isolierung der Stämme PB 3.1, PB 3.2 und PB 3.3 vom Trypticase-Soja-Agar erfolgt.

Vom Trypticase-Soja-Agar werden die Stämme PB 5, PB 6, PB 7, PB 8,

PB 9, PB 10 und PB 11 isoliert. Auch hier erweisen sich die Kulturen PB 5, PB 10 und PB 11 als Mischkulturen, so dass eine weitere Isolierung zu den Stämmen PB 5.1, PB 5.2, PB 10.1, PB 10.2, PB 11.1 und PB 11.2 führt.

Weder auf dem Malz-Agar noch auf dem Trypticase-Soja-Agar können die typisch rotgefärbten Kolonien des Stammes *Rhodococcus* D1 und die gelben Kolonien des Stammes *Pseudomonas* D21 beobachtet werden. Dies deutet darauf hin, dass sich diese beiden Stämme im Betriebsverlauf nicht gegen, die von dem Wasser und der Luft eingetragenen Keime im sich ausbildenden Biofilm auf den Trägermaterial des Versuchsbiofilter durchsetzen konnten.

Die chemotaxonomische Charakterisierung dieser Stämme wird im Kapitel 3.3.1 sowie die Identifizierung mittels Sequenzierung der Stämmen PB 1, PB 2, PB 3.3, PB 4 wird im Kapitel 3.4.1 beschrieben.

3.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

3.3.1 Fettsäureprofile der Isolate

In der Tabelle 3.1 sind die Fettsäureprofile der 16 Isolate sowie die der zur Inokulation verwendeten Stämme *Rhodococcus* D1 und *Pseudomonas* D21 aufgeführt. Der direkte Vergleich der Profile untereinander zeigt, dass sich weder *Rhodococcus* D1 noch *Pseudomonas* D21 im Folgenden isolieren liessen.

Die 16 verschiedenen Stämme zeigen alle Wachstum unter Styrolatmosphäre und können somit als Styrolabbauer charakterisiert werden. Die Verifizierung der Fettsäureprofile der 16 Stämme zeigt, dass fünf den *Corynebacteriaceae*, zwei den *Pedobacter*, einer den *Paenibacillus*, vier den *Microbacteriaceae*, drei der *Xanthomonadaceae* und einer der *Bacillus cereus*-Gruppe zugeordnet werden können.

Für die Zuordnung der verschiedenen Stämme in eine Gruppe dienen die sogenannten Biomarkerfettsäuren, auf diese Weise ist es möglich in Umweltproben Aussagen über das Auftreten dieser Gruppen in der Probe zu machen. Diese sind für den Stamm *Rhodococcus* D1 die Tuberculosestearinsäure (18:0 10methyl), cis-10-Hexadecensäure (16:1 cis10) und die Ölsäure (18:1 cis9). Im Gegensatz dazu verfügt *Pseudomonas* D21 über die Biomarkerfettsäuren die cyclischen Fettsäure 17:0 cyclo9-10 und 19:0 cyclo11-12, sowie die ungesättigte Fettsäure 18:1 cis11, die zu der Hauptfettsäure der meisten Proteobakterien gehört. Für die *Corynebacteriaceae* sind es ebenfalls die Tuberkulosestearinsäure und cis-10-Hexadecensäure, die

Tabelle 3.1: Fettsäuremuster der Isolate

[illegible]

Tabelle 3.2: Charakteristische Fettsäuren der isolierten Stämme

Fettsäure	genetische Zuordnung	Zuordnung	Isolat
18:010methyl, 16:1cis10, 18:1cis9	Aktinomyceten		<i>Rhodococcus</i> D 1
17:0cyclo9-10, 19:0cyclo11-12	β -Proteobacteria		<i>Pseudomonas</i> D 21
18:010methyl, 16:1cis10	<i>Corynebacteriaceae</i>		PB 1, PB 3.2, PB 3.3, PB 10.1, PB 10.2
17:1isocis9	<i>Pedobacter</i> , <i>Flavobacterium</i> - <i>Cytophaga</i>		PB 2, PB 5.1
15:0anteiso, 17:0anteiso	<i>Microbacteriaceae</i>		PB 4, PB 6, PB 8, PB 11.2
15:0anteiso, 17:0anteiso, 16:1cis/trans5	<i>Paenibacillus</i>		PB 3.1
11:0iso3OH, 14:0iso	<i>Xanthomonadaceae</i>		PB 5.2, PB 9, PB 11.1
13:0iso, 17:1iso5	<i>Bacillus cereus</i> -Zweig		PB 7

eine Biomarkerfettsäure vieler Aktinomyceten darstellt, zu denen sowohl die *Rhodococci* als auch die *Cornebakterien* gehören. Für die *Pedobacter* (*Flavobacterium-Cytophaga*-Zweig) gilt die 17:1 iso cis9 als Markerlipid. Die Biomarkerfettsäuren der Familie der *Microbacteriaceae* sind die verzweigten Fettsäuren 15:0 anteiso und 17:0 anteiso. Diese Fettsäuren kommen auch in hohem Anteil in dem zum Genus *Paenibacillus* zugeordneten Isolat PB 3.1 vor. Jedoch fehlt den *Microbacteriaceae* im Gegensatz zu den *Paenibacillus* die charakteristische Fettsäure 16:1 cis/trans5. Zur Gruppe der *Xanthomonadaceae* gehören die Biomarkerfettsäuren 11:0 iso3OH und 14:0 iso. Das Isolat aus der *Bacillus cereus*-Gruppe hat die charakteristischen Fettsäuren iso-Tridecansäure (13:0 iso) und iso-5-Heptadecensäure (17:1 iso5). In Tabelle 3.2 sind die isolierten Bakterien mit den charakteristischen Fettsäuren aufgelistet.

3.3.2 Fettsäureprofile der Biofilterproben

Ziel dieser Untersuchungen ist es, Hinweise auf die dominanten und styrolabbauenden Bakteriengruppen zu finden. Die Auswertung basiert auf Grundlage der Biomarkerfettsäuren, die sich in den Fettsäureprofilen der Biofilterproben zeigen. Änderungen in der Populationsstruktur sollten sich in der Änderung der Fettsäureprofile der Biofilterproben widerspiegeln. Die quantitative Häufigkeit der Stämme im Filtermaterial kann anhand der charakteristischen Fettsäuren festgelegt werden.

Die Fettsäureprofile (Abbildung 3.4) aus den drei Segmenten des Versuchsbiofilters zeigen, dass die Kolonisation der einzelnen Segmente nicht homogen ist. Insgesamt wurden 32 Fettsäuren detektiert. Diese 32 Fettsäuren sind zu keiner Zeit und in keinem Segment vollständig vorhanden.

Einige Fettsäuren wie 17:1 cis11 (S2.117), 16:1 iso (S3.425) und 16:0 iso2OH (S3.196) werden nur einmal detektiert. Die Fettsäure 16:1 cis7 (S1.117, S2.117) befindet sich nur in der ersten Probe aus dem ersten und zweiten Segment und die Fettsäure 16:1 trans9 (S1.425, S1.730) nur im ersten Segment, jeweils nach 425 und 730 Tagen.

Während die Gesamtzahl der Fettsäuren nach 117 Tagen im ersten Segment noch 26, im zweiten Segment 25 und im dritten Segment 26 beträgt, so sind es nach 730 Tagen im ersten noch 20, im zweiten Segment 22 und im dritten Segment 19 Fettsäuren. Zu den Fettsäuren, die nur zu Beginn der Analyse detektiert werden, gehören hauptsächlich die ungesättigten Fettsäuren 16:1 cis10, 17:1 cis9 und 19:1 cis11 sowie die gesättigte Fettsäure 17:0 und die verzweigtkettige Fettsäure 17:0 10methyl. Nach Frostegrad et al. [FROSTEGRAD et al. 1993] finden sich einfach ungesättigte, verzweigte wie auch cyclische und Hydroxy-Fettsäuren vor allem in gramnegativen Bakterien. Die Fettsäure 16:1 cis10 kommt zu hohen Teilen in den Isolaten PB 1, PB 3.2, PB 3.3, PB 10.1 und PB 10.2 vor.

Auffällig ist das hohe Aufkommen der Fettsäure 16:1 cis11 im zweiten Segment nach 196 und 425 Tagen mit 20 - 25 %. Bekannte Mikroorganismen mit entsprechend hohen Anteilen dieser Fettsäure sind Vertreter der Familie *Methylococcaceae* [BOWMAN et al. 1993], sowie bei der Gattung *Nitrospira* [LIPSKI et al. 2001] aus der Klasse der *gamma-Proteobacteria* und einige *delta-Proteobacteria* [SASS et al. 2002]. Von diesen Vertretern ist jedoch keiner als Styrolabbauer bekannt, so dass ein Auftreten dieser Mikroorganismen im Biofilm eher unwahrscheinlich ist.

In der Abbildung 3.5 sind signifikante Fettsäuren einzelner Bakteriengruppen aus den verschiedenen Biofilterproben über den Betriebszeitraum

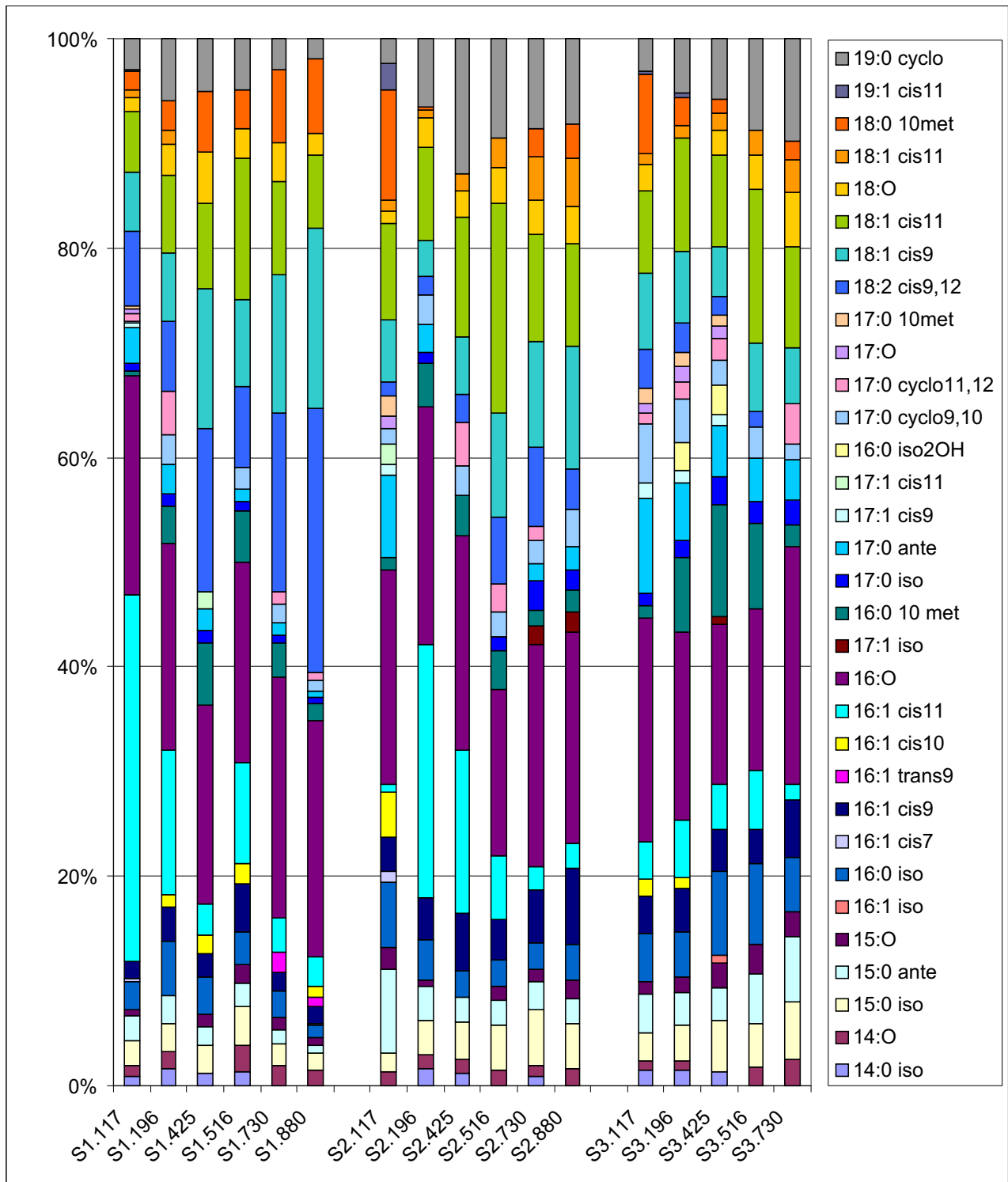


Abbildung 3.4: Vergleichende Darstellung der Gesamtfettsäurenanalyse aus den drei Segmenten des Biofilters nach 117, 196, 425, 516, 730 und 880 Tagen

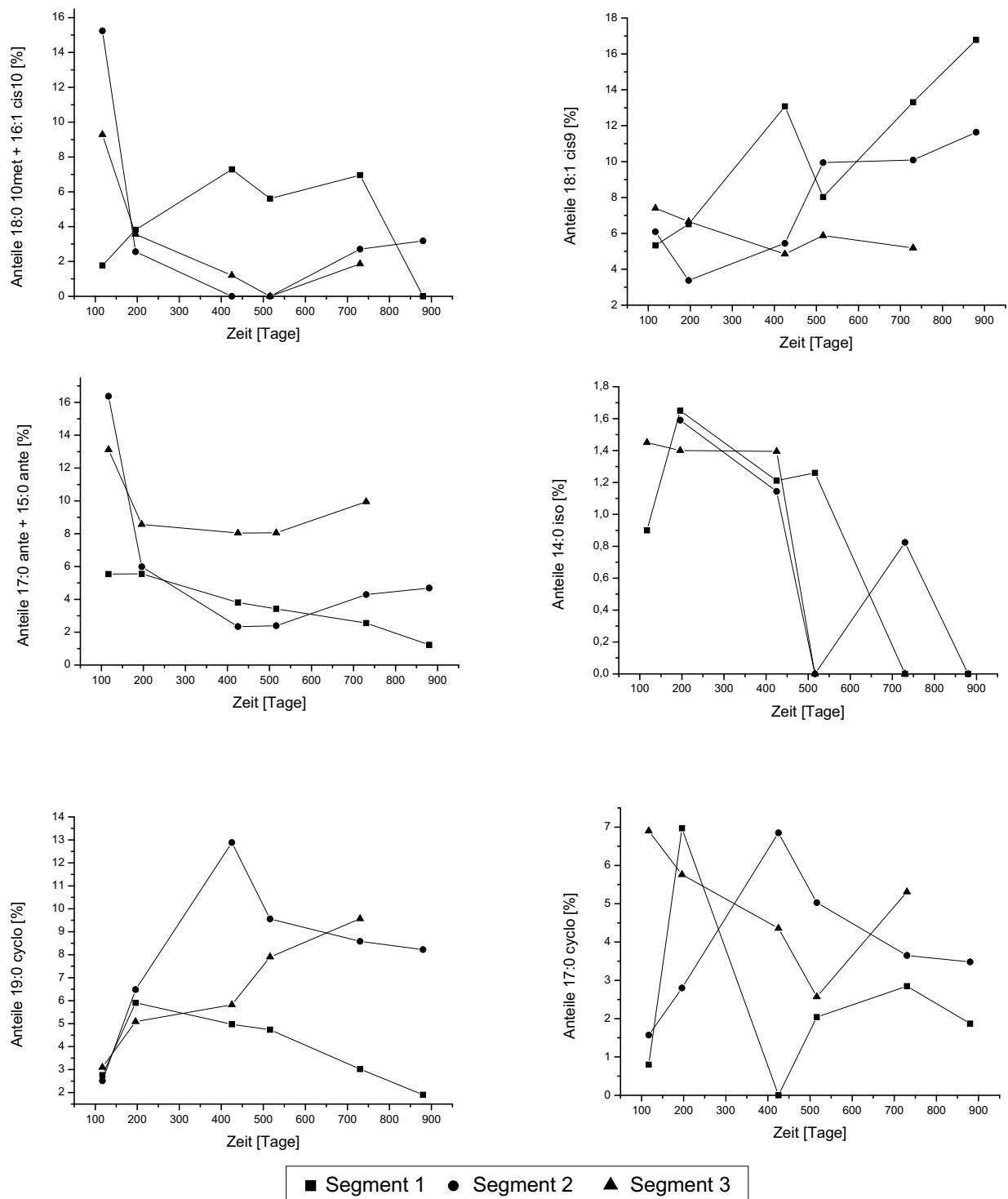


Abbildung 3.5: Signifikante Fettsäuregruppen für verschiedene Bakterien-
gruppen in den drei Segmenten des Biofilters

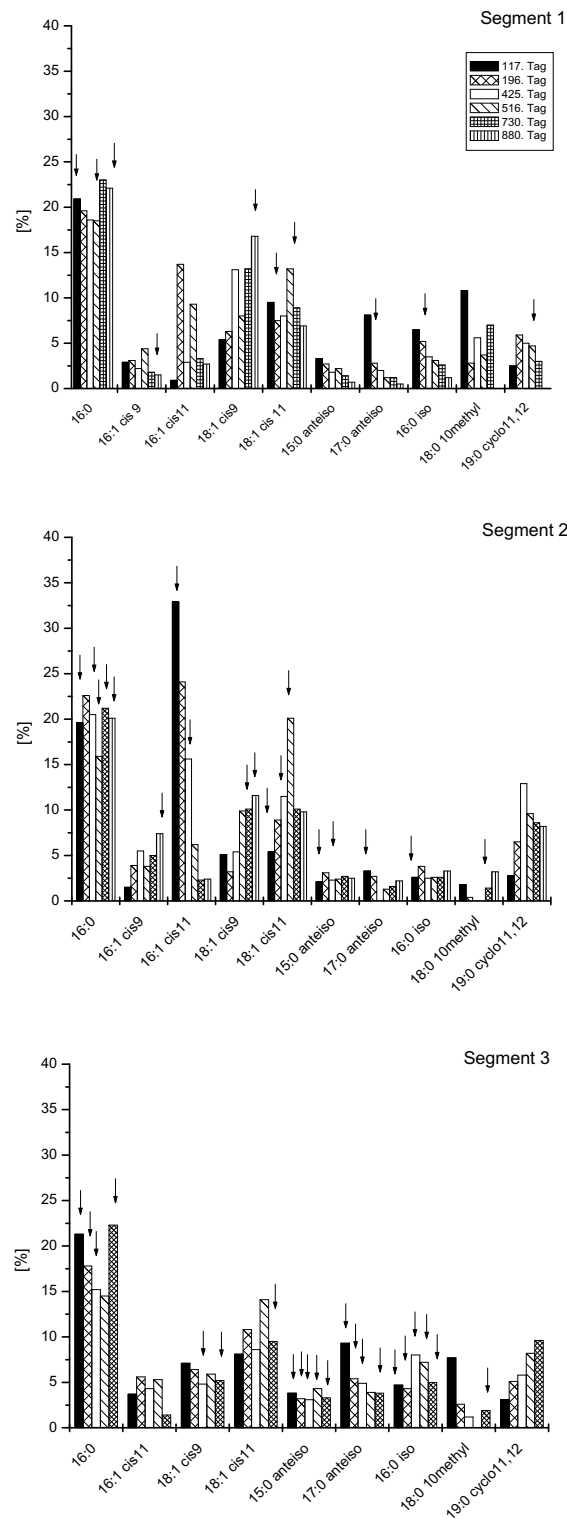


Abbildung 3.6: Deuteriummarkierte Fettsäuren aus den drei Segmenten des Biofilters nach 117, 196, 425, 516, 730 und 880 Tagen

dargestellt. Aufgrund der hohen Anteile dieser Fettsäuren im Gesamtfettsäuremuster kann davon ausgegangen werden, dass diese Bakteriengruppen zu den dominanten Bakterien in den Proben zählen. Lediglich die Fettsäure 14:0 iso als Markerlipid für die *Xanthomonadaceae* (PB 5.2, PB 9, PB 11.1) kommt mit weniger als 2% nur eine geringe Abundance zu, so dass es sich hier nicht um eine dominante Bakteriengruppe handelt.

Die zusammengefassten Fettsäuren 18:0 10methyl und 16:1 cis 10 dienen als Markerfettsäuren für die Aktinomyceten und die *Corynebacteriaceae* und die verzweigkettige Fettsäure 18:1 cis9 nur für die Aktinomyceten. Die zusammengefassten verzweigkettigen Fettsäuren 15:0 anteiso und 17:0 antiso dienen als Markerfettsäuren für die *Microbacteriaceae*.

Desweiteren gehören die cyclischen Fettsäuren 17:0 cyclo und 19:0 cyclo zu den dominanten Biomarkerfettsäuren. 17:0 cyclo ist eine Markerfettsäure für β - und γ -Proteobakterien und 19:0 cyclo für die α -Proteobakterien. Es wurden jedoch keine Vertreter aus einer dieser Gruppen isoliert.

Die Markerfettsäuren für die Gruppe *Pedobacter*, *Paenibacillus* und des *Bacillus cereus*-Zweigs werden nur vereinzelt oder gar nicht detektiert und somit nicht weiter berücksichtigt.

Die Abbildung 3.5 zeigt deutlich, dass die Besiedlung der einzelnen Segmente mit Mikroorganismen sich sowohl voneinander als auch über die Zeit signifikant unterscheidet. Während im ersten und zweiten Segment die Fettsäure 18:1 cis9 deutlich an Abundance gewinnt ist es im dritten Segment die Fettsäure 19:0 cyclo. Dies zeigt, dass in den ersten beiden Segmenten grampositive Bakterien immer mehr an Dominanz gewinnen, im dritten Segment dagegen gramnegative Bakterien.

Die Markierungsstudie (Abbildung 3.6) zeigt eine Deuteriummarkierung der verzweigkettigen Fettsäuren 15:0 anteiso, 16:0 iso und 17:0 anteiso in allen drei Segmenten. Dies lässt darauf schließen, dass Mikroorganismen mit ähnlichen Fettsäureprofilen wie die Isolate PB4, PB6, PB 8 und PB 11.2 maßgeblich am Abbauprozess des Styrols beteiligt sind.

Die ungesättigte Fettsäure 18:1 cis 11, die in allen α -Proteobakterien vorkommt, nimmt in allen drei Segmenten zunächst zu und geht dann wieder deutlich zurück. Da diese Fettsäure ebenfalls in einigen Proben markiert ist, deutet darauf hin, dass ebenfalls α -Proteobakterien, die nicht isoliert werden konnten, am Abbauprozess maßgeblich beteiligt sind.

Im zweiten Segment ist eine unbekannte Population mit der charakteristischen Fettsäure cis-11-Hexadecensäure (16:1 cis11) zu Beginn der Studie dominant. Auch diese Fettsäure weist in den Proben vom 117ten und 425ten Tag eine Deuteriummarkierung auf.

Auffällig für die Markierungsstudie ist, dass im dritten Segment die höchste Aktivität bezüglich der Deuteriummarkierung zu beobachten ist. In diesem Segment sollte aufgrund der vertikalen Verarmung an Substrat zunächst ein Rückgang an maßgeblichen Styrolabbauer vermutet werden. Da dies nicht der Fall zu sein scheint, lässt, wie schon zuvor die Lebend-/Gesamtzellzahlbestimmungsstudie, darauf schliessen, dass eine Reaktivierung des dritten Segments durch eine zusätzliche Styrolzufuhr denkbar ist.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 16S rDNA-PCR

Die Sequenzierung der ersten ca. 500-700 Basen der 16SrDNA erfolgt in der Universität Osnabrück/Abteilung Spezielle Botanik.

Die Proben PB1, PB2, PB3.3 und PB4 sind vom Sequenzierservice GAG BioScience GmbH (Bremen) sequenziert worden. Dabei ergeben sich als höchste Übereinstimmung bei einem Abgleich mit der bestehenden Datenbank für die Stämme folgende Mikroorganismen:

PB1 *Rhodococcus erythropolis*

PB2 *Chryseobacterium indologenes*

PB3.3 *Nocardioides simplex*

PB4 *Clavibacter xyli*

3.4.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

3.4.2.1 Entwicklung der klassen- und isolatspezifischen Sonden

Die Entwicklung der Sonden CLA65, CHR1255 und RHO576 wird anhand der der Totalsequenzierung der 16S-rRNA der Biofilterisolate durchgeführt. Dafür werden die ermittelten Sequenzen in den Sequenz Editor des ARB-Programms eingelesen. Die eingegebenen Sequenzdaten werden in die entsprechende rDNA-Sequenz konvergiert und zur phylogenetischen Zuordnung der Isolate in den bereits vorhandenen Stammbaum (arb tree) eingezeichnet. Die Entwicklung der Sonde MIC845 erfolgt mit Hilfe der search und query Funktion.

Zur Konstruktion der Oligonukleotidsonden werden die in der Datenbank enthaltenen Sequenzen mit Hilfe der probe design Funktion des ARB berechnet. Es wird eine Länge der Sonden von 18 Basen und ein GC-Gehalt mit

50-100 % vorgegeben. Um die Spezifität der Sonden zu erhöhen und eine selektive Hybridbildung mit der Zielsequenz zu gewährleisten, wird die Anzahl der erlaubten Basenfehlpaarungen auf 0 festgelegt. Die als Ergebnis der Suche ausgegebenen Oligonukleotide wurden gegen alle in der Datenbank vorhandenen Sequenzen mit der probe match Funktion getestet. Die Anzahl der erlaubten Basenfehlpaarungen der Nicht-Zielorganismen wird von 0 bis 3 variiert. Die Überprüfung der wahrscheinlichsten Sondensensitivität erfolgt anhand der von Fuchs et al. [FUCHS et al. 1998] veröffentlichten Klassifizierung der Nukleotide der 16S-rRNA von *E. coli* in sechs Helligkeitsstufen. Dabei wurden die Sonden der höchsten Spezifität und zugleich ausreichender zu erwartender Signalintensität ausgewählt und für die *in situ*-Hybridisierung der Biofilterproben eingesetzt. Die Sequenz sowie die Bindungsstelle mit der Helligkeitsstufe der entwickelten 16S-rRNA-gerichteten Oligonukleotidsonden ist in Tabelle 3.3 dargestellt.

Tabelle 3.3: Entwickelte 16S-rRNA-gerichtete Oligonukleotidsonden für die Biofilterisolate

Sonde	Zielorganismen	Sequenz	rRNA, Bindungsstelle mit Helligkeitsstufe
RHO576	<i>Rhodococcus</i> spp.	5'-GACAAACCGCCUACGAAC-3'	16S, 576-593; III
CHR1255	<i>Chryseobacterium</i> spp.	5'-CCUAUCGCUAGGUAGCUG-3'	16S, 1255-1272; II
MIC845	<i>Microbacteriaceae</i> spp.	5'-GCUGCGUCACGGAAUCCG-3'	16S, 845-863; II
CLA65	<i>Clavibacter xyli</i>	5'-AAGCUCCCGGUUCAUCGU-3'	16S, 65-82; II

3.4.2.2 Populationsuntersuchungen an den Biofilterproben

Während die Untersuchungen der Fettsäureprofile der Biofilterproben (Kapitel 3.3) dazu dient, auf Grundlage der Biomarkerfettsäuren Aussagen über die dominanten und styrolabbauenden Bakteriengruppen machen zu können, soll an Hand der *in situ* Hybridisierung die quantitative Änderung der gesamten Bakterienpopulation sowie der Anteil der Isolate im Biofilm bestimmt werden.

Der Anteil der mit der Sonde EUB338 erfassten Zellen schwankt zwischen 60 % und 80 % der mit DAPI detektierbaren Zellen. Dies entspricht in der Literatur angegebenen Werten für andere mikrobielle Habitate [MANZ et al. 1992, NEEF 1997]. Während im ersten Segment die Zahl der erfassten Zellen als nahezu konstant zu betrachten ist, kommt es im zweiten

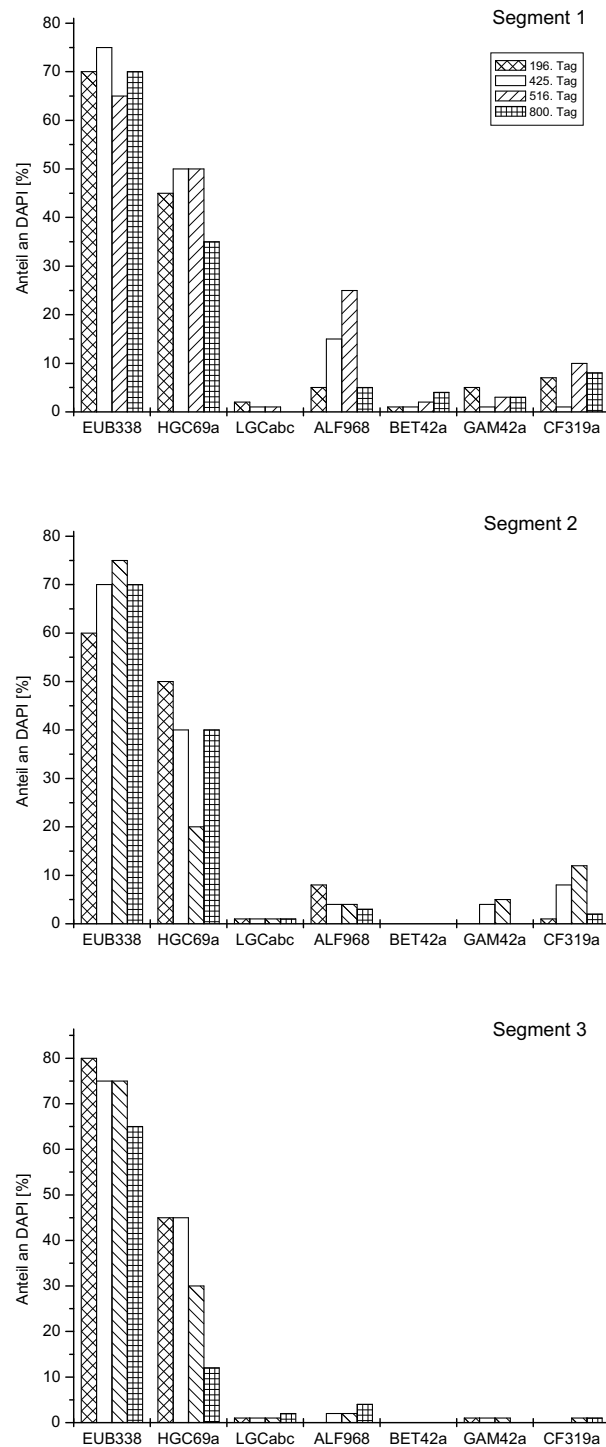


Abbildung 3.7: *In situ* Populationsuntersuchungen aus den drei Segmenten des Biofilters mit gruppenspezifischen Sonden nach 196, 425, 516 und 800 Tagen.

Segment zu einem leichten Anstieg und im dritten zu einem Abfall der mit EUB338 erfassbaren *Bacteria*. Die Nicht-Markierbarkeit (20 - 40 %) mit der Sonde EUB338 kann verschiedene Ursachen haben. Aufgrund des Fehlens der entsprechenden rRNA-Zielsequenz innerhalb der Domäne der *Bacteria* werden nicht alle Mikroorganismen erfasst. Eine Erhöhung des erfassbaren Populationsanteils ist durch eine Kombination der Sonde mit EUB-II und EUB-III möglich [DAIMS et al. 1999]. Auch besitzen Zellen mit einer geringen Aktivität einen niedrigen Ribosomengehalt, so dass die Fluoreszenzintensität in diesen Zellen besonders gering ist und diese somit nur schwer erkennbar sind. Dies steht in Korrelation zu dem Ergebnis der Studie über die Lebend-Gesamtzellzahl (Kapitel 3.2.2), wonach der Anteil der lebenden Zellen im Biofilm zwischen 50-70 % der Gesamtbiomasse ausmacht. Zudem sind auch diverse Bakteriengruppen bekannt, die eine besonders starre Zellwand aufweisen, welche als Permeationsbarriere für Oligonukleotidsonden wirken können [LIPSKI 1999].

Über den gesamten Versuchszeitraum dominieren in allen drei Segmenten die grampositiven Bakterien mit einem hohen G+C Gehalt. Während am 196ten Tag in allen Segmenten eine ähnliche Besiedlungsdichte an mit der Sonde HGC69a detektierbaren Mikroorganismen vorzuliegen scheint, kommt es über den weiteren Versuchsraum zu einer deutlichen Populationsverschiebung innerhalb der einzelnen Segmente. Im ersten Segment nimmt der prozentuale Anteil der detektierbaren Mikroorganismen zunächst leicht zu und nimmt dann nach 800 Betriebstagen um 15 % ab. Im zweiten Segment sinkt der Anteil vom 196ten auf den 516ten Tag kontinuierlich von 50 % auf 20 % ab und steigt am Tag 800 wieder auf 40 % der mit DAPI anfärbbaren Zellen an. Im dritten Segment ist der Anteil an mit der Sonde HGC69a detektierbaren Mikroorganismen zunächst konstant und fällt dann bis zum Tag 800 von 45 % auf 12 % ab.

Obwohl nach dem Fettsäuremuster ein Isolate zu den *Paenibacillus* und ein Isolat zu dem *Bacillus cereus*-Zweig zugeordnet werden kann und somit zu der Gruppe der mit den Sonden LGCa+b+c detektierbaren Mikroorganismen gehören, liegt der Anteil der markierbaren Mikroorganismen in allen Segmenten unter 1 %.

Mit der α -Proteobakterien spezifische Sonde ALF968 kann im ersten Segment des Versuchsbiofilters ein signifikanter Anstieg an detektierbaren Mikroorganismen zwischen dem 196ten und 516ten Betriebstag bestimmt werden. Nach 800 Betriebstagen geht der Anteil in diesem Segment an mit der Sonde ALF968 hybridisierbaren Bakterien jedoch von 25 % auf 5 % zurück. In den anderen Segmenten kann nur ein geringer Anteil von bis zu 5 % der

mit DAPI anfärbbaren Zellen bestimmt werden.

Mit den für die β -Proteobakterien spezifische Sonde BET42a und der für die γ -Proteobakterien spezifische Sonde GAM42a kann nur ein geringer Anteil von maximal 5 % der Gesamtpopulation gezählt werden, so dass auch diese Bakteriengruppen im Biofilm nach dem Hybridisierungsverfahren nur eine untergeordnete Rolle zu zukommen scheint.

Mit der für die *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe spezifischen Sonde CF319a kann im ersten und zweiten Segment wieder eine Populationsdynamik über den Betriebszeitraum festgestellt werden, im dritten Segment können dagegen nur vereinzelt Zellen detektiert werden. Während in der Probe des ersten Segments vom 425ten Betriebstag nur vereinzelt hybridisierte Zellen vorliegen, liegt der Anteil der detektierbaren Mikroorganismen an den anderen Proben Tagen bei ca. 10 %. Im zweiten Segment kann nur nach 425 und 516 Tagen ein Anteil von 8 % und 12% bestimmt werden.

Im ersten Segment kann nach 196 Betriebstagen mit den Sonden HGC69a, LGCa+b+c, ALF968, BET42a, GAM42a und CF319a 65 % der Gesamtpopulation im Biofilm detektiert werden. Davon fallen 47 % auf die grampositiven und 18 % auf die gramnegativen Mikroorganismen. Somit bleibt eine Differenz von 5 % nichterfasster Zellen zu der mit der Sonde EUB338 hybridisierbaren Mikroorganismen. Nach 425 Betriebstagen sind es 69 % mit einem Anteil von 51 % an grampositiven und 18 % an gramnegativen Mikroorganismen. Damit bleibt auch hier nur eine geringe Differenz von 6 % an zu EUB338 nichtdetektierbaren Zellen. Am 516ten Betriebstag ist der Anteil der mit den gruppenspezifischen Sonden gezählten Zellen mit 91 % jedoch deutlich über den Anteil von 65 % an mit der Sonde EUB338 detektierbaren Mikroorganismen. Davon fallen 49 % auf die grampositiven und 42 % auf die gramnegativen Bakterien im Biofilm. Eine Ursache dafür, dass mit den gruppenspezifischen Sonden mehr Zellen erfasst werden, liegt darin begründet, dass die Zellen, die mit der Sonde ALF968 hybridisiert werden können und ganz charakteristische Zellformen aufweisen, in den mit EUB338 markierten Proben keine Signale liefern. Nach 800 Betriebstagen ist der Anteil an den mit den gruppenspezifischen Sonden erfassten Mikroorganismen nur noch 55 %. Davon fallen 35 % auf die grampositiven und 20 % auf die gramnegativen Mikroorganismen. Damit ist der Anteil der nichtdetektierbaren Mikroorganismen auf 15 % angestiegen.

Im zweiten Segment ist am 196ten Betriebstag die Summe der mit allen Sonden detektierbaren Mikroorganismen gleich den Anteil der mit der Sonde EUB338 erfassten Zellen. Dabei gehen 51 % an die grampositiven und 9 % an die gramnegativen Mikroorganismen. Nach 425 Betriebstagen sind es 57

%, mit einem Anteil von 41 % an grampositiven und 16 % an gramnegativen Mikroorganismen. Somit liegt der Anteil an mit diesen Sonden nichterfassten Zellen bei 13 %. Am 516ten Betriebstag ist der Anteil nur noch 42 %, der zu gleichen Teilen an die grampositiven und gramnegativen Mikroorganismen geht. Dies führt zu einer deutlichen Erhöhung der mit diesen Sonden nichthybridisierbaren Mikroorganismen auf 33 %. Zum 800ten Betriebstag ist der Anteil der detektierbaren Zellen mit 46 % wieder leicht angestiegen. Davon ist der Anteil an grampositiven Mikroorganismen 41 % und der an gramnegativen 5 %. Der Anteil an nicht detektierten Mikroorganismen ist mit 24 % relativ hoch.

Im dritten Segment kann nach 196 Betriebstagen mit den Sonden HGC69a, LGCa+b+c, ALF968, BET42a, GAM42a und CF319a 47 % der Gesamtpopulation im Biofilm detektiert werden, mit einem Anteil von 46 % an grampositiven und 1 % an gramnegativen Mikroorganismen. Somit liegt der Anteil an mit diesen Sonden nichterfassten Zellen bereits bei 33 %. Am 425ten Betriebstag entsprechen die Anteile der detektierten Zellen denen der Proben nach 196 Tagen. Der Gesamtanteil der gruppenspezifischmarkierten Zellen beträgt 49 %, mit 46 % an grampositiven und 3 % an gramnegativen Mikroorganismen. Nach 516 Betriebstagen ist der Anteil nur noch 35 %. Dabei gehen 31 % an die grampositiven und 4 % an die gramnegativen Mikroorganismen. Dies führt zu einer weiteren Erhöhung der mit diesen Sonden nichthybridisierbaren Mikroorganismen auf 35 %. Nach 800 Betriebstagen hat sich der Anteil an detektierten Zellen mit 19 % noch weiter verringert. Davon können 14 % zu den grampositiven und 5 % zu den gramnegativen Mikroorganismen zugeordnet werden. Die Differenz zu den mit EUB338 detektierbaren Mikroorganismen liegt bei dieser Probe bei 46 %.

Die Nicht-Markierbarkeit mit den Sonden HGC69a, LGCa+b+c, ALF968, BET42a, GAM42a und CF319a kann die wie bereits oben beschriebenen Ursachen haben. Aufgrund des Fehlens der entsprechenden rRNA-Zielsequenz innerhalb der Domäne werden nicht alle Mikroorganismen erfasst. Auch besitzen Zellen mit einer geringen Aktivität einen niedrigen Ribosomengehalt, so dass die Fluoreszenzintensität in diesen Zellen besonders gering ist und diese somit nur schwer erkennbar sind.

Die Untersuchungen zu den Membranfettsäureprofilen aus den Versuchsbiofilterproben (Kapitel 3.3) zeigen ebenfalls, dass durch die hohen Anteile der Markerfettsäuren für die Aktinomyzeten und die *Corynebacteriaceae* im Gesamtfettsäuremuster, dass diese Bakteriengruppen, die der Gruppe der HGC zuzuordnen sind, zu den dominanten Bakterien in den Proben zählen. Die Markerfettsäuren für die Gruppe *Pedobacter*, *Paenibacillus* und

des *Bacillus cereus*-Zweigs werden nur vereinzelt bzw. gar nicht detektiert. Auch dies steht in guter Korrelation zu der *in situ*-Hybridisierungsstudie, da mit der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe spezifischen Sonde nur geringe Anteile und mit LGC spezifischen Sonde kaum Signale detektiert werden. Aber auch der geringe Anteil der Markerfettsäure für die β - und γ -Proteobakterien zeigt, dass die Bakterien aus diesen Gruppen keine Dominanz im Biofilm einnehmen. Dennoch wäre hierfür nach dem *in situ*-Hybridisierungsverfahren ein höherer Anteil an detektierbaren Zellen zu erwarten.

Für die Beschreibung der Vorgänge im Biofilter ist neben der Populationsdynamik die Abundanz der isolierten sowie der styrolabbauenden Mikroorganismen im Biofilm von besonderem Interesse. Deshalb werden für die Isolate drei gattungsspezifische und eine speziesspezifische Sonden entwickelt (Tabelle 3.3). Da für die Isolate, die nach dem Fettsäuremuster zu den *Paenibacillus* und zu dem *Bacillus cereus*-Zweig zugeordnet werden können, kein signifikanter Anteil an Biomarkerfettsäuren vorliegt und auch mit den Sonden LGCa+b+c nur ein geringer Anteil detektiert wird, wird auf einen weiteren Einsatz von gattungs- oder speziesspezifischen Sonden für diese Mikroorganismen verzichtet. Für die Hybridisierung der Isolate aus der Gattung der *Xanthomonadaceae* wird die von Friedrich et al. entwickelte Sonde eingesetzt [FRIEDRICH et al. 1999].

Mit der Sonde RHO576 wurden 2 - 15 % der mit DAPI angefärbten Zellen detektiert. Die geringe Zahl der erfassten Zellen resultiert unter anderem aus der schlechten Zugänglichkeit der Zielsequenz für die Hybridisierungssonde. Dies ist durch die quartäre Struktur der rRNA bedingt und lässt nur eine Helligkeitsstufe von III, d.h. 41-60 %-Signalintensität bezogen auf die hellste Sonde, nach der Klassifizierung von Fuchs et al. [FUCHS et al. 1998] zu. Desweiteren werden 1-5 % der γ -Proteobakterien mit der Sonde GAM42a über den gesamten Versuchszeitraum detektiert, der Anteil der *Xanthomonadas*, die zu dieser Gattung gehören, liegt besonders nach 800 Betriebstagen mit bis zu 8 % deutlich darüber. Dies zeigt, dass die Vertreter der *Xanthomonadas* für die gruppenspezifische Sonde nur schwer zugänglich sind. Nach den Membranfettsäureprofilen dieser Proben kann jedoch ein Anstieg der γ -Proteobakterien angezeigt werden. Die Organismen der Gattung *Chryseobacterium* aus der *Cytophaga-Flavobacterium*-Gruppe, die sich mit der Sonde CHR1255 markieren lassen, kommt nur ein sehr geringer Anteil im Habitat zu und liegt zum Teil unter der mit der Sonde CF319a detektierbaren Mikroorganismen. Die *in situ* Hybridisierung mit der gattungsspezifischen Sonde für die *Microbacteriaceae*, die

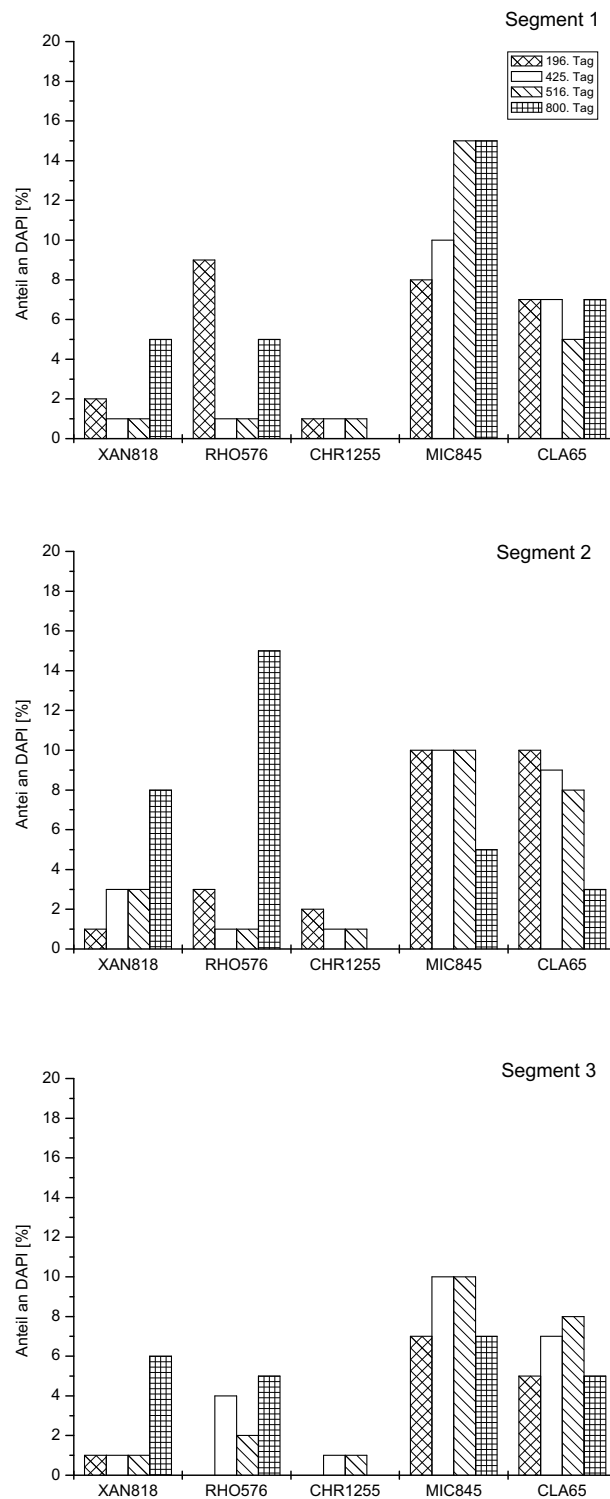


Abbildung 3.8: *In situ* Populationsuntersuchungen aus den drei Segmenten des Biofilters mit klassen- und isolatspezifischen Sonden nach 196, 425, 516 und 800 Tagen.

nach der Markierungsstudie der Membranfettsäuren als maßgebliche Styrolabbauer bestimmt sind, haben einen Anteil von 5-15 % an den aktiven Zellen im Biofilm. Ähnliche Populationsanteile von schadstoffabbauenden Bakterien an der Gesamtpopulation sind in der Literatur beschrieben. Linn [LINN 1999] untersuchte die Populationsdynamik der mikrobiellen Mischkultur in einem Rieselbettreaktor zum Abbau aromatischer Lösungsmittelgemische und bestimmte die potentiellen Schadstoffabbauer mit einem Anteil von ca. 8 % an der Gesamtpopulation. Die Studie von Pedersen et al. [PEDERSEN et al. 1997] zeigte, dass der Stamm *Pseudomonas putida*, mit 65 % an dem Toluolabbau im Biofilm eines Rieselbettreaktors verantwortlich war, nur 4 % der aktiven Zellen ausmacht.

Die geringe Wiederfindungsrate der meisten Isolate steht im Einklang mit den von Amann et al. [AMANN et al. 1995] durchgeführten Untersuchungen, die zeigen, dass die kultivierbaren Mikroorganismen im komplexen Biofilmsystemen häufig im Habitat keine dominante Rolle einnehmen.

3.5 Bestimmung der kinetischen und thermodynamischen Parameter

3.5.1 Extraktion der EPS

Die Extraktion der EPS wird wie im Kapitel 2.5.1 beschrieben durchgeführt. Durch Differenzwägung kann ein Anteil von 40 - 60 % der EPS am Gesamtbiofilm auf den PORAYER-Glaskugeln bestimmt werden. Zudem wird ein Wassergehalt der EPS von 98 % bestimmt.

3.5.2 Bestimmung des Verteilungskoeffizienten Styrol/EPS/Luft

Durch die im Kapitel 2.5.2 beschriebene Methode wird für die Austauschkomponente Styrol im System EPS/Luft der Verteilungskoeffizient experimentell bestimmt (Abbildung 3.9). Dies geschieht unter der Annahme, dass es sich bei der EPS um ein homogenes System handelt. Zudem werden Wechselwirkungen der Gasphase auf den Verteilungskoeffizienten nicht mit berücksichtigt.

Um die Verlässlichkeit der angewandten experimentellen Bestimmung des Verteilungskoeffizienten zu prüfen, wird zusätzlich der Verteilungskoeffizi-

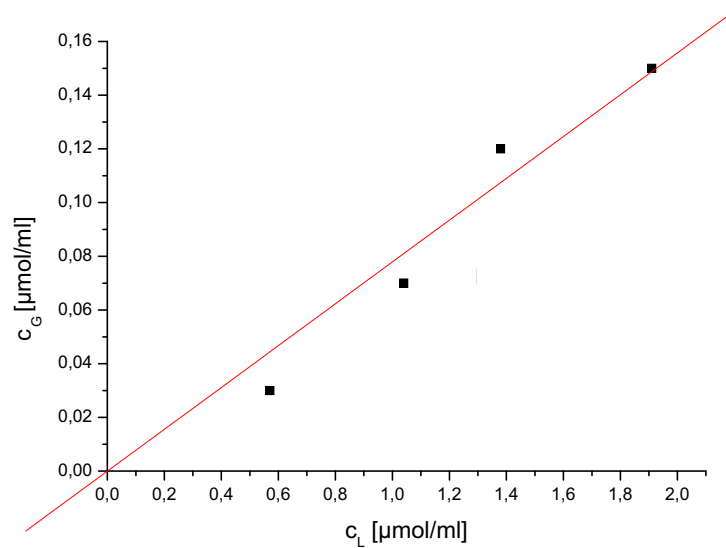


Abbildung 3.9: Experimentell bestimmter Verteilungskoeffizient für das System Styrol/EPS/Luft

ent für Styrol im System Wasser/Luft nach der gleichen Methode bestimmt. Der Verteilungskoeffizient zwischen Gasphase und Wasserfilm für Styrol kann zusätzlich zu dem experimentell bestimmten Wert aus dem Partialdampfdruck und der Wasserlöslichkeit der Austauschkomponente Styrol im Gleichgewicht berechnet werden [STYROL 1990]. Der Vergleich (Tabelle 3.4) der Ergebnisse des experimentell und berechneten Wertes zeigt eine gute Übereinstimmung der nach beiden Methoden erhaltenen Werte.

An der Phasengrenze Wasser-Biofilm wird aufgrund des hohen Wasseranteils im Biofilm bislang kein Konzentrationssprung erwartet. Somit wird der Verteilungskoeffizient mit einem Wert von 1 angenommen [HORN und HEMPEL 1997, FORELL 1999].

Der in dieser Studie zu $H_S = 0.078$ bestimmte Verteilungskoeffizient für Styrol zwischen Luft und EPS zeigt, dass Styrol in EPS besser löslich ist als in Wasser, so dass auch an der Phasengrenze Wasser-Biofilm von einem weiteren Konzentrationssprung ausgegangen werden kann. Dies kann als Strategie der Mikroorganismen betrachtet werden, eine ausreichende Substratzufuhr sicher zu stellen.

Bei der EPS handelt es sich um ein dreidimensionales Netzwerk aus Polysacchariden, die den Mikroorganismen eine mechanischen Stabilität verleihen und das Ansiedeln auf Oberflächen erleichtern. Eine weitere Rolle der EPS ist das Herausziehen von Nährstoffen aus der umgebenden wässrigen

Tabelle 3.4: Verteilungskoeffizienten der Stoffsysteme

	Stoffsystem 1	Stoffsystem 2 (gemes- sen)	Stoffsystem 3 (berech- net)	Stoffsystem 4
Gasphase	Luft	Luft	Luft	Wasser
Flüssigphase	EPS	Wasser	Wasser	Biofilm
Austausch- komponente	Styrol	Styrol	Styrol	Styrol
Verteilungs- koeffizient	0.078	0.11	0.11	1

Phase [DECHNO 1990, WINGENDER et al. 1999b]. Somit erhöht diese Matrix die Sorption von gelösten Stoffen und Partikeln, die als Nährstoffe von den Mikroorganismen verwertet werden können [FLEMMING et al. 1996, SPÄTH et al. 1998]. Auf der anderen Seite stellt die EPS eine Barriere für toxische Stoffe dar, da sie zum Teil entweder in der Matrix durch Proteine vorverdaut werden oder sich dort akkumulieren [WINGENDER et al. 1999a]. Somit erhält die EPS-Matrix auch eine Depot-Funktion.

3.5.3 Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Styrol in EPS

Der Diffusionskoeffizient von Styrol in EPS wird über die Selbst-Diffusion mittels NMR wie in Kapitel 2.5.3 beschrieben bei 25 °C experimentel bestimmt. Für die Diffusionsauswertung werden die aromatischen Protonen des Styrols verwendet.

Die Auswertung erfolgt grafisch, wie in Abbildung 3.10 dargestellt. Dafür wird zum einen die linearisierte Auftragung von

$$S(g)/S(0) = I/I(0) = g^2 k \quad (3.1)$$

$$k = \gamma^2 \delta^2 (\Delta - \delta/3) \quad (3.2)$$

verwendet.

Für die gefittete linearisierte Anfangssteigung durch Null ergibt sich ein Diffusionskoeffizient für Styrol in EPS von $D_S = 9.3 \cdot 10^{-10} \pm 8.6 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$. Wie die Abbildung 3.10 zeigt, kommt es bei höheren Gradientenstärken g zu einer Abweichung vom linearen Verhalten. Dies lässt darauf schließen,

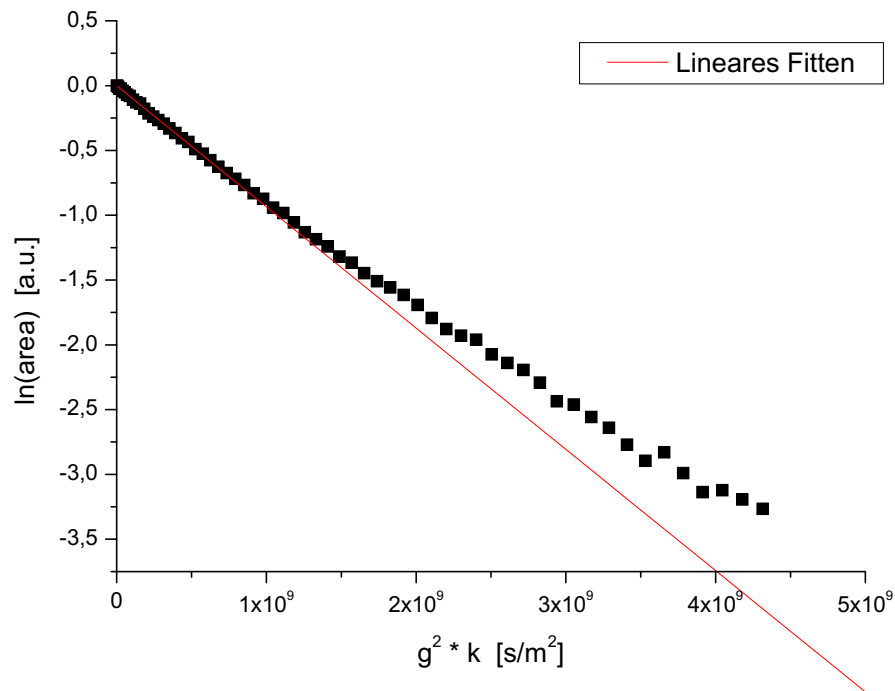


Abbildung 3.10: Experimentell bestimmter Diffusionskoeffizient für Styrol in EPS

dass sich statische Anteile in der EPS befinden. Mögliche Ursachen für diese statischen Anteile können kleine Styroltröpfchen in der EPS oder bereits an die Matrix gebundenes Styrol sein.

Die Diffusion in Biofilmen kann mitunter nur abgeschätzt werden. So erfolgt bislang die Bestimmung des Diffusionskoeffizienten von Styrol in Biofilmen aus der Berechnung nach Scheibel und Wilke Chang für Diffusion in Wasser. Zur Berücksichtigung der langsameren Diffusion im Biofilm gegenüber Wasser aufgrund der Mikroorganismen und Exopolysaccharide wird der Diffusionskoeffizient mit dem 0.8-fachen der Diffusion in Wasser abgeschätzt [COX et al. 1997, FORELL 1999]. Somit wird ein Diffusionskoeffizient von $D_{Sab} = 6.8 \cdot 10^{-10} \text{ m}^2/\text{s}$ angenommen.

Der experimentell nach der NMR-Technik bestimmte Diffusionskoeffizient für Styrol ist jedoch um das 1.4-fache höher als der abgeschätzte Wert. Der Antrieb für ein Molekül durch ein Medium zu diffundieren ist die Affinität zwischen dem Molekül und dem Medium. Diese Affinität hängt mit der chemischen Gleichheit, der Dipol-Dipolabhängigkeit und Van-Der-Waals-Kräften zusammen. Da es sich bei Styrol um einen hydrophoben Stoff han-

delt, ist anzunehmen, dass die hydrophoben Komponenten, die sich in der EPS-Matrix befinden, die Diffusion von Styrol begünstigen.

3.6 Sauerstoff- und Styrolverbrauchsmessungen

Die mikrobielle Abbauproduktivität bestimmt im wesentlichen die Abbauleistung von Biofilteranlagen. In Mischpopulationen laufen mehrere Prozesse simultan ab, die als Primär- und Sekundärabbau beschrieben werden. Messungen zum Substratverbrauch sind direkt auf den Anteil der Primärabbauer im Habitat beziehbar [MOLLER et al. 1996].

Die Bestimmung der Sauerstoff- und Styrolverbrauchsmessungen wird, wie in Kapitel 2.5.4 beschrieben, zunächst an dem submersen System in Ringers-Reagenz-Lösung durchgeführt, da bei diesem der Stoffübergang von der Gasphase in die wässrige Biofilmphase entfällt. Zudem können durch das Rühren der Suspension Diffusionsprozesse als hinreichend schnell betrachtet und somit vernachlässigt werden. Zur weiteren Vereinfachung der Auswertung wird das Messverfahren an Proben aus dem einsegmentigen Laborbiofilter vorgenommen, dessen Biofilm annähernd aus einer Reinkultur besteht.

Die experimentell bestimmte Styrolverbrauchskurve der Reinkultur im Submersen gliedert sich in zwei Bereiche (Abbildung 3.11), wobei der Knickpunkt, ab dem die Styrolabnahme nur noch schwach ausgeprägt ist, durch die kritische Sauerstoffkonzentration (c_{krit}) gegeben ist. Höhere Sauerstoffwerte als (c_{krit}) ermöglichen allen aeroben styrolabbauenden Mikroorganismen den Katabolismus. Bei niedrigeren Werten als (c_{krit}) verstoffwechseln nur die bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen oder anaeroben Bedingungen aktiven Mikroorganismen Styrol. Die kritische Sauerstoffkonzentration ist organismenspezifisch. In der Literatur werden kritische Sauerstoffkonzentrationen bei Reinkulturen für den Abbau von aromatische Verbindungen in einer Spanne von 0.0004 bis 0.05 mmolO₂/l angegeben [WILSON und BOUWER 1997].

Beide Abschnitte der Styrolverbrauchskurve lassen sich durch einen Ansatz 0ter Ordnung bezüglich der Styrolkonzentration c_S und 1ter Ordnung bezüglich der Sauerstoffkonzentration c_{O_2} beschreiben, wobei k_1 die Geschwindigkeitskonstante oberhalb und k_2 die Geschwindigkeitskonstante unterhalb der kritischen Sauerstoffkonzentration c_{krit} ist.

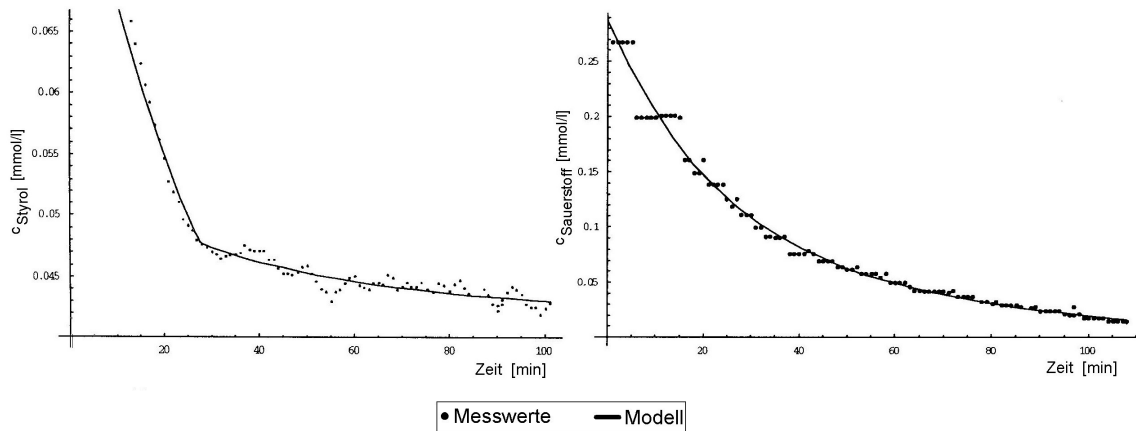


Abbildung 3.11: An der Reinkultur submers gemessene und modellierte Styrol- und Sauerstoffverbrauchskurven.

Die mathematische Beschreibung erfolgt mit einer Sprungfunktion der Form:

$$\dot{c}_S = -c_{O_2}(t) \begin{cases} k_1; c_{O_2} > c_{krit} \\ k_2; c_{O_2} < c_{krit} \end{cases}, \quad (3.3)$$

$$\dot{c}_S = -c_{O_2}(t) \left[\frac{k_1 + k_2}{2} + \frac{k_1 - k_2}{2} \operatorname{sgn}(c_{O_2}(t) - c_{krit}) \right]. \quad (3.4)$$

Durch Einführung der arctan-Funktion wird die Sprungfunktion sgn stetig.

$$\dot{c}_S = -c_{O_2}(t) \left[\frac{k_1 + k_2}{2} + \frac{k_1 - k_2}{2} \arctan \frac{(c_{O_2}(t) - c_{krit})}{\varepsilon} \right], \quad (3.5)$$

mit ε als Stauchungsfaktor.

Der Einfluß der Sauerstoffkonzentration ist durch einen eigenen kinetischen Ansatz zu beschreiben. Es ist aber nicht möglich den Sauerstoffbedarf der Primärabbauer für Styrol in einer Mischkultur zu erfassen, da wiederum mehrere, unterschiedlich sauerstoffverbrauchende Prozesse simultan ablaufen. Zudem steht auch die Atmung der Sekundärabbauer in Konkurrenz zu den Primärabbauern, so dass durch den Sauerstoffbedarf der Sekundärabbauer die Geschwindigkeit des Styrolabbaus beeinflusst wird. Deshalb wird der Sauerstoffeinfluß durch einen sich aus den experimentellen Sauerstoffverbrauchsverläufen ergebenden funktionalen Ansatz beschrieben:

$$c_{O_2}(t) = A \exp\left(-\frac{t}{B}\right) - Ct + D. \quad (3.6)$$

Dieser Ansatz berücksichtigt den exponentiellen Abfall der Sauerstoffkonzentration bei höheren Sauerstoffkonzentrationen und den konstanten Abfall bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen sowie einen offset.

Dieser Modell-Ansatz führt in allen Messreihen mit dem Reinkultursystem zu guten Anpassungsergebnissen und kann ebenso erfolgreich auf die Messreihen in jedem Segment des dreisegmentigen Biofilters angewendet werden (Abbildung 3.12). Die berechneten Anpassungsparameter, A,B,C und D sowie die Angaben zur statistischen Auswertung aller berechneten Werte sind im Anhang aufgeführt. Die berechneten kritischen Sauerstoff-

Tabelle 3.5: Berechnete kritische Sauerstoffkonzentrationen der Messreihen

	Reinkultur	Segment 1	Segment 2	Segment 3
$c_{krit} \left[\frac{mmol}{l} \right]$	0.116	0.221	0.248	0.226

konzentrationen für den Reinkulturbiofilter und den dreisegmentigen Laborbiofilter sind in Tabelle 3.5 aufgeführt. Die Angaben zur statistischen Auswertung der berechneten Werte sind im Anhang aufgeführt. Diese Werte liegen deutlich über der in der Literatur angegebenen Spanne für kritische Sauerstoffkonzentrationen beim mikrobiologischen Abbau von Aromaten. Zudem macht der Vergleich deutlich, dass die kritische Sauerstoffkonzentration der Mischkultur doppelt so hoch ist wie die der Reinkultur.

Die Verbrauchsraten k_1 und k_2 sind die Produkte aus den spezifischen Verbrauchsraten k_{S_1} , k_{S_2} und der Biofilmdichte X

$$k_i = k_{S_i} X, \quad (3.7)$$

mit

$$X = \frac{\text{Biotrockenmasse(BTM)}}{\text{Volumen der Pellets}}. \quad (3.8)$$

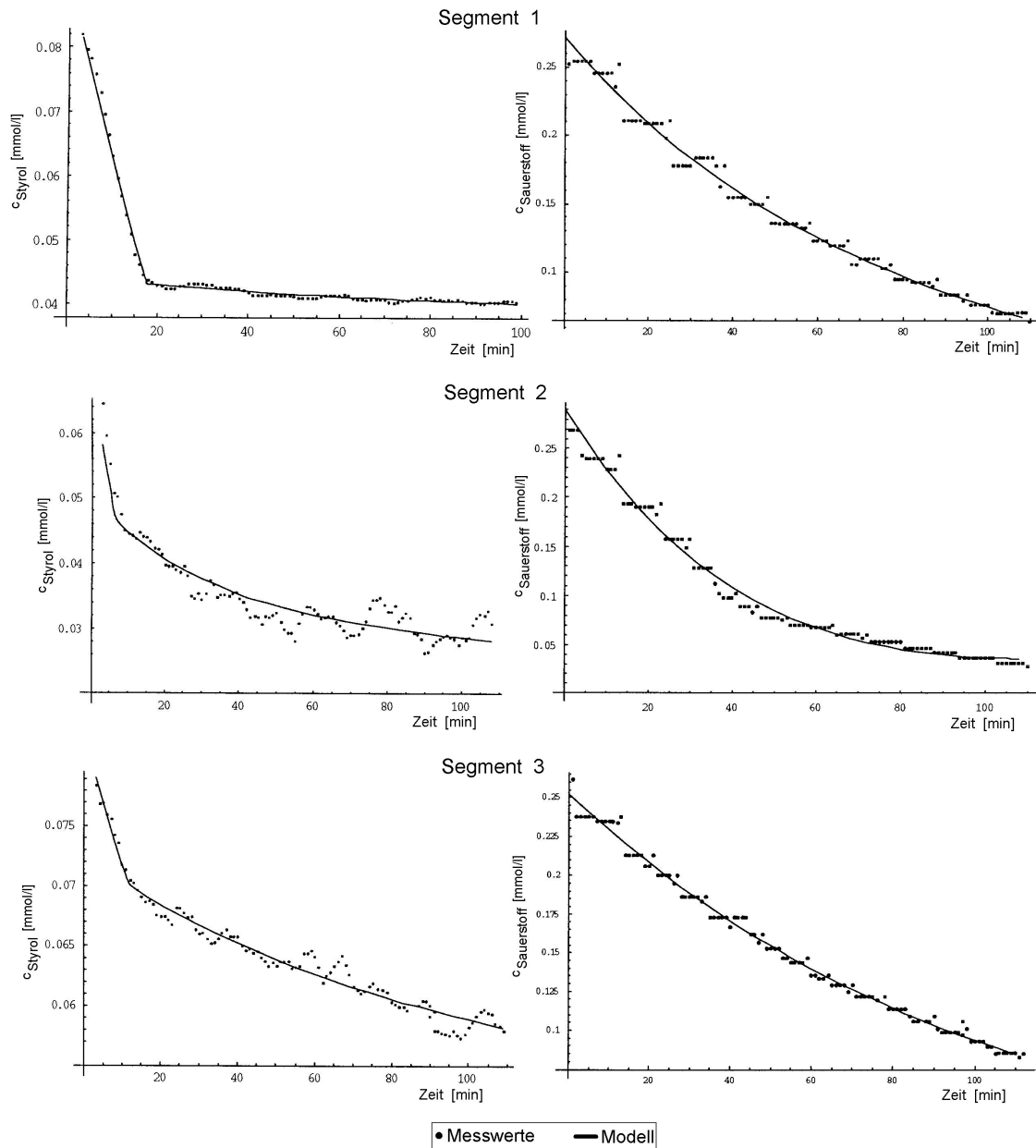


Abbildung 3.12: An den drei Segmenten des Laborbiofilters submers gemessene und modellierte Styrol- und Sauerstoffverbrauchskurven.

Ein wesentliches Ziel dieser Arbeit ist es, den Substratabbau in Abhängigkeit der aktiven Biofilmdichte (X_a) zu betrachten. Deshalb wird der Anteil der Lebendzellzahl in der Berechnung des Substratabbaus mit berücksichtigt (Tabelle 3.6 und Tabelle 3.7). Desweiteren wird aus k_1 der Reaktionsgeschwindigkeitskoeffizient für den Substratabbau der Primärabbauer (X_p) berechnet.

$$k_i = k_{S_{ia}} X_a \quad (3.9)$$

$$X_a = aX \quad (3.10)$$

$$k_1 = k_{S_{ip}} X_p \quad (3.11)$$

$$X_p = pX \quad (3.12)$$

mit

a = Anteil der lebenden Biomasse

p = Anteil der Primärabbauer.

Da für den Biofilm des dreisegmentigen Laborbiofilters der Anteil aller Primärabbauer nicht bestimmt werden kann, sondern lediglich für einen maßgeblichen Primärabbauer aus der Gattung der *Microbacteriaceae* ein Anteil von 5 - 15 % detektiert wird, wird für alle Segmente ein hypothetischer Ansatz von 20 % Primärabbauer gewählt. Für die Messungen an den Proben mit der Reinkultur entspricht der Anteil der Primärabbauer dem Anteil der als lebend detektierten Mikroorganismen.

Der Vergleich der Styrolverbrauchsrate zeigt, dass bezogen auf k_{S_1} die Reinkultur die höchste Styrolverbrauchsrate aufweist, während bezogen auf $k_{S_{1a}}$ und $k_{S_{1p}}$ das zweite und dritte Segment der Laborfilteranlage die größten Abbauaktivitäten zeigen, obwohl die Lebendanteile in diesen Segmenten lediglich bei 45 % und 40 % liegen. Der einsegmentige Laborfilter mit der Reinkultur an Styrolabbauer zeigt sich dagegen trotz des hohen Lebendanteils von 82 % als das schwächste im Styrolabbau bezogen auf die Primärabbauer. Dies lässt darauf schließen, dass die maßgeblichen Primärabbauer in der Mischkultur des dreisegmentigen Laborbiofilters deutlich aktiver sind, als der *Pseudomonas citronellolis* Stamm.

Die spezifische Styrolverbrauchsrate k_{S_1} ist im ersten Segment des Biofilters um das 1.9fache geringer als im zweiten Segment und um das 1.6fache geringer als im dritten Segment. Die spezifische Styrolverbrauchsrate $k_{S_{1a}}$ im ersten Segment ist dagegen um das 2.6fache geringer als im zweiten und dritten Segment. Während sich die spezifischen Styrolverbrauchsrate

Tabelle 3.6: Vergleich der submers bestimmten Styrolverbrauchsraten oberhalb der kritischen Sauerstoffkonzentration

	k_1 $\left[\frac{1}{\text{min}}\right]$	X $\left[\frac{g_{BTM}}{l}\right]$	k_{S_1} $\left[\frac{l}{\text{min} \cdot g_{BTM}}\right]$	$k_{S_{1a}}$ $\left[\frac{l}{\text{min} \cdot g_{aBTM}}\right]$	$k_{S_{1p}}$ $\left[\frac{l}{\text{min} \cdot g_{pBTM}}\right]$
Reinkultur	0.00617	9.56	0.000645	0.000787	0.000787
Segment 1	0.0089	31.82	0.000282	0.000433	0.00141
Segment 2	0.0119	22.44	0.000534	0.00119	0.00267
Segment 3	0.00389	8.75	0.000446	0.00111	0.00223

Tabelle 3.7: Vergleich der submers bestimmten Styrolverbrauchsraten unterhalb der kritischen Sauerstoffkonzentration

	k_2 $\left[\frac{1}{\text{min}}\right]$	X $\left[\frac{g_{BTM}}{l}\right]$	k_{S_2} $\left[\frac{l}{\text{min} \cdot g_{BTM}}\right]$	$k_{S_{2a}}$ $\left[\frac{l}{\text{min} \cdot g_{aBTM}}\right]$
Reinkultur	0.00232	9.56	0.000245	0.000298
Segment 1	0.00522	31.82	0.0000676	0.000164
Segment 2	0.00411	22.44	0.000183	0.000408
Segment 3	0.00149	8.75	0.000171	0.000428

k_{S_1} zwischen dem zweiten und dritten Segment noch um das 1.2fache unterscheiden, unterscheiden sich die spezifischen Styrolverbrauchsraten $k_{S_{1a}}$ kaum mehr voneinander. Somit ist die Styrolabbauaktivität in diesen beiden Segment als nahezu gleich anzusehen.

Da für alle Segmente der gleiche Anteil an Primärabbauer angenommen wird, sind die Unterschiede zwischen den spezifischen Styrolverbrauchsraten $k_{S_{1p}}$ in gleicher Art wie die spezifischen Styrolverbrauchsraten bezogen auf die Biofilmdichte.

Die spezifischen Styrolverbrauchsraten unterhalb der kritischen Sauerstoffkonzentration $k_{S_{2a}}$ sind für alle Messreihen ein Viertel der Styrolverbrauchsraten $k_{S_{1a}}$. Die starken Schwankungen der Messpunkte sind zum Teil auf die steigende Messungenauigkeit der UV-Sonde auf grund der zunehmenden Trübung der Suspension durch Biofilmmaterial während des Messvorgangs zurückzuführen.

Die Bestimmung der Sauerstoff- und Styrolverbrauchsmessungen aus der Gasphase über dem Biofilm werden ebenfalls zunächst an Proben aus dem Biofilter, dessen Biofilm annähernd aus einer Reinkultur besteht, durchgeführt. Für die mathematische Modellierung ist der Stoffübergang von der Gasphase in die wässrige Biofilmphase mit in Betracht zu ziehen. Dies wird deutlich am starken Abfall der Styrolkonzentration im Anfangsbereich der Styrolverbrauchsmessungen (Abbildung 3.13). Auch die Sauerstoffverbrauchskurve ist durch einen starken, aber kurzen Abfall im Anfangsbereich gekennzeichnet. Da es nicht wie in den submersen Styrolverbrauchs-

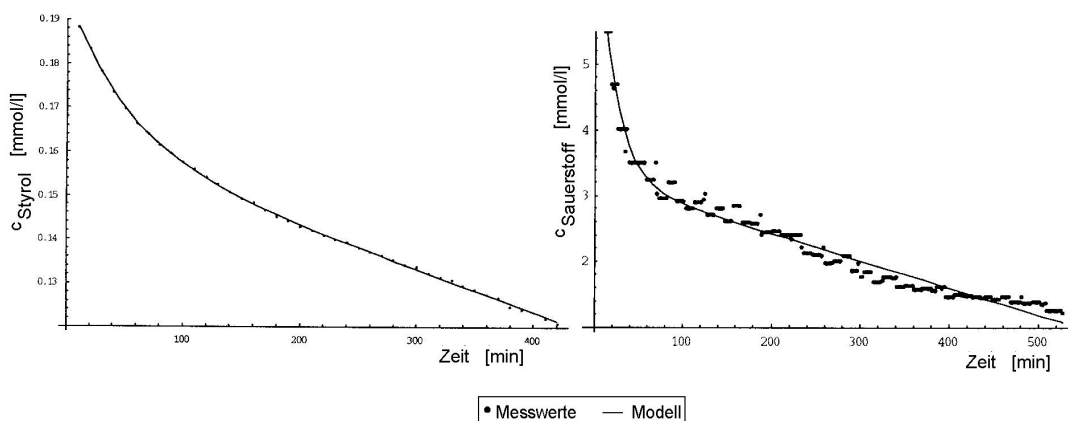


Abbildung 3.13: An der Reinkultur aus der Gasphase gemessene und modellierte Styrol- und Sauerstoffverbrauchskurven.

messungen nach dem Erreichen einer kritischen Sauerstoffkonzentration zu einem plötzlichen Abflachen der Styrolverbrauchskurve kommt, ist die Annahme gerechtfertigt, dass über die gesamte Versuchszeit keine Limitierung des Abbaus durch Sauerstoff erfolgt. Ebenso wie bei den submersen Versuchsbedingungen befindet sich das System unter den speziellen Versuchsbedingungen für Styrol im Sättigungsbereich, so dass auch hier der Abbau 0ter Ordnung bezüglich Styrol und 1ter Ordnung bezüglich Sauerstoff ist. Unter Berücksichtigung des vorgelagerten Stoffaustauschs zwischen Gas und Biofilmphase ergeben sich die folgenden Modellgleichungen.

$$\dot{c}_S^{\text{Gas}} = -k_1 a \left(\frac{c_S^{\text{Gas}}}{H_S} - c_S^{\text{BF}} \right) \quad (3.13)$$

$$\dot{c}_S^{\text{BF}} = \frac{V^{\text{Gas}}}{V^{\text{BF}}} k_1 a \left(\frac{c_S^{\text{Gas}}}{H_S} - c_S^{\text{BF}} \right) - k c_O^{\text{BF}} \quad (3.14)$$

$$\dot{c}_O^{\text{Gas}} = -k_1 a \left(\frac{c_O^{\text{Gas}}}{H_O} - c_O^{\text{BF}} \right) \quad (3.15)$$

$$\dot{c}_O^{\text{BF}} = \frac{V^{\text{Gas}}}{V^{\text{BF}}} k_1 a \left(\frac{c_O^{\text{Gas}}}{H_O} - c_O^{\text{BF}} \right) - k c_O^{\text{BF}}. \quad (3.16)$$

Mit

- a = spezifische Phasengrenzfläche
(a = Phasengrenzfläche/Gasvolumen)
- c_S^{Gas} = gasseitige Konzentration des Styrols
- c_S^{BF} = biofilmseitige Konzentration des Styrols
- c_O^{Gas} = gasseitige Konzentration des Sauerstoffs
- c_O^{BF} = biofilmseitige Konzentration des Sauerstoffs
- V^{Gas} = Volumen der Gasphase
- V^{BF} = Volumen der Biofilmphase
- $k_1 a$ = volumetrischer Stoffübergangskoeffizient Gas/Biofilm
- H_S = Verteilungskoeffizient von Styrol Gas/Biofilm
- H_O = Verteilungskoeffizient von Sauerstoff Gas/Biofilm
- k = Styrolabbaurate

Wird der Stoffaustausch Gas/Biofilm von Sauerstoff als schnell gegenüber der biochemischen Kinetik angenommen, vereinfacht sich die Sauerstoffbilanzgleichung (Gleichung 3.15) unter Anwendung des Quasistationaritätsprinzips zu

$$\dot{c}_O^{\text{Gas}} = 0 \quad (3.17)$$

$$c_O^{\text{BF}} = \frac{c_O^{\text{Gas}}}{H_O} \quad (3.18)$$

und als Bilanz für den Styrolabbau im Biofilm ergibt sich

$$\dot{c}_S^{\text{BF}} = \frac{V^{\text{Gas}}}{V^{\text{BF}}} k_{1a} \left(\frac{c_S^{\text{Gas}}}{H_S} - c_S^{\text{BF}} \right) - \frac{k}{H_O} c_O^{\text{Gas}}. \quad (3.19)$$

Die Sauerstoffverbrauchskurven lassen sich, wie bereits die submers gemessenen Sauerstoffzehrungen mit Gleichung 3.6 anpassen. Die berechneten Anpassungsparameter, A,B,C und D sind im Anhang aufgeführt.

Die Modellgleichung (Gleichung 3.19) zum Substratabbau wird auf die Messungen in der Gasphase über den biofilmbewachsenen Pellets aus jedem Segment des dreisegmentigen Laborbiofilter zur Bestimmung der Parameter H_S , $\frac{V^{\text{Gas}}}{V^{\text{BF}}}$, k_{1a} (Tabelle 3.8) und $\frac{k}{H_O}$ (Tabelle 3.9) angewendet (Abbildung 3.14). Auch hier wird eine gute Übereinstimmung von Modell und Messwerten erreicht. Die berechneten Anpassungsparameter, A,B,C und D sowie die Angaben zur statistischen Auswertung aller berechneten Werte sind im Anhang aufgeführt. Lediglich die Kurve zur Sauerstoffzehrung im dritten Segment lässt sich nicht mit dem gewählten funktionalen Sauerstoffansatz beschreiben. Dies liegt daran, dass nach einer ca. vierstündigen Versuchsdauer die Sauerstoffkonzentration im Reaktor zunächst wieder ansteigt. Als mögliche Ursache dafür werden aerobe phototrophe Organismen im Biofilm des dritten Segmentes angenommen, die durch unzureichende Verdunkelung der Messapparatur in der Lage sind, Sauerstoff zu produzieren.

Experimentell wird ein Verteilungskoeffizient von Styrol zwischen Luft und EPS von 0.078 bestimmt (Kapitel 3.5.2), der bereits auf das 0.71fache vom Verteilungskoeffizienten von Styrol zwischen Luft und Wasser verringert ist. Der mittels Modellierung berechnete weicht mit 0.026 im Mittel, bzw. 0.045 für den Biofilm im dritten Segment der Laborbiofilteranlage, deutlich davon ab, so dass eine weitere Begünstigung der Löslichkeit von Styrol, d.h. die Verringerung von H_S von 0.078 auf 0.026 durch die aktive Biomasse an-

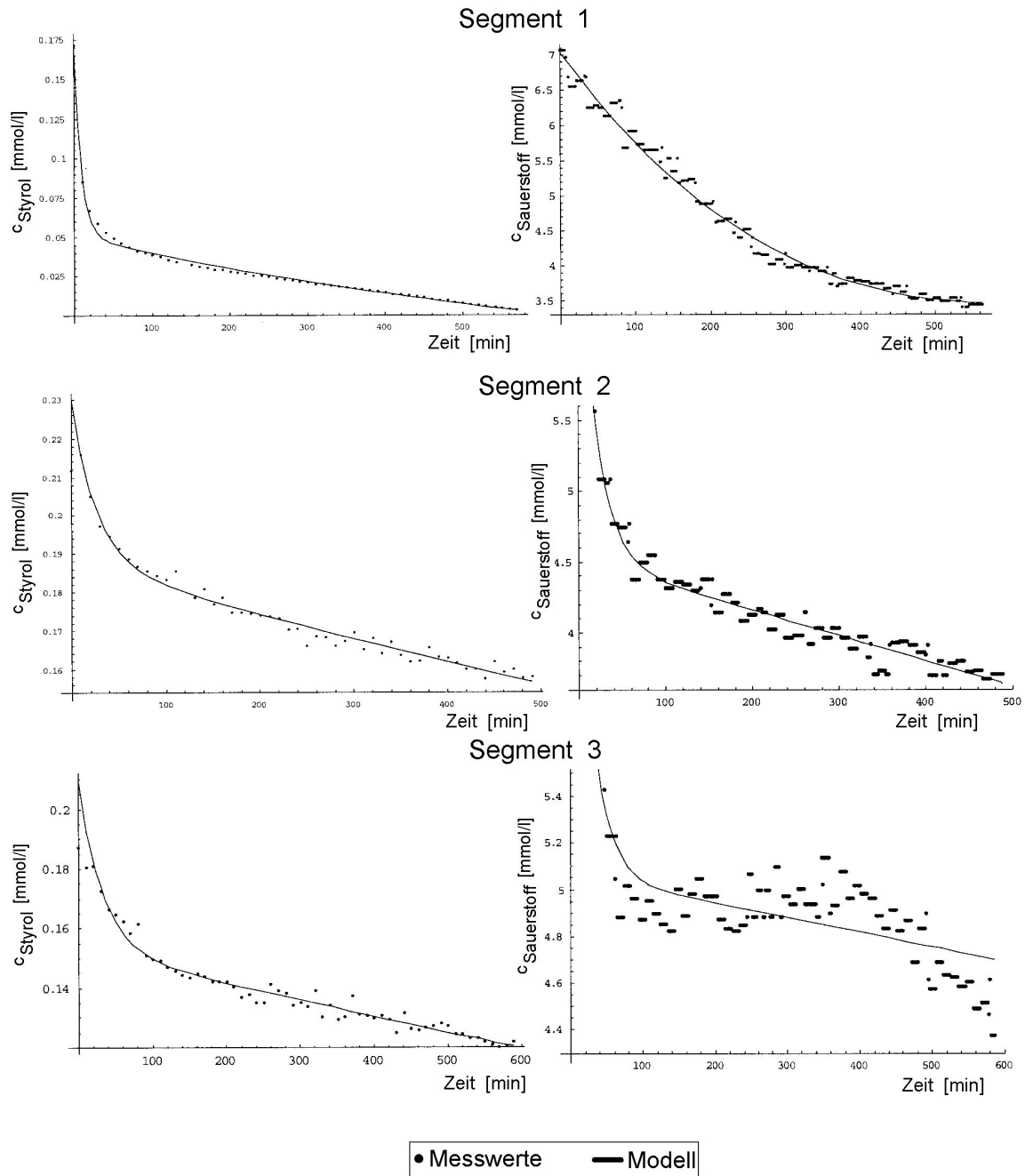


Abbildung 3.14: An den drei Segmenten des Laborbiofilter aus der Gasphase gemessene und modellierte Styrol- und Sauerstoffverbrauchskurven.

Tabelle 3.8: Vergleich der aus dem Gasraum bestimmten Styrolverbrauchs-raten

	$H_S [-]$	$\frac{V_{Gas}}{V_{BF}} [-]$	$k_{1a} [\text{min}^{-1}]$
Reinkultur	0.0267	97.97	0.000266
Segment 1	0.0278	14.62	0.00216
Segment 2	0.0269	159.68	0.000192
Segment 3	0.0429	60.52	0.000366

Tabelle 3.9: Vergleich der aus dem Gasraum bestimmten Styrolverbrauchs-raten

	$\frac{k}{H_O}$ $[\frac{1}{\text{min}}]$	X $[\frac{g_{BTM}}{l}]$	$\frac{k_S}{H_O}$ $[\frac{l}{\text{min} * g_{BTM}}]$	H_O $[-]$
Reinkultur	0.00201	9.56	0.00021	3.07
Segment 1	0.000938	31.82	0.0000295	9.56
Segment 2	0.00302	22.44	0.000135	3.96
Segment 3	0.000941	8.75	0.000108	4.13

genommen werden kann. Somit wird ein Faktor von 0.23 für die Verringerung gegenüber dem Wert für den Verteilungskoeffizienten von Styrol zwischen Luft und Wasser erhalten.

$\frac{V_{Gas}}{V_{BF}}$ -Werte um 100 sind physikalisch sinnvoll. Die angepassten k_{1a} -Werte entsprechen realistischen k_1 Werte von $2 \cdot 10^{-3}$ bis $2 \cdot 10^{-2}$ m/min.

Unter der Annahme, dass die durch die submersen Versuchsreihen bestimmten Reaktionsgeschwindigkeitskoeffizienten für den Styrolabbau k_{S1} gleich der Reaktionsgeschwindigkeitskoeffizienten k_S für den Styrolabbau des Systems Gasphase/Biofilm sind, lässt sich der Verteilungskoeffizient von Sauerstoff zwischen Luft und Biofilm berechnen (Tabelle 3.9). Aus der Berechnung ergibt sich ein mittlere Verteilungskoeffizient H_O von 3.72. Der Berechnete Verteilungskoeffizient H_O für das erste Segment weicht jedoch mit $H_O=9.56$ deutlich von diesem Wert ab. Dies ist dadurch bedingt, dass

durch die Simulationsrechnung ein zu geringer Wert für $\frac{V_{\text{Gas}}}{V_{\text{BF}}}$ von 14.66 angegeben wird. Eine Modellanpassung mit einem physikalisch sinnvolleren Näherungswert von $\frac{V_{\text{Gas}}}{V_{\text{BF}}}=100$ ergibt einen Verteilungskoeffizienten H_O von 2.

Der Verteilungskoeffizient für Sauerstoff zwischen Luft und Wasser beträgt 33. so dass auch hier, in Analogie zu H_S , eine Begünstigung der Löslichkeit von Sauerstoff, d.h. die Verringerung von H_O um den Faktor 0.11 durch die aktive Biomasse wahrscheinlich ist.

Die durch die Styrol- und Sauerstoffverbrauchsmessungen erhaltenen bessere Styrolabbauaktivität im zweiten und dritten Segment im Vergleich zum ersten Segment des Laborbiofilters steht in gutem Einklang mit der hohen Aktivität der Proben aus diesen Segmenten in der Markierungsstudie zur chemotaxonomischen Charakterisierung (Kapitel 3.32).

Da die Messungen sowohl im Submersen als auch in der Gasphase im Styrolsättigungsbereich durchgeführt werden, gelten diese nur für das erste Segment des Laborbiofilters unter Betriebsbedingungen. Wie im Kapitel 3.1 gezeigt wird kann bereits für das zweiten Segment ein Styrolmangel angenommen werden, da die Eingangskonzentration in dieses Segment nur noch ca. 20 % der Biofiltereingangskonzentration beträgt. Die bessere Styrolabbauraten im zweiten und dritten Segment im Vergleich zum ersten machen deutlich, dass sich die Affinität der adaptierten Mikroorganismen bei Substratmangel nicht vermindert, sondern vielmehr verstärkt. Die Mikroorganismen können bei einem geringen Populationsanteil durch eine hohen Substratabbauaktivität bei Substratmangel ihr Überleben im Habitat sichern. Es wird aber auch deutlich, dass der Laborbiofilter hinsichtlich seiner möglichen Abbauleistung nicht ausreichend belastet wird.

Kapitel 4

Zusammenfassung

Die biologische Abluftreinigung ist aufgrund der relativ geringen Investitions- und Betriebskosten sowie der einfachen Handhabung eine in Industrie und Gewerbe häufig genutzte Technik. Mathematisch-mechanistische Modelle dienen dazu, die im Biofilter auftretenden Prozessschritte zu verdeutlichen und die Auslegung und Optimierung zu unterstützen. Dennoch nimmt häufig bereits nach kurzen Betriebszeiten die Abbauleistung der großtechnisch eingesetzten Biofiltern deutlich ab. Ein Grund dafür ist die unzureichende Kenntnis der mikrobiellen Prozesse. Um diese Prozesse jedoch besser verstehen zu können ist die Kenntnis der Art und der Zusammensetzung der Mikroorganismen im Biofilm nötig. Durch eine Identifizierung funktioneller Bakteriengruppen und mit Untersuchungen zu populationsdynamischen Zusammenhängen können Prozessbeschreibungen zur Abluftreinigung mittels mathematisch-mechanistischer Modelle effizienter simuliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit wird die mikrobiologische Besiedlungs- und Diversitätsstruktur in einer dreisegmentigen Laborbiofilteranlage mit aufgeschäumten Glaskugeln als Trägermaterial über 880 Tage untersucht. Als Modellablufsubstanz dient Styrol, das in der Industrie häufig als Abluftbelastung auftritt.

Mittels der klassischen mikrobiologischen Methode werden sechzehn Isolate gewonnen und über ein chemotaxonomisches Verfahren, das auf der Extraktion und Analyse von Membranfettsäuren beruht, charakterisiert. Somit können fünf der Stämme der *Corynebacterinae*, zwei der *Pedobacter*, einer dem *Paenibacillus*, vier der *Microbacteriaceae*, drei der *Xanthomonadaceae* und einer der *Bacillus cereus*-Gruppe zugeordnet werden.

Durch die Analyse der Membranfettsäuren an der Mischkultur auf den Pellets des Biofilters kann durch vorherige Inkubation mit deuteriertem Styrol zwischen Primär- und Sekundärabbauer im Habitat unterschieden werden. Demnach erwiesen sich von den isolierten Stämmen nur vier aus der Gattung der *Microbacteriaceae* als maßgebliche Primärabbauer. Eine Deuterierung der ungesättigten Fettsäure 18:1 cis 11, die in allen α -Proteobakterien vorkommt, deutet darauf hin, dass auch α -Proteobakterien, die nicht isoliert wurden, am Abbauprozess maßgeblich beteiligt sind. Im zweiten Segment der Laborbiofilteranlage tritt zudem Deuteriummarkierung der cis-11-Hexadecensäure auf, die als charakteristische Fettsäure einer unbekannten Population bewertet wird.

Die Auswertung der Gesamtfettsäureprofile der Biofilterproben zeigt, dass die Besiedlung der einzelnen Segmente mit Mikroorganismen sich sowohl voneinander als auch über die Betriebszeit signifikant unterscheiden. Deshalb wird der Biofilter, obwohl nach der gemessenen Abbauleistung eine scheinbare Stationarität vorliegt, hinsichtlich der Populationsdynamik nicht als stabil betrachtet.

Anhand des molekularbiologischen Verfahrens der *in situ* Hybridisierung wird die quantitative Änderung der gesamten Bakterienpopulation sowie der Anteil der Isolate im Biofilm bestimmt. Dazu werden neben aus der Literatur bekannter Hybridisierungssonden, vier neue Sonden zur Detektion der *Corynebacterinae*, der *Pedobacter* und der *Microbacteriaceae* verwendet. Durch das Hybridisierungsverfahren kann gezeigt werden, dass keiner der isolierten Stämme in einem Segment der Biofilteranlage dominant im Biofilm ist. Das Verfahren zeigt vielmehr, dass unbekannte Populationen aus der Klasse der grampositiven Bakterien mit einem hohen Anteil an Guanin und Cytosin in der DNA über einen dominanten Anteil im Habitat verfügen. Für die maßgeblichen Primärabbauer aus der Gattung der *Microbacteriaceae* kann ein Anteil von 5-15 % detektiert werden.

Die für eine mathematische Modellierung nötigen Modellparameter werden in modellunabhängigen Experimenten bestimmt. Es ergibt sich für den experimentell bestimmten Verteilungskoeffizienten für Styrol zwischen Luft und EPS (Extrazellulären Substanzen) ein Wert von $H = 0.078$. Dies zeigt, dass Styrol in EPS besser löslich ist als in Wasser.

Der mittels NMR-Technik experimentell bestimmte Diffusionskoeffizient von Styrol in EPS ist mit $D_s = 9.3 \cdot 10^{-10} \pm 8.6 \cdot 10^{-12} \text{ m}^2/\text{s}$ um das 1.4fache höher als der bislang abgeschätzte Wert. Dies lässt darauf schließen, dass sich hydrophobe Komponenten in der EPS-Matrix befinden, die das Lösen von Styrol begünstigen.

Die Bestimmung der Kinetikparameter erfolgt an mit Biofilm bewachsenen Pellets aus einem Laborbiofilter mit einem Biofilm, der annähernd aus einer Reinkultur besteht, sowie an Pellets aus jedem Segment der Biofilteranlage mit der Mischpopulation im Biofilm. Die Bestimmung der Sauerstoff- und Styrolverbrauchsmessungen werden sowohl nach der submersen Methode als auch aus der Gasphase über dem Biofilm, mit einem faseroptischen Sauerstoffsensor sowie einer photometrischen UV-Sonde, bestimmt. Die mathematisch-mechanistische Modellierung der Messwerte aus der submersen Methode gelingt mittels einer arctan-Funktion, die eine Änderung der Reaktionsgeschwindigkeitskoeffizienten nach Erreichen der kritischen Sauerstoffkonzentration (c_{krit}) zulässt, wobei k_1 die Geschwindigkeitskonstante oberhalb und k_2 die Geschwindigkeitskonstante unterhalb der kritischen Sauerstoffkonzentration. Höhere Sauerstoffwerte als c_{krit} ermöglichen allen aeroben styrolabbauenden Mikroorganismen den Katabolismus. Bei niedrigeren Werten als c_{krit} verstoffwechseln nur die bei niedrigeren Sauerstoffkonzentrationen oder anaeroben Bedingungen aktiven Mikroorganismen Styrol.

Für die modellmässige Auswertung der Messkurven, die in der Gasphase über dem Biofilm gemessen werden, ist es notwendig den Stoffübergang von der Gasphase in den Biofilm mit zuberücksichtigen. Eine Bestimmung der kritischen Sauerstoffkonzentration ist nicht notwendig, da die Messungen zeigen, dass Sauerstoff während der gesamten Versuchszeit in der Gasphase als nicht limitierend wirkt. Die Styrolverbrauchsraten werden auf die Biofilmdichte, die aktive Biofilmdichte und auf den Anteil an Primärabbauer bezogen Biofilmdichte hin beurteilt. Die spezifischen Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten für den nicht durch Sauerstoff limitierten Bereich liegen in einer Spanne von 0.0003 bis 0.0006 $\left[\frac{l}{min * g_{BTM}} \right]$.

Während für die spezifische Abbaurate bezogen auf die Biofilmdichte sich der Biofilter mit der Reinkultur als das stärkste erweist, so sind es für die spezifischen Abbauraten mit der aktive sowie den Anteil an Primärabbauern bezogene Biofilmdichte das zweite und dritte Segment des Biofilters mit der Mischkultur im Biofilm.

Durch die Modellierung der Messwerte aus der Gasphase über dem Biofilm können die Verteilungskoeffizienten von Styrol und Sauerstoff zwischen Luft und Biofilm H_S und H_O berechnet werden. Die berechneten Werte verringern sich für die Verteilungskoeffizienten H_S auf das 0.23fache und H_O auf das 0.11fache gegenüber den Verteilungskoeffizienten der entsprechenden Komponente zwischen Luft und Wasser, so dass davon ausgegan-

gen wird, dass die aktive Biomasse die Löslichkeit von Styrol und Sauerstoff stark begünstigt. Bei Bestätigung dieser Annahme würden die Reaktionsgeschwindigkeitskonstanten im Submersen denen im Gas / Biofilm-System entsprechen.

Da die Messungen im Styrolsättigungsbereich durchgeführt werden, gelten diese nur für das erste Segment des Laborbiofilters unter Betriebsbedingungen. Die Bestimmung der Abbauleistung des Biofilters zeigen, dass im zweiten und dritten Segment ein Styrolmangel vorherrscht. Dass dennoch das zweite und dritte Segment im Vergleich zum ersten bessere Styrolverbrauchsraten aufweisen, macht deutlich, dass durch Substratmangel zwar eine zunehmende Inaktivierung durch Sterben der Mikroorganismen zu erwarten ist, sich aber die Affinität zum Substrat verstärkt. Durch Maßnahmen zur zusätzlichen Beladung der Abluft in entsprechender Biofilterhöhe könnte deshalb das hohe Abbaupotential der oberen Bereiche der Biofilteranlage effektiver genutzt werden.

Literaturverzeichnis

- [ACUNA et al. 1999] ACUNA, ME, F. PEREZ, R. AURIA und S. REVAH (1999). *Microbiological and kinetic aspects of biofilter for the removal of toluene from waste gases*. Biotechnol Bioeng, 63:175–184.
- [ALEXANDRINO et al. 2001] ALEXANDRINO, M, C. KNIEF und A. LIPSKI (2001). *Stable isotope labeling of styrene-degrading microorganisms in biofilters*. Appl Environ Microbiol, 67:4796–4804.
- [AMANN et al. 1995] AMANN, R, W. LUDWIG und K.-H. SCHLEIFER (1995). *Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation*. Microbial Rev, 59:143–169.
- [AMANN et al. 1990] AMANN, RI, B. BINDER, R. OLSON, S. CHISHOLM, R. DEVEREU und D. STAHL (1990). *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analysing mixed microbial populations*. Appl Environ Microbiol, 56:1919–1925.
- [ARNOLD et al. 1997] ARNOLD, M, A. REITTU, A. V. WRIGHT, P. MARTIKAINEN und M. SUIHKO (1997). *Bacterial degradation of styrene in waste gases using a peat filter*. Appl Microbiol Biotechnol, 48:738–744.
- [AURIA et al. 1998] AURIA, R, A. AYCAGUER und J. DEVINNY (1998). *Influence of water content on the degradation capacity of ethanol in biofiltration*. J Air Waste Manag Assoc, 48:65–70.
- [BAGGI et al. 1983] BAGGI, G, M. BOGA, D. CATELANI, E. GALLI und V. TRECCANI (1983). *Styrene catabolism by a strain of Pseudomonas fluorescens*. Syst Appl Microbiol, 4:141–147.
- [BARGEL 1998] BARGEL, P (1998). *Kinetische Untersuchungen am Biofilter*. Diplomarbeit, Universität Paderborn.

- [BESTETTI et al. 1984] BESTETTI, G, E. GALLI, M. RUZZI, G. BALDACCI, E. ZENNARO und L. FRONTALI (1984). *Molecular characterization of a plasmid from Pseudomonas fluorescens involved in styrene degradation*. Plasmid, 12:181–188.
- [BLIGH und DYER 1959] BLIGH, EG und W. DYER (1959). *A rapid method of total lipid extraction and purification*. Can J Biochem Physiol, 37:911–917.
- [BOSCHER und MIDDELBURG 2002] BOSCHER, HTS und J. MIDDELBURG (2002). *Stable isotopes and biomarkers in microbial ecology*. FEMS Microbiol Ecol, 1334:1–12.
- [BOSSIO und SCOW 1998] BOSSIO, DA und K. SCOW (1998). *Impacts of Carbon and Flooding on Soil Microbial Communities: Phospholipid Fatty Acid Profiles and Substrate Utilization Patterns*. Microb Ecol, 35:265–278.
- [BOWMAN et al. 1993] BOWMAN, JP, L. SLY, P. NICHOLS und A. HAYWARD (1993). *Revised taxonomy of the methanotrophs: Description of Methylobacter gen. nov., emendation of Methylococcus, validation of Methylocystis species, and a proposal that the family Methylococcaceae includes only the group methanotrophs*. Int J Syst Bacteriol, S. 735–753.
- [BRAUN-LÜLLEMANN et al. 1997] BRAUN-LÜLLEMANN, A, A. MAJCHERCZYK und A. HÜTTERMANN (1997). *Degradation of styrene by white-rot fungi*. Appl Microbiol Biotechnol, 47:150–155.
- [BROCK et al. 2000] BROCK, TD, T. MADIGAN, J. MARTINKO und J. PARKER (2000). *Biology of microorganisms*. Prentice Hall, Inc, New Jersey USA.
- [BROSIUS et al. 1981] BROSIUS, J, T. DULL, D. SLEETER und H. NOLLER (1981). *Gene organisation and primary structure of a ribosomal RNA operon from Escherichia coli*. J Mol Biol, 148:107–127.
- [BURBACK und PERRY 1993] BURBACK, BL und J. PERRY (1993). *Biodegradation and biotransformation of groundwater pollutant mixtures by Mycobacterium vaccae*. Appl Environ Microbiol, 59:1025–1029.
- [CHARACKLIS und WILDERER 1989] CHARACKLIS, WG und P. WILDERER (1989). *Introduction*. In: CHARACKLIS, WG und P. WILDERER, Hrsg.: *Structure and Funktion of Biofilms*, S. 5–17, New York. John Wiley.
- [CORSI und SEED 1995] CORSI, RL und L. SEED (1995). *Biofiltration of BTEX: media, substrate and loading effects*. Environ Prog, 14:151–158.

- [COSTERON und IRVIN 1981] COSTERON, JW und R. IRVIN (1981). *The bacterial glycocalyx in nature and disease*. Annual Reviews of Microbiology, 35:299–324.
- [COX et al. 1993a] COX, HHJ, J. HOUTMAN, H. DODDEMA und W. HARDER (1993a). *Growth of the black yeast Exophiala jeanselmei on styrene and styrene-related compounds*. Appl Microbiol Biotechnol, 39:372–376.
- [COX et al. 1997] COX, HHJ, R. MOERMANN, S. VAN BALEN, W. VAN HEININGEN, H. DODDEMA und W. HARDER (1997). *Performance of a styrene-degrading biofilter containing the Yeast Exophila jeanselmei*. Biotech Bioing, 53:259–266.
- [DAIMS et al. 1999] DAIMS, H, A. BRÜHL, R. AMANN, K. SCHLEIFER und M. WAGNER (1999). *The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: Development evaluation of a more comprehensive set*. Syst Appl Microbiol, 22:434–444.
- [DECHNO 1990] DECHNO, AW (1990). *Microbial exopolymer secretions in ocean environments: their role(s) in food webs and marine processes..* Oceanogr Mar Biol Annu Rev, 28:73–153.
- [DECRESSIN 1997] DECRESSIN, O (1997). *Biofilter: Modellbildung, Verifikation und Simulation*. Doktorarbeit, Universität Paderborn.
- [DESHUSSES et al. 1995] DESHUSSES, MA, G. HAMER und D. IJ (1995). *Behavior of biofilters for waste air biotreatment. 1. Dynamic model development*. Environ Sci Technol, 29:1048–1058.
- [DIGNAC et al. 1998] DIGNAC, MF, V. URBAIN, D. RYBACKI, A. BRUCHET, D. SNIDARO und P. SCRIBE (1998). *Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure*. Wat Sci Tech, 38:45–53.
- [DRÖGE 1996] DRÖGE, A (1996). *Isolierung und Charakterisierung von Styrol-abbauenden Bakterien aus Biofiltern*. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.
- [FLEMMING 1991] FLEMMING, HC (1991). *Biofilme und Wassertechnologie, Teil I: Entstehung, Aufbau, Zusammensetzung und Eigenschaften von Biofilmen*. gwf Wasser Abwasser, 132:197–207.
- [FLEMMING et al. 1996] FLEMMING, HC, J. SCHMITT und K. MARSHALL (1996). *Sorption properties of biofilms*. In: CALMANO, W und U. FÖRSTNER, Hrsg.: *Environmental behaviour of sediments*, S. 115–157, Michigan. Lewis.

- [FLEMMING und WINGENDER 2001] FLEMMING, HC und J. WINGENDER (2001). *Structural, Ecological and Functional Aspects of EPS*. In: GILBERT, P, D. ALLISON, M. BRADING, J. VERRAN und J. WALKER, Hrsg.: *Biofilm Community Interactions: Chance or necessity?*, S. 175–190, Cardiff. Bioline.
- [FORELL 1999] FORELL, K (1999). *Mathematische Modellierung und Validierung des Styrolabbaus anhand unterschiedlicher Biofiltermaterialien*. Doktorarbeit, Universität Paderborn.
- [FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT 1998] FORSCHUNGSGEMEINSCHAFT, DEUTSCHE (1998). *MAK- und BAT-Werte-Liste 1998..* VCH, Weinheim.
- [FRIEDRICH et al. 1999] FRIEDRICH, U, M. NASISMITH, K. ALTENDORF und A. LIPSKI (1999). *Community Analysis of Biofilters Using Fluorescence In Situ Hybridization Including a New Probe for the Xanthomonas Branch of the Class Proteobacteria*. *Appl Environ Microbiol*, 65:3547–3554.
- [FROSTEGRAD et al. 1993] FROSTEGRAD, A, A. TUNLID und E. BAATH (1993). *Phospholipid fatty acid composition, biomass, and activity of microbial communities from two soil types experimentally exposed to different heavy metals*. *Appl Env Microbiol*, 59:3605–3617.
- [FUCHS et al. 1998] FUCHS, BM, G. WALLNER, W. BEISKER, I. SCHWIPPL, W. LUWIG und R. AMANN (1998). *Flow cytometric analysis of the in situ accessibility of Escherichia coli 16S rRNA for fluorescently labeled oligonucleotide probes*. *Appl Env Microbiol*, 64:4973–4982.
- [GEESEY 1982] GEESEY, GG (1982). *Microbial exopolymers: Ecological and economical considerations*. *ASM News*, 48:9–14.
- [GOLOVLEVA et al. 1988] GOLOVLEVA, LA, A. BORONIN, R. ALIEVA, S. RUSTEMOV, V. KOCHETKOV und G. TUSUPLEKOVA (1988). *a-Methylstyrene and toluene degradation by plasmid carrying strains of Pseudomonas bacteria*. *Izv Akad Nauk SSSR [Biol]*, S. 558–564.
- [GRBIC-GALIC et al. 1990] GRBIC-GALIC, D, N. CHURCHMAN-EISEL und I. MARAKOVIC (1990). *Microbial transformation of styrene by anaerobic consortia*. *J Appl Bacteriol*, 69:247–260.
- [HARTMANS et al. 1989] HARTMANS, S, J. SMITS, M. v. D. WERF und J. D. BONT (1989). *Metabolism of styrene oxide and 2-phenylethanol in styrene-degrading Xanthobacter strain 124X*. *Appl Environ Microbiol*, 55:2850–2855.

- [HIGASHIMURA et al. 1983] HIGASHIMURA, T, M. SAWAMOTO, T. HIZA, M. KARAIWA, A. TSUCHII und T. SUZUKI (1983). *Effekt of methyl substitution on microbial degradation of linear styrene dimers by two soil bacteria*. Appl Environ Microbiol, 46:386–391.
- [HODGE und DEVINNY 1995] HODGE, DS und J. DEVINNY (1995). *Modeling removal of air contend by biofiltration*. J Environ Eng, 121:21–32.
- [HORN und HEMPEL 1997] HORN, H und D. HEMPEL (1997). *Substrate utilization an mass transfer in an autotrophic biofilm system: Experimental results an numerical simulation*. Biotech Bioeng, 53:363–371.
- [HUGENHOLTZ et al. 1998] HUGENHOLTZ, P, B. GOEBEL und N. PACE (1998). *Impact of culture-independent studies on the emerging phylogenetic view of bacterial diversity*. J Bacteriol, 180:4765–4774.
- [JOST 1998] JOST, D (1998). *Die neue TA-Luft*. WEKA Praxishandbuch plus, Augsburg.
- [KAPUSCINSKI 1995] KAPUSCINSKI, J (1995). *DAPI: a DNA-Specific Fluorescent Probe*. Biotechnic & Histochemistry, 70:220–233.
- [KÄMPFER et al. 1996] KÄMPFER, P, R. ERHART, C. BEIMFOHR, J. BÖHRINGER, M. WAGNER und A. R (1996). *Characterization of bacterial communities from activated sluge: culturedependent numerical identification versus in situ identification using group- and genus-specific rRNA-targeted oligunecleotide probes*. Microb Ecol, 32:101–121.
- [LESON und WINER 1991] LESON, G und A. WINER (1991). *Biofiltration: innovative air pollution control technology for VOC emissions*. J Air Waste Manage Assoc, 41:1045–1054.
- [LINN 1999] LINN, A (1999). *Populationsdynamik und Abbauverhalten einer immobilisierten mikrobiellen Mischkultur in Rieselbettreaktor zur biologischen Abluftreinigung*. Doktorarbeit, Technische Universität München.
- [LIPSKI 1999] LIPSKI, A (1999). *Analyse der Mikroorganismengemeinschaften in Biofiltern: Methoden und Möglichkeiten.. Vortrag beim Workshop Biologische Abluftreinigung*, S. Fraunhofer-Institutszentrum Stuttgart.
- [LIPSKI und ALTENDORF 1997] LIPSKI, A und K. ALTENDORF (1997). *Identification of heterotrophic bacteria isolated from ammoniasupplied experimental biofilters*. System Appl Microbiol, 24:448–457.

- [LIPSKI et al. 2001] LIPSKI, A, E. SPIECK, A. MAKOLLA und K. ALTENDORF (2001). *Fatty acid profiles of nitrite-oxidizing bacteria reflect their phylogenetic heterogeneity*. *System Appl Microbiol*, 24:377–384.
- [MANZ et al. 1996] MANZ, H, R. AMANN, W. LUDWIG, M. VANCANNEYT und K. SCHLEIFER (1996). *Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment*. *Microbiology*, 142:1097–1106.
- [MANZ et al. 1992] MANZ, H, R. AMANN, W. LUDWIG, M. WAGNER und K. SCHLEIFER (1992). *Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions*. *Syst Appl Microbiol*, 15:593–600.
- [MEIER et al. 1999] MEIER, H, R. AMANN, W. LUDWIG, M. WAGNER und K. SCHLEIFER (1999). *Specific oligonucleotide probes for in situ detection of a major group of Gram-positive bacteria with a low DNA G+C content*. *Syst Appl Microbiol*, 22:186–196.
- [MOLLER et al. 1996] MOLLER, S, A. PEDERSEN, L. POULSEN, A. ARVIN und S. MOLIN (1996). *Activity and Three-Dimensional Distribution of Toluene-Degrading Pseudomonas putida in a Multispecies Biofilm Assesse by Quantitative In Situ Hybridization and Scanning Confocal Laser Microscopy*. *Appl Env Microbiol*, 62:4632–4640.
- [MOLLER et al. 1998] MOLLER, S, C. STERNBERG, J. ANDERSEN, B. CHRISTENSEN, J. RAMOS, M. GIVSKON und S. MOLIN (1998). *In situ gene expression in mixed-culture biofilms: evidence of metabolic interactions between community members*. *Appl Environ Microbiol*, 64:721–732.
- [NEEF 1997] NEEF, A (1997). *Anwendung der in situ-Eizellidentifizierung von Bakterien zur Populationsanalyse in komplexen mikrobiellen Biozönosen*. Doktorarbeit, Technische Universität München.
- [NEU 1996] NEU, T (1996). *Significance of bacterial surface-active compounds in interaction of bacteria with interfaces*. *Microbiol Reviews*, 60:151–166.
- [NIELSEN und JAHN 1999] NIELSEN, PH und A. JAHN (1999). *Extraction of EPS*. In: WINGENDER, J, T. NEU und H. FLEMMING, Hrsg.: *Microbial Extracellular Polymeric Substances*, S. 49–72, New York. Springer International.

- [O'CONNOR et al. 1995] O'CONNOR, K, C. BUCKLEY, S. HARTMANS und A. DOBSON (1995). *Possible regulatory role for nonaromatic carbon sources in styrene degradation by Pseudomonas putida CA-3*. Appl Environ Microbiol, 61:544–548.
- [O'CONNOR und DOBSON 1996] O'CONNOR, KE und A. DOBSON (1996). *Microbial degradation of alkenylbenzenes*. World J Microbiol Biotechnol, 12:207–212.
- [O'LEARY et al. 2002] O'LEARY, N, K. O'CONNOR und A. DOBSON (2002). *Biochemistry, genetics and physiology of microbial styrene degradation*. FEMS Microbiology Reviews, 26:403–417.
- [OMORI et al. 1974] OMORI, T, Y. JIGAMI und Y. MINODA (1974). *Microbial oxidation of a-methylstyrene and b-methylstyrene*. Agric Biol Chem, 38:409–415.
- [OMORI et al. 1975] OMORI, T, Y. JIGAMI und Y. MINODA (1975). *Isolation, identification and substrate assimilation specificity of some aromatic hydrocarbon utilizing bacteria*. Agric Biol Chem, 39:1775–1779.
- [OTTENGRAF 1986] OTTENGRAF, SPP (1986). *Exhaust gas purification*. In: REHM, H.-J. und E. REEDS, Hrsg.: *Biotechnology*, S. 425–452, Weinheim. VCH.
- [OTTENGRAF et al. 1986] OTTENGRAF, SPP, J. MEESTERS, A. VAN DEN OEVER und H. ROZEMA (1986). *Biological elimination of volatile xenobiotic compounds in biofilters*. Bioprocess Eng, 1:61–69.
- [OTTENGRAF und VAN DEN OEVER 1983] OTTENGRAF, SPP und A. VAN DEN OEVER (1983). *Kinetiks of compound removal from waste gases with a biological filter*. Biotechnol Bioeng, 25:3089–3102.
- [OTTOW und BIDLINGMAIER 1997] OTTOW, JCG und W. BIDLINGMAIER (1997). *Umweltbiotechnologie*. Gustav Fischer.
- [PEDERSEN et al. 1997] PEDERSEN, AR, S. MOLLER, S. MOLIN und E. ARVIN (1997). *Activity of toluene-degrading Pseudomonas putida in the early growth phase of a biofilm for waste gas treatment*. Biotech Bioeng, 54:134–141.
- [PELZ et al. 2001] PELZ, O, A. CHATZINOTAS, A. ZARDA-HESS, W. ABRAHAM und Z. J (2001). *Tracing toluene-assimilating sulfate-reducing bacteria*

- using ^{13}C -incorporation in fatty acids and whole-cell hybridization. FEMS Microbiol Ecol, 38:123–131.
- [RÖMPP 1997] RÖMPP, H (1997). *Römpp Lexikon der Chemie*. Römpp, H AND Falbe, J, Thieme, Stuttgart.
- [ROLLER et al. 1994] ROLLER, C, M. WAGNER, R. AMANN, W. LUDWIG und K. SCHLEIFER (1994). *In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S-rRNA-targeted oligonucleotides*. Microbiology, 140:2849–2858.
- [RUTENFRANZ et al. 1994] RUTENFRANZ, C, W. HOLLEY und M. MENNER (1994). *Einfluß des Wasser-Luft-Verteilungsgleichgewichts von Schadstoffen auf das Einsatzgebiet von Biofilter, Tropfkörper oder Biowäscher*. VDI-Berichte 1104.
- [RUZZI und ZENNARO 1989] RUZZI, M und E. ZENNARO (1989). *pEG plasmid involved in styrene degradation: molekular dimorphism and integration of a segment into the chromosome*. FEMS Microbiol Lett, 59:337–344.
- [SASS et al. 2002] SASS, A, H. RÜTTERS, H. CYPIONKA und H. SASS (2002). *Desulfobulbus mediterraneus sp. nov., a sulfatereducing bacterium growing on mono- and disaccharides*. Arch microbiol, 177:220–233.
- [SASSER 1990] SASSER, M (1990). *Identification of bacteria through fatty acid analysis*. In: KLEMENT, Z, K. RUDOLPH und D. SANDS, Hrsg.: *Methods in Phytobacteriologie*, S. 199–204, Budapest. Akademiai Kiado.
- [SENTHURAN et al. 1997] SENTHURAN, A, V. SENTHURAN, B. MATTIASSEN und R. KAUL (1997). *Lactic Acid Fermentation in a Recycle Batch Reactor Using Immobilized Lactobacillus casei*. Biotechnol Bioeng, 55:841–853.
- [SHAREEFDEEN und BALTZIS 1994] SHAREEFDEEN, Z und B. BALTZIS (1994). *Biofiltration of toluene vapor under steady-state and transient conditions: theory and experimental results*. Chem Eng Sci, 49:4347–4360.
- [SHIRARI und HISATSUKA 1979] SHIRARI, K und K. HISATSUKA (1979). *Isolation and identifikation of styrene assimilating bacteria*. Agric Biol Chem, 43:1595–1596.
- [SPÄTH et al. 1998] SPÄTH, R, H. FLEMMING und S. WUERTZ (1998). *Sorption properties of biofilms*. Wat Sci Tech, 37:207–210.

- [SRIVASTAVA 1995] SRIVASTAVA, KC (1995). *Biodegradation of styrene by thermophilic Bacillus isolates*. In: COPPING, LG, R. MARTIN, J. PICKETT, C. BUCKE und A. BUNCH, Hrsg.: *Opportunities in biotransformations*, S. 53–58, London. Elsevier Applied Science.
- [STOFFELS et al. 1998] STOFFELS, M, R. AMANN, D. LUDWIG, D. HEKMAT und K. SCHLEIFER (1998). *Bacterial community dynamics during start-up of a trickle-bed bioreaktor degrading aromatic compounds*. Appl Environ Microbiol, 64:930–939.
- [STYROL 1990] STYROL (1990). *BUA-Stoffbericht*. Verlag Chemie, Weinheim.
- [SWANSON und WEBSTER 1977] SWANSON, CP und P. WEBSTER (1977). *The Cell*. Prentice Hall, Inc, New Jersey USA.
- [TANNER und STEJSKAL 1995] TANNER, JE und E. STEJSKAL (1995). *Restricted Self-Diffusion of Rotons in Colloidal Systems by Pulsed-Gradient, Spin-Echo Method*. J Chem Physics, 70:220–233.
- [TREVORS 1984] TREVORS, JT (1984). *Electron transport system activity in soil, sediment, and pure cultures*. Critical Reviews in Microbiology, 11:83–100.
- [TSUCHII et al. 1977] TSUCHII, A, T. SUZUKI und Y. TAKAHARA (1977). *Microbial degradation of styrene oligomer*. Agric Biol Chem, 41:2417–2421.
- [UTKIN et al. 1991] UTKIN, IB, M. YAKIMOV, L. MATVEEVA, E. KOZLYAK, I. ROGOZHIN, Z. SOLOMON und A. BEZBORODOV (1991). *Degradation of styrene and ethylbenzene by Pseudomonas species Y2*. FEMS Microbiol Lett, 77:237–242.
- [VAN GROENESTIJN und HESSELINK 1993] VAN GROENESTIJN, JW und P. HESSELINK (1993). *Biotechniques for air pollution control*. Biodegradation, 4:283–301.
- [VESTAL und WHITE 1989] VESTAL, JR und D. WHITE (1989). *Lipid Analysis in Microbial Ecology*. Bioscience, 39:535–541.
- [VILLAYERDE und FERNANDEZ-POLANCO 1999] VILLAYERDE, S und F. FERNANDEZ-POLANCO (1999). *Spatial distribution of respiratory activity in Pseudomonas putida 54G biofilms degrading volatile organic compounds (VOC)*. Appl Microbiol Biotechnol, 51:382–387.

- [WAGNER et al. 1994] WAGNER, M, B. ASSMUS, A. HARTMANN, P. HUTZLER und R. AMANN (1994). *In situ analysis of microbial consortia in activated sludge using fluorescently labelled, rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal scanning laser microscopy*. J Microsc, 176:181–187.
- [WARHURST et al. 1994] WARHURST, AM, K. CLARKE, R. HILL, R. HOLT und C. FEWSON (1994). *Metabolism of styrene by Rhodococcus rhodochrous NCIMB 13259*. Appl Environ Microbiol, 60:1137–1145.
- [WHITE 1983] WHITE, DC (1983). *Analysis of microorganisms in terms of quantity and activity in natural environments*. In: SLATER, JH, R. WHITTENBURY und W. JWT, Hrsg.: *Microbes in their natural environment*, S. 37–66, Cambridge. Cambridge University Press.
- [WHO 1987] WHO (1987). *Air quality guidelines for Europe*. WHO Reg Publ, Eur Ser 23.
- [WILSON und BOUWER 1997] WILSON, LP und E. BOUWER (1997). *Biodegradation of aromatic compounds under mixed oxygen/denitrifying conditions: a review*. J Ind Micobiol Biotechnol, 18:116–130.
- [WINGENDER et al. 1999a] WINGENDER, J, T. NEU und H. FLEMMING (1999a). *Biofilm exopolysaccharides*. In: WINGENDER, J, T. NEU und H. FLEMMING, Hrsg.: *Microbial extracellular polymeric substances*, S. 73–92, Berlin. Springer Verlag.
- [WINGENDER et al. 1999b] WINGENDER, J, T. NEU und H. FLEMMING (1999b). *What are bacterial extracellular polymeric substances?*. In: WINGENDER, J, T. NEU und H. FLEMMING, Hrsg.: *Microbial extracellular polymeric substances*, S. 1–19, Berlin. Springer Verlag.
- [ZARDA et al. 1997] ZARDA, B, D. HAHN, A. CHATZINOTAS, W. SCHÖNHUBER, A. NEEF, R. AMANN und Z. J (1997). *Analysis of bacterial community structure in bulk soil by in situ hybridization*. Arch Microbiol, 168:185–192.
- [ZELLES 1999] ZELLES, L (1999). *Fatty acid patterns of phospholipids and lipopolysaccharides in the characterisation of microbial communities in soil: a review*. Biol Fertil Soils, 29:111–129.

Symbolverzeichnis

EPS Extrazelluläre Substanzen
FAME Fettsäuremethylester
FISH Fluoreszens-*in-situ*-Hybridisierung

CTC 5-Cyano-2,3-ditoloyl-tetrazolium-chlorid
DAPI 2,4-Diaminidino-2-phenylindol

a Anteil der lebenden Biomasse $[-]$
a spezifische Phasengrenzfläche $[m^2]$
 c_{O_2} Konzentration Sauerstoff $[\frac{mmol}{l}]$
 c_S Konzentration Styrol $[\frac{mmol}{l}]$

c_S^{Gas}	gasseitige Konzentration des Styrols	$\left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}}\right]$
c_S^{Bio}	biofilmseitige Konzentration des Styrols	$\left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}}\right]$
c_{krit}	Konzentration des kritischen Sauerstoffverbrauchs	$\left[\frac{\text{mmol}}{\text{l}}\right]$
δ	Länge des Gradientenpulses	$[\text{ms}]$
Δ	Diffusionszeit	$[\text{ms}]$
D	Diffusionskoeffizient	$\left[\frac{\text{m}}{\text{s}}\right]$
γ	gyromagnetisches Verhältnis	$\left[\frac{\text{Hz}}{\text{G}}\right]$
g	Gradientenstärke	$\left[\frac{\text{G}}{\text{cm}}\right]$
H	Verteilungskoeffizient Gas, Biofilm	$[-]$
k	Styrolverbrauchsrate	$\left[\frac{1}{\text{min}}\right]$
k_i	spezifische Verbrauchsrate	$\left[\frac{\text{l}}{\text{min} \cdot g_{\text{BTM}}}\right]$
k_{la}	volumetrischer Stoffübergangskoeffizient Gas, Biofilm	$[\text{min}^{-1}]$
p	Anteil der Primärabbauer	$[-]$
$S(\text{g})/S(0)$	Intensitätsverhältnis der Amplituden	$[-]$
t	Zeit	$[\text{min}]$
V^{Gas}	Volumen der Gasphase	$[\text{l}]$
V^{BF}	Volumen der Biofilmphase	$[\text{l}]$
X	Biofilmdichte	$\left[\frac{g_{\text{BTM}}}{\text{l}}\right]$

Anhang

Minimalmedium für Styrolabbauer

Basismedium:

K ₂ HPO ₄	0,8 g/l
KH ₂ PO ₄	0,2 g/l
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,5 g/l
FeSO ₄ x 7 H ₂ O	0,01 g/l
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,0 g/l
Vitaminlösung	5 ml/l
Spurenelementlösung	1 ml/l
pH	6,7

Spurenelementlösung:

Na ₂ -EDTA	3 g/l
MnCl ₂ x 2 H ₂ O	0,05 g/l
CoCl ₂ x 6 H ₂ O	0,19 g/l
ZnCl ₂	0,041 g/l
H ₃ Bo ₃	0,006 g/l
NiCl ₂ x 6 H ₂ O	0,024 g/l
CuCl ₂	0,002 g/l
Na ₂ MoO ₄ x 2 H ₂ O	0,018 g/l
pH	6,0

Vitaminlösung (sterilfiltrieren und nach dem Autoklavieren zugeben):

Thiamin	0,01 g/l
Nicotinsäure	0,02 g/l
Pyridoxin-HCl	0,02 g/l
p-Aminobenzoessäure	0,01 g/l
Riboflavin	0,02 g/l
Panthoteinsäure	0,02 g/l
Biotin	0,001 g/l
Cyanocobalamin	0,001 g/l
pH	7,0

200 ml Medium in 500 ml Kolben (verschließbar mit Dichtung) + 1 µl Styrol
Inkubation bei 30°C

Modellparameter der Sauerstoffkurven der submersen Messreihe

Reinkultur

BestFitParameters * $a = 0.160205, b = 20.0218, c = 0.0812058, d = -0.00025173$,
 BestFit * $0.0812058 + 0.160205 \bar{a}^{-0.0499456 t} - 0.00025173 t$,

	Estimate	Asymptotic SE	Confidence Interval
ParameterCITable * a	0.160205	0.00467495	0.0935, 0.1694
b	20.0218	1.1778	1862, 22.3574
c	0.0812058	0.00540941	0.04788, 0.0919329
d	-0.00025173	0.0000561712	-0.00036312, -0.00014034

Segment 1

BestFitParameters * $a = 0.191889, b = 59.1866, c = -0.000405052, d = 0.0795776$,
 BestFit * $0.0795776 + 0.191889 \bar{a}^{-0.0168957 t} - 0.000405052 t$,

	Estimate	Asymptotic SE	Confidence Interval
ParameterCITable * a	0.191889	0.0536469	0.054803, 0.298247
b	59.1866	13.7196	2739, 86.3993
c	-0.000405052	0.000315182	-0.00103021, 0.000220107
d	0.0795776	0.0548818	-0.0292802, 0.188435

Segment 2

BestFitParameters * $a = 0.400007, b = 50.9975, c = 0.000909722, d = -0.110852$,
 BestFit * $-0.110852 + 0.400007 \bar{a}^{-0.0196088 t} + 0.000909722 t$,

	Estimate	Asymptotic SE	Confidence Interval
ParameterCITable * a	0.400007	0.0682525	0.24628, 0.53538
b	50.9975	7.87402	3794, 66.6155
c	0.000909722	0.000447464	0.000221787, 0.00170127
d	-0.110852	0.0706032	-0.250893, 0.029189

Segment 3

BestFitParameters * $a = 0.448979, b = 147.453, c = -0.196838, d = 0.000623303$,
 BestFit * $-0.196838 + 0.448979 \bar{a}^{-0.00678183 t} + 0.000623303 t$,

	Estimate	Asymptotic SE	Confidence Interval
ParameterCITable * a	0.448979	0.399959	0.044246, 1.2422
b	147.453	80.0177	2433, 306.149
c	-0.196838	0.400695	-0.991523, 0.597846
d	0.000623303	0.0011401	-0.00163782, 0.00288442

Modellparameter der Sauerstoffkurven der Messungen aus der Gasphase über dem Biofilm

Reinkultur

```

BestFitParameters * a * 4.38482, b * 20.7191, c * - 0.00412295, d * 3.24746 ,
BestFit * 3.24746 + 4.38482 a-0.0482645t - 0.00412295 t,

```

	Estimate	Asymptotic SE	Confidence Interval
a	4.38482	0.0852691	4.19691, 4.55272
b	20.7191	0.709102	19.3228, 22.1155
c	- 0.00412295	0.0000780422	- 0.00427662, - 0.00396927
d	3.24746	0.0257935	3.19667, 3.29825

EstimatedVariance * 0.0224075

Segment 1

```

BestFitParameters * a * 17.2479, b * 676.834, c * 0.0109784, d * - 10.2251 ,
BestFit * - 10.2251 + 17.2479 a-0.00147747t + 0.0109784 t, ParameterCITable *

```

	Estimate	Asymptotic SE	Confidence Interval
a	17.2479	9.5913	- 13321, 36.129
b	676.834	232.829	1496, 1135.17
c	0.0109784	0.00587814	0.000593066, 0.0213499
d	- 10.2251	9.61018	- 29.1434, 8.69314

EstimatedVariance * 0.014473

Segment 2

```

BestFitParameters * a * 2.53953, b * 20.7414, c * - 0.00178765, d * 4.51549 ,
BestFit * 4.51549 + 2.53953 a-0.0482128t - 0.00178765 t,

```

	Estimate	Asymptotic SE	Confidence Interval
a	2.53953	0.0517158	2.43766, 2.6414
b	20.7414	0.754133	19.2559, 22.2269
c	- 0.00178765	0.0000540599	- 0.00189414, - 0.00168116
d	4.51549	0.016693	4.48261, 4.54837

EstimatedVariance * 0.00822498

Segment 3

```

BestFitParameters * a * 0.751347, b * 112.593, c * - 0.00439113, d * 5.68681 ,
BestFit * 5.68681 + 0.751347 a-0.00888152t - 0.00439113 t,

```

	Estimate	Asymptotic SE	Confidence Interval
a	0.751347	0.124251	0.506586, 0.996108
b	112.593	28.7983	56.636, 169.323
c	- 0.00439113	0.00029291	- 0.00496813, - 0.00381413
d	5.68681	0.138396	5.4119, 5.95944

EstimatedVariance * 0.0119438