
Elektrochemisches Monitoring mikrobieller Aktivität

Grundlagen und Anwendung
in der Abwasserreinigung

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktoringenieur

(Dr.-Ing.)

von Diplom-Ingenieur (FH) Dirk Holtmann
geboren am 23.06.1970 in Bremen

genehmigt durch die Fakultät für Verfahrens- und Systemtechnik
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

Gutachter: Herr Prof. Dr. U. Reichl
Herr Prof. Dr. L. Mörl
Herr PD Dr. D. Sell

Promotionskolloquium am 09.09.2005

Ich danke

Herrn Professor Dr. U. Reichl, Universität Magdeburg, für seine engagierte Betreuung der Promotion und seine hilfreichen Anregungen.

Herrn Dr. D. Sell, DECHEMA e.V., für seine intensive und freundschaftliche Betreuung sowie die kritische Durchsicht der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. D. Schinzer, Universität Magdeburg, für die Übernahme des Vorsitzes der Promotionskommission sowie Herrn Prof. Dr. L. Mörl, Universität Magdeburg, für sein Interesse an der Arbeit.

den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Bioverfahrenstechnik für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre, besonders Herrn B. Gödelmann für seine Hilfestellungen bei der Durchführung der Praxisteste und derjenigen, der nicht öffentlich gedankt werden soll, für ihre tatkräftige Unterstützung sowie allen weiteren Mitarbeitern der DECHEMA für die Unterstützung mit Rat und Tat.

Frau Dr. S. Schmid und Frau C. Kemski für ihre freundliche Unterstützung bei den Praxistesten auf den Kläranlagen in Frankfurt-Niederrad und -Sindlingen.

Herrn Dr. G. Zimmer und Herrn A. Schroth sowie ihren Mitarbeitern für ihre Bereitschaft und Unterstützung des Testlaufs des Sensorsystems bei der Abwasserüberwachung der BASF AG in Ludwigshafen.

Herrn M. Molitor sowie seinen Mitarbeitern vom Schwarzbachverband Main-Taunus für die Möglichkeit das Sensorsystem auf den Kläranlagen Kriftel und Kelkheim-Ruppertshain zu testen.

Herrn Dr. J. Wiese von der Universität Kaiserslautern und Herrn S. Kaffenberger von der EAG Darmstadt für die Unterstützung des Testbetriebes in der Abwasserreinigungsanlage Messel.

Herrn Dr. E. Grabert und Herrn R. Uthemann von der Firma Dr. Lange für ihre Unterstützung beim Bau des Prototypen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einsatz eines elektrochemischen Sensors zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität untersucht. Dieser Bioaktivitätssensor (BAS) basiert auf dem Prinzip einer Biobrennstoffzelle. Die Elektronenübertragung von der biologischen Komponente zur Anode des Sensors wird hier für analytische Anwendungen genutzt. Durch online-Bestimmung der mikrobiellen Aktivität mit dem BAS bei der Kultivierung von unterschiedlichen Mikroorganismen mit verschiedenen Stoffwechselwegen konnte gezeigt werden, dass bei allen getesteten Organismen ein Aktivitätssignal messbar war. Die Ergebnisse erlaubten einen quantitativen Vergleich der BAS-Signale. Es zeigte sich unter anderem, dass bei anaeroben Fermentationen von *E. coli* die höchsten Signale gemessen werden konnten. Ursache hierfür ist die Bildung von elektroaktiven Gärprodukten wie Ameisensäure und Wasserstoff. Der Elektronentransport zwischen den Mikroorganismen und der Elektrode des BAS konnte zum Beispiel hinsichtlich der zeitlichen Dynamik und der Konzentration an elektroaktiven Stoffwechselintermediaten charakterisiert werden.

Die praktische Anwendbarkeit des BAS wurde anhand der biologischen Abwasserreinigung dargestellt. Die entsprechenden Untersuchungen wurden sowohl in Laborkläranlagen als auch in kommunalen und industriellen Abwasserbehandlungsanlagen durchgeführt. Mit den Untersuchungen in den Laborkläranlagen wurde gezeigt, dass die Änderungen der mikrobiellen Aktivität aller relevanten Stoffwechselforgänge detektiert werden konnten. Damit steht mit dem BAS erstmals ein Sensorsystem zur Verfügung, mit dem die Aktivitäten sowohl der aeroben hetero- und autotrophen Biomasse als auch der anoxischen Denitrifikanten und der anaeroben Mikroorganismen detektiert werden können. Das BAS-Signal wurde mit etablierten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität verglichen und es konnten die Vorteile des elektrochemischen Systems dargestellt werden.

Die Wirkungen von stoffwechselspezifischen Hemmstoffen auf die Aktivität der Mikroorganismen und damit auf das BAS-Signal wurden in Versuchen mit *E. coli*, *S. cerevisiae* und Belebtschlamm untersucht. Es konnten quantitative Dosis-Wirkungs-Beziehungen aufgezeigt werden.

Für den Einsatz in realen Abwasserbehandlungsanlagen wurde ein Prototyp des BAS entwickelt. Dieser automatisierte Messaufbau wurde in kommunalen und industriellen Abwasserreinigungsanlagen verschiedener Ausbaugrößen erprobt. Im Rahmen dieser Praxisuntersuchungen konnten die Änderungen der mikrobiellen Aktivität während kontinuierlicher und periodischer Fahrweisen aufgezeigt und auftretende Störungen detektiert werden.

Der Einsatz des BAS zur Optimierung der Kläranlagenprozesse wurde am Beispiel einer Steigerung der Raum-Zeit-Ausbeute sowie der Bestimmung des Abbaupotentials im Labormaßstab gezeigt. Weitere Nutzungspotentiale des Sensorsystems wurden im Rahmen der Praxisteste untersucht. Die Laborkläranlage wurde mit dem Softwarepaket SIMBA[®] auf Basis des Modells ASM 1 simuliert. Es konnten die Messergebnisse und die simulierten Werte der mikrobiellen Aktivität quantitativ und qualitativ verglichen werden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass mit dem BAS ein neuartiger Sensor zur Verfügung steht, welcher geeignet ist, die Prozessverläufe in der biologischen Abwasserreinigung online zu detektieren. Weiterhin wurden die Grundlagen des BAS durch die durchgeführten Untersuchungen besser verstanden und damit der Weg für zukünftige weitergehende Nutzungen eröffnet.

The topic of this thesis was the application of an electrochemical sensor to determine microbial activity. This bioactivity sensor (BAS) is based on the principle of a biofuel cell; the electron transfer from the biological component to the anode of the sensor was used for analytical applications.

Online determination of microbial activity using the BAS demonstrated the fact that, when cultivated different microorganisms with different metabolic pathways, an activity signal for all the organisms was measurable. Furthermore the results permitted a quantitative comparison of the BAS signals. It was shown, among other things, that with anaerobic *E. coli* fermentations the highest signals could be measured. The reason for this is the formation of electroactive fermentation products, such as formic acid and hydrogen. Electron transport between the microorganisms and the electrode of the BAS could be characterized, for example, in terms of temporal dynamics and the concentration of electroactive metabolic intermediates.

The practical applicability of the BAS was exemplified by biological wastewater purification. The corresponding investigations were carried out in laboratory-scale purification plants and in municipal and industrial wastewater treatment plants. The investigations in the laboratory purification plants showed that changes in the microbial activity of all relevant metabolic processes could be detected. Thus the BAS is one of the first sensors capable of detecting the activity of aerobic autotrophic and heterotrophic activated sludge and also that of anoxic heterotrophic activated sludge. The BAS signal was compared with established methods for the determination of microbial activity and the advantages of the electrochemical system were presented.

The effects of toxic substances on the activity of microorganisms were investigated in tests with *E. coli*, *S. cerevisiae* and activated sludge; it was possible to show dose-effect relationships with the BAS.

A prototype of the BAS was developed for application in real wastewater treatment plants; this automated measurement set-up was tested in municipal and industrial wastewater treatment plants of different total numbers of inhabitants and population equivalents. In the context of these practical investigations it was possible to measure the changes in microbial activity during continuous and periodic operation and to detect any disturbances that arose. The use of the BAS for the optimization of purification processes was exemplified by an increase in the space-time yield as well as by the determination of the degradation potential in the laboratory plant; further applications of the sensor system were examined in the framework of the practical investigations. The laboratory purification plant was simulated using SIMBA[®] software on the basis of the ASM 1 model; the measurement results and the simulated values of the microbial activity were compared quantitatively and qualitatively.

To summarise, it was demonstrated that the BAS represents a novel sensor which is suitable for detecting the processes in biological wastewater treatment online. Furthermore the investigations conducted resulted in a better understanding of the basic principle of the BAS and thus opened up the way for further applications in the future.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Zielsetzung	4
3	Grundlagen	5
3.1	Grundlagen der elektrochemischen Bestimmung der mikrobiellen Aktivität	5
3.1.1	Funktionsprinzip der elektrochemischen Sensorsysteme	5
3.1.1.1	Mikrobielle Reaktionen in einer Brennstoffzelle	5
3.1.1.2	Elektrodenreaktionen in einer Brennstoffzelle	7
3.1.1.3	Transport der elektroaktiven Substanzen an die Anode	9
3.1.1.4	3-Elektrodensystem	10
3.1.1.5	Artifizielle Elektronenüberträger	11
3.1.2	Entwicklung der Biobrennstoffzellenforschung	13
3.1.3	Elektronentransport	19
3.2	Abwasserreinigung	23
3.2.1	Kohlenstoffabbau im Belebungsverfahren	26
3.2.2	Stickstoffelimination	26
3.2.3	Bemessungsgrundlagen von Kläranlagen	30
3.3	Verfahren zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität	32
3.4	Simulationssoftware	35
4	Material und Methoden	41
4.1	Material	41
4.2	Medien und Puffer	41
4.2.1	M1-Medium	41
4.2.2	AM-Medium	41
4.2.3	Medium 382	42
4.2.4	Komplexmedien für die Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
4.2.5	Mineralmedium für die Kultivierung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
4.2.6	Modifiziertes Eremenco-Medium	43
4.2.7	Medium 11	44
4.2.8	Azotobacter-Medium	45
4.2.9	Medium für Methylobacterium	45
4.2.10	Medium 830 B	46
4.2.11	Abwasser-Medium nach DIN 38412	46
4.2.12	Nitrifikanten-Medium	47
4.2.13	Denitrifikanten-Medium	47
4.2.14	Medium für anaeroben Abbau	48
4.2.15	Sörensen-Puffer	48
4.3	Methoden	48
4.3.1	Stammhaltung der Mikroorganismen	48
4.3.2	Kultivierung der Vorkulturen	48
4.3.3	Analytik	49
4.3.3.1	Optische Dichte	49
4.3.3.2	Biotrockenmasse	49
4.3.3.3	Dehydrogenaseaktivität (TTC-Test)	49
4.3.3.4	Proteingehalt	50

4.3.3.5	Glucose	50
4.3.3.6	Chemischer Sauerstoffbedarf	50
4.3.3.7	Bestimmung des organischen Kohlenstoffes	51
4.3.3.8	Ammonium, Nitrat und Nitrit	51
4.3.3.9	Sauerstoffzehrungsmessungen	52
4.3.4	Elektrochemische Bestimmung der mikrobiellen Aktivität	53
4.3.4.1	Messung mit dem Bioaktivitätssensor	53
4.3.4.2	Untersuchungen mit dem potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystem	54
4.3.5	Batch-Versuche	55
4.3.6	Versuche im Chemostaten	55
4.3.7	Modellkläranlagen	56
4.3.7.1	Laborkläranlage I	56
4.3.7.2	Laborkläranlage II	57
4.3.8	Entwicklung eines Prototypen	59
5	Ergebnisse	63
5.1	Untersuchungen in Abwesenheit von mikrobieller Aktivität	63
5.1.1	Elektronische Charakterisierung des BAS	63
5.1.2	Wirkung verschiedener Chemikalien auf das Messsignal	65
5.1.3	Auswirkungen der Strömungsgeschwindigkeit	68
5.2	Untersuchungen mit Modellorganismen	70
5.2.1	Reproduzierbarkeit von Versuchen	70
5.2.2	Vergleich des BAS-Signals mit etablierten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität und dem 3-Elektrodensystem	71
5.2.2.1	Vergleich mit etablierten Methoden zur Bestimmung des Zellzustandes	71
5.2.2.2	Vergleich zwischen dem 3-Elektrodensystem und dem BAS	75
5.2.3	Stoffwechselltypen und Kultivierungsbedingungen	76
5.2.4	BAS-Signal als Funktion der Zellzahl und der Aktivität der Zellen	84
5.2.5	Wirkung von stoffwechselaktiven Substanzen auf die Signalentstehung	87
5.2.5.1	Hemmwirkungen auf <i>Escherichia coli</i>	87
5.2.5.2	Hemmwirkungen auf <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	91
5.2.6	Untersuchungen zur Charakterisierung des BAS-Signals	95
5.2.6.1	Zeitliche Dynamik nach einer Substrat-Dosierung	95
5.2.6.2	Untersuchungen des Einflusses des direkten Kontakts der Mikroorganismen mit der Anode auf den Elektronentransfer	96
5.2.6.3	Huminstoffe als Mediatoren	96
5.2.6.4	Abschätzung der Konzentration der Elektronendonatoren – Untersuchungen im Chemostaten mit <i>E. coli</i>	98
5.3	Untersuchungen zur Detektion der mikrobiellen Aktivität in Laborkläranlagen	101
5.3.1	Detektion der Aktivität der aeroben, heterotrophen Biomasse	102
5.3.1.1	Startphase eines kontinuierlichen Versuches	102
5.3.1.2	Sprungsignale	104
5.3.1.3	Pulssignale	106
5.3.1.4	Vergleich des Abbaus verschiedener Substrate	108
5.3.1.5	BAS-Signal als Funktion der Zellzahl	111
5.3.1.6	Vergleich zwischen dem BAS-Signal und der Sauerstoffzehrung sowie der Dehydrogenaseaktivität	114
5.3.1.7	Einfluss des Sauerstoffes auf das Signal des Bioaktivitätssensors	117
5.3.2	Bestimmung der Aktivität der Nitrifikanten	118

5.3.3	Bestimmung der Aktivität der Denitrifikanten	123
5.3.3.1	Diskontinuierliche Versuchsführung	123
5.3.3.2	Kontinuierliche Versuchsdurchführung	124
5.3.4	Bestimmung der Aktivität anaerober Stoffwechselforgänge	126
5.3.5	Parallele Bestimmung der mikrobiellen Aktivitäten	127
5.3.5.1	Auto- und heterotrophe, aerobe Mikroorganismen	128
5.3.5.2	Betrieb der Laborkläranlage II mit gleichzeitiger Denitrifikation, Nitrifikation und Kohlenstoffabbau	129
5.3.6	Vergleich der Peakflächen des BAS mit aus der Substratumsetzung berechenbaren Größen	132
5.3.7	Wirkung von Stoffwechselgiften auf die mikrobielle Aktivität	133
5.3.8	Experimentelle Abgrenzung zwischen dem BAS-Signal und dem Redoxpotential	136
5.4	Potentiostatisch geregeltes 3-Elektrodensystem	138
5.4.1	Selektive Erfassung der aeroben hetero- und autotrophen Biomasse	138
5.4.2	Quantitative Bestimmung der Hemmwirkung auf Belebtschlamm	139
5.5	Praxistest des Prototypen	142
5.5.1	Kommunale Kläranlagen	142
5.5.1.1	ARA Frankfurt-Niederrad	142
5.5.1.2	ARA Frankfurt-Sindlingen	146
5.5.1.3	ARA Kriftel	149
5.5.1.4	ARA Kelkheim-Ruppertshain	151
5.5.1.5	Kläranlage Messel	153
5.5.2	Überwachung von Betriebsabwässern in der chemischen Industrie	155
5.5.2.1	Toximeter 1	156
5.5.2.2	Toximeter 4	158
5.6	Steuerungen und Regelungen auf Basis der mikrobiellen Aktivität	159
5.6.1	Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA)	159
5.6.2	Bestimmung des Abbaupotentials	161
5.7	Modellierung und Simulation der Modellkläranlage und der mikrobiellen Aktivitäten	164
5.7.1	Modell der Laborkläranlage II	164
5.7.2	Simulation einer Anlaufphase in der Laborkläranlage	166
5.7.3	Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Aktivitäten	168
6	Zusammenfassung und Diskussion	175
6.1	Untersuchungen in Abwesenheit von mikrobieller Aktivität	175
6.2	Untersuchungen mit Modellorganismen	177
6.2.1	Vergleich des elektrochemischen BAS-Signals mit etablierten Testmethoden	178
6.2.2	BAS-Signale bei der Kultivierung verschiedener Stoffwechselformen	180
6.2.3	Wirkung von stoffwechselaktiven Substanzen auf die mikrobielle Aktivität	185
6.2.4	Charakterisierung der BAS-Signale	187
6.3	Messung der mikrobiellen Aktivität in der biologischen Abwasserreinigung im Laborbetrieb	191
6.3.1	Detektion der mikrobiellen Stoffwechselforgänge der biologischen Abwasserreinigung	191
6.3.2	Detektion der Wirkung von Hemmstoffen auf Belebtschlammorganismen	197

6.3.3	Abgrenzung des BAS-Signals von dem Redoxpotential	200
6.4	Einsatz des Bioaktivitätssensors auf Abwasserreinigungsanlagen	201
6.5	Nutzung des BAS-Signals	205
6.5.1	Steuerungs- und Regelungskonzepte auf Basis des BAS-Signals	205
6.5.2	Modellierung und Simulation der Modellkläranlage und der mikrobiellen Aktivitäten	208
7	Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis	211
7.1	Abbildungsverzeichnis	211
7.2	Tabellenverzeichnis	214
7.3	Formelverzeichnis	215
8	Literaturverzeichnis	216
9	Anhang	223
9.1	Reaktionsgleichungen, Bildungsenthalpien und Redoxpotentiale	223
9.2	Hemmwirkung auf Mikroorganismen: Angleichung mittels logistischer Gleichung	225
9.3	Technische Zeichnungen und Fotografien des Bioaktivitätssensors	226
9.4	Funktionen der Simulation der Laborkläranlage II	228
9.4.1	Funktion tgang3.m	228
9.4.2	Zulauffraktionierung laut der Datei tg_asmlm.conv	228

Abkürzungs- und Symbolverzeichnis

A	Elektrodenfläche in cm^2
ADP	Adenosindiphosphat
AE	Arbeitselektrode
AQDS	Anthrachinon-2,6-disulfonat
ARA	Abwasserreinigungsanlage
ASM 1	Activated Sludge Model Nr. 1
ATP	Adenosintriphosphat
ATV	Abwassertechnische Vereinigung
BAS	Bioaktivitätssensor
$\text{BAS}_{\text{Anstieg}}$	Anstieg des BAS-Signals
$\text{BAS}_{\text{spez.}}$	Spezifisches BAS-Signal
BB	Belebungsbecken
B_R	Raumbelastung
BSB	biochemischer Sauerstoffbedarf
B_{TS}	Schlammbelastung
c_D	Konzentration der Ionen an der Elektrodenoberfläche
c_L	Konzentration der Ionen in der Lösung
CSB	chemischer Sauerstoffbedarf
d	Dicke der Diffusionsgrenzschicht
D	Diffusionskoeffizient
DB	Denitrifikationsbecken
DC	gelöster Kohlenstoff
DEV	Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchungen
DH	Dehydrogenasen
DIC	gelöster anorganischer Kohlenstoff
DIN	Deutsches Institut für Normung e.V.
DOC	gelöster organischer Kohlenstoff
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
e^-	Elektronen
E	Potential
E^0	Standardpotential
E_H	Redoxpotential
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
EW	Einwohnerwerte
F	Faraday-Konstante ($96487 \text{ A s mol}^{-1}$)
FAD	Flavinadenindinucleotid
F_{AW}	Abwasserzulauf
FE	Flächeneinheiten
F_{luft}	Zuluftstrom
F_{RS}	Rücklaufschlammstrom
$F_{\text{ÜS}}$	Überschussschlammstrom
g	Erdbeschleunigung
GE	Gegenelektrode
HNQ	2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon

IWA	International Water Association
I_{Grenz}	Diffusionsgrenzstrom
Med	Mediator
n	Anzahl der übertragenen Elektronen
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NB	Nachklärbecken
NH_4N	Ammonium-Stickstoff
NO_2N	Nitrit-Stickstoff
NO_3N	Nitrat-Stickstoff
P	Produkt
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluoroethylen
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	allg. Gaskonstante ($8,314 \text{ J K}^{-1}\text{mol}^{-1}$)
R	Rezirkulationsverhältnis
R^2	Bestimmtheitsmaß
RE	Referenzelektrode
rpm	Umdrehungen pro Minute
RV	Schlammrücklaufverhältnis
S	Substrat
SD	Standardabweichung
τ	Verweilzeit
T	Temperatur
TC	gesamter Kohlenstoff
TIC	gesamter anorganischer Kohlenstoff
TOC	gesamter organischer Kohlenstoff
TTC	2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid
V	Reaktorvolumen
V_{BB}	Füllvolumen Belebungsbecken
V_{DB}	Füllvolumen Denitrifikationsbecken
V_{NB}	Füllvolumen Nachklärbecken
X	Biomassekonzentration

1 Einleitung

Der Stoffwechsel der Mikroorganismen ist der zentrale Faktor bezüglich der Leistungsfähigkeit für alle mikrobiellen Prozesse. Durch diese Aktivität können erwünschte Produkte wie Lebensmittel, Lebensmittel- und Futterzusätze, Grundchemikalien sowie Antibiotika oder unerwünschte Nebenprodukte wie Toxine hergestellt werden. Daneben ist auch das Auftreten von Organismen in Trinkwasser oder Lebensmitteln eine indirekte Folge der mikrobiellen Aktivität. Des Weiteren kann die Aktivität der Mikroorganismen für den Abbau von unerwünschten Substanzen in der Umweltbiotechnologie eingesetzt werden. Hier steht die Elimination oder Transformation der Substanzen im Mittelpunkt der Prozesse, um negative Auswirkungen auf die Umwelt zu vermeiden. Für die Anwendung der biologischen Abwasserreinigung ist laut Miksch das Hauptmerkmal der mikrobiellen Aktivität die Fähigkeit zur Entnahme und zur Verstoffwechslung der Abwasserinhaltsstoffe. Die so definierte Aktivität der Mikroorganismen korreliert mit der Eliminierungsgeschwindigkeit des Substrates aus dem Abwasser (MIKSCH 1985). Bei dieser Definition werden der Sekundärmetabolismus und das Vorhandensein der Mikroorganismen nicht berücksichtigt.

Wesentliche Einflussfaktoren auf die mikrobielle Aktivität sind die Konzentration und Abbaubarkeit der Substrate, Zellzahl, Milieubedingungen sowie toxische und inhibierende Einflüsse. Solange die Milieubedingungen für die Mikroorganismen keinen negativen Einfluss auf das Wachstum und den Stoffwechsel der Mikroorganismen aufweisen, sollte die mikrobielle Aktivität weitestgehend von dem Substratangebot abhängen. In der Abbildung 1-1 ist eine allgemeine Reaktionsgleichung für die aerobe Umsetzung eines Substrates dargestellt, entsprechende Gleichungen lassen sich ebenfalls für anaerobe und anoxische Prozesse formulieren.

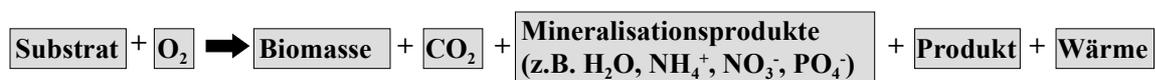


Abbildung 1-1: Schematische Darstellung der aeroben mikrobiellen Vorgänge beim Substratabbau

Die Basis der biologischen Abwasserreinigungsverfahren ist, dass die Reinigungsleistung durch die Stoffwechselaktivität der Bakterien erfolgt. Daher ist es für den Betreiber einer biologischen Kläranlage wichtig zu wissen, in welcher Weise das eingeleitete Abwasser die Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen beeinflusst. Da sowohl die Abbauleistung als auch die Langzeitstabilität der biologischen Abbauprozesse durch die Aktivität der Organismen und die Konzentration der am Stoffabbau beteiligten heterotrophen und autotrophen

Biomasse bestimmt werden (OSWALD et al. 1998), kann eine Aussage über die Effektivität der Abwasserreinigungsanlage durch die Messung der Aktivität der Mikroorganismen getroffen werden. Ziel einer solchen Bioaktivitätssensorik ist daher die qualitative und quantitative Charakterisierung der Mikroorganismen. Daneben ist es mit Hilfe der Aktivitätssensorik auch möglich, das Abbaupotential von Mikroorganismenkulturen zu ermitteln (HERTEL und LEIFHEIT 1996).

Die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität kann in einer ersten Stufe dazu dienen, das Verständnis der komplexen dynamischen Vorgänge in einer Abwasserreinigungsanlage zu verbessern und in einer zweiten Stufe die Prozesse auf Basis der Aktivitätssignale zu optimieren. Ausgangspunkt für optimierte Verfahren in der Abwassertechnik müssen dabei nicht immer Verbesserungen der bestehenden Regelungen sein, auch neuartige Messverfahren und die entsprechenden innovativen Regelungen können beträchtliche Einsparungen von Energie- und Hilfsstoffen hervorrufen (JUMAR und SEIBERT-ERLING 1998).

Die Aufrechterhaltung der verschiedenen parallel ablaufenden Bioeliminationen von Kohlenstoff-, Stickstoff- und Phosphorverbindungen bei der kontinuierlichen Abwasserreinigung stellt einen sensiblen Gesamtprozess dar. Dieser wird durch toxische Komponenten, Substratstöße und verfahrenstechnische Eingriffe vielfach empfindlich gestört. Ziel für die Betreiber von Abwasserreinigungsanlagen muss es somit sein, potentiell negative Wirkungen auf die Prozess-Mikroorganismen kontinuierlich zu beurteilen. Ein effektiver Schutz ist jedoch nur möglich, wenn geeignete Messmethoden vorliegen, die zeitnah, biospezifisch und zuverlässig die Einflüsse auf die mikrobielle Aktivität detektieren (LEIFHEIT und MOHR 2000). Dabei können solche Analysatoren zur laufenden Überwachung der Kläranlagenfunktion und des Reinigungserfolges, zur vorrübergehenden Ermittlung von Planungsdaten für neue Kläranlagen oder die Erweiterung bestehender Anlagen, zur Prozessautomatisierung und zur generellen Informationsgewinnung eingesetzt werden.

Im Gegensatz zu gezielten Fermentationen in der biotechnologischen Forschung und Produktion sind eine Vielzahl von Parametern bei der biologischen Abwasserreinigung vorgegeben, so dass nicht sichergestellt werden kann, dass die Milieubedingungen optimal für das Wachstum und den Stoffwechsel der Mikroorganismen sind. Die Zulaufmengen sind zeitlich nicht konstant und können mit Ausnahme einer gezielten Bewirtschaftung des Kanalnetzes und von Pufferbehältern nicht beeinflusst werden. Die Konzentrationen der Nährstoffe im Abwasser können stark variieren, das Verhältnis der Makronährstoffe Kohlenstoff, Stickstoff und Phosphor kann dabei ungünstige Werte für eine wirkungsvolle Elimination der Substanzen annehmen. Das Abwasser weist, verglichen mit einem Fermentationsmedium, eine relativ

geringe Substratkonzentration auf, so dass die Mikroorganismen nicht mit ihrer maximalen Wachstumsrate wachsen können. Da im Allgemeinen die biologischen Abwasserreinigungsstufen nicht temperiert sind, schwanken die Temperaturen jahreszeitlich und können stark von der optimalen Wachstumstemperatur der Mikroorganismen abweichen. Die Biozönose in der Abwasserreinigung stellt immer eine Mischkultur der verschiedenartigsten Mikroorganismen dar, welche sich je nach den Bedingungen in der Kläranlage einstellt. Daher muss hinsichtlich der vorhandenen Organismen immer von einem dynamischen System ausgegangen werden. Weiterhin treten auch inhibierende und toxische Stoffe im Zulauf einer Abwasserreinigungsanlage auf. Da eine Vielzahl von verschiedenen Stoffen auf die Aktivität der Mikroorganismen einwirken, ist eine Einzelstoffanalytik nicht durchführbar und die Analyse des Abwassers erfolgt über Summenparameter, welche aber dementsprechend nur eine begrenzte Aussagekraft für die Wirkung auf die Mikroorganismenbiozönose in den Reinigungsanlagen besitzen. Um eine hohe Aktivität der Mikroorganismen und damit eine weitestgehende Elimination der Inhaltsstoffe zu gewährleisten, muss in der biologischen Abwasserreinigung die Verfahrenstechnik auf die schwankenden Bedingungen abgestimmt werden. Dieses ist nur möglich, wenn eine geeignete Messtechnik zur Verfügung steht, mit der die Änderungen der mikrobiellen Aktivität oder sämtlicher Parameter, welche diese Aktivität beeinflussen, erfasst werden können.

Aus den in der Abbildung 1-1 dargestellten Vorgängen ergibt sich eine Vielzahl von möglichen Messgrößen, welche proportional zum Substratabbau und damit zur mikrobiellen Aktivität sind. Messtechnisch lassen sich zum Beispiel Substratabbau, Sauerstoffverbrauch, Bildung von Biomasse, Produkt oder Kohlendioxid, Wärmeentwicklung sowie Änderungen der Bedingungen im Medium (pH-Wert, Redoxpotential, Leitfähigkeit), die entsprechenden Enzymaktivitäten und die Konzentrationen an zellulären Bestandteilen wie NADH, mRNA und ATP erfassen. Allerdings kann aus den Messergebnissen eines einzelnen Parameters nicht zwingend auf die mikrobielle Aktivität geschlossen werden. Bei der inhomogenen Zusammensetzung des Abwassers ist zum Beispiel die Bestimmung einer spezifischen Enzymaktivität nicht geeignet, um auf die mikrobielle Aktivität der gesamten Mikroorganismenkultur in der Reinigungsanlage zurückzuschließen, eine mögliche Ursache einer veränderten Enzymaktivität kann zum Beispiel die Abwesenheit des induzierenden Substrates sein. Die gravimetrische Messung des Biomassegehalts erlaubt keine Aussage über die Konzentration an aktiver Biomasse, da nicht zwischen aktiver und inaktiver Biomasse unterschieden werden kann.

2 Zielsetzung

Die zuvor getroffenen Aussagen haben die Notwendigkeit zur Entwicklung eines geeigneten Messverfahrens zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in der biologischen Abwasserreinigung aufgezeigt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einsatz eines elektrochemischen Bioaktivitätssensors (BAS) zur Bestimmung der Aktivität von Mikroorganismen in der biologischen Abwasserreinigung untersucht.

Zu Beginn der Arbeiten sollten Untersuchungen in zellfreien Systemen und mit Modellorganismen, wie zum Beispiel *Escherichia coli*, durchgeführt werden. In diesen Untersuchungen sollte das Verständnis der Zusammenhänge, welche zur Entstehung des Bioaktivitätssignals führen, erweitert werden. Die Ergebnisse sollten daneben qualitative und quantitative Beschreibungen der BAS-Signale ermöglichen. Um die Einsatzmöglichkeiten des Bioaktivitätssensors in der biologischen Abwasserreinigung aufzeigen zu können, wurden im zweiten Teil der Arbeit Untersuchungen in Laborkläranlagen durchgeführt. Hier konnten Eingriffe in den Prozess durchgeführt und die entsprechenden Änderungen der mikrobiellen Aktivität aufgezeichnet werden. Die dritte Stufe der Untersuchungen hatte das Ziel, die Praxistauglichkeit der elektrochemischen Aktivitätsbestimmung auf kommunalen und industriellen Kläranlagen aufzuzeigen. Für diese Anwendung sollte ein Prototyp auf Basis des Aktivitätssensors entwickelt und dieser unter den nicht idealisierten Bedingungen auf Abwasserreinigungsanlagen erprobt werden. Daneben sollten Regelungskonzepte auf der Grundlage des BAS-Signals dargestellt und im Labormaßstab getestet sowie der Einsatz des BAS im Rahmen der dynamischen Simulation von Abwasserreinigungsanlagen untersucht werden.

3 Grundlagen

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Nutzung einer Biobrennstoffzelle als Sensor für die mikrobielle Aktivität in der biologischen Abwasserreinigung, daher sollen im Weiteren die Grundprinzipien und Anwendungsmöglichkeiten der Biobrennstoffzellen dargestellt werden. Zum Verständnis der generellen Vorgänge in den Brennstoffzellen werden die Mechanismen des Elektronentransfers zwischen biologischen Komponenten und Elektroden zusammengefasst. Daneben werden die Reaktionen und die Verfahrenstechnik der Abwasserreinigung kurz dargestellt. Weiterhin werden etablierte Verfahren zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in der Abwassertechnik beschrieben sowie die Grundlagen der Simulation der biologischen Abwasserreinigung erläutert.

3.1 Grundlagen der elektrochemischen Bestimmung der mikrobiellen Aktivität

3.1.1 Funktionsprinzip der elektrochemischen Sensorsysteme

Der Bioaktivitätssensor (BAS) basiert auf einer Biobrennstoffzelle, welche für analytische Zwecke eingesetzt wird. Brennstoffzellen sind elektrochemische Systeme, in denen chemische Energie durch Oxidationsprozesse direkt in elektrische Energie umgesetzt wird. Als Biobrennstoffzellen bezeichnet man Systeme, bei denen die Elektrokatalyse an einer oder an beiden Elektroden der Brennstoffzelle von einer biologischen Komponente geleistet wird. Die chemische Energie wird dann durch die enzymatischen Oxidationsreaktionen in einen Stromfluss umgesetzt. Die Reaktionen können dabei von isolierten Enzymen oder ganzen Zellen durchgeführt werden. Beim BAS wird der Strom der Biobrennstoffzelle als Maß für die mikrobielle Aktivität verwendet.

3.1.1.1 Mikrobielle Reaktionen in einer Brennstoffzelle

In der Abbildung 3-1 sind die Reaktionen, die zur Entstehung des Stroms in einer Biobrennstoffzelle und damit auch zur Entstehung des Signals des Bioaktivitätssensors bei Einsatz von Mikroorganismen führen, dargestellt.

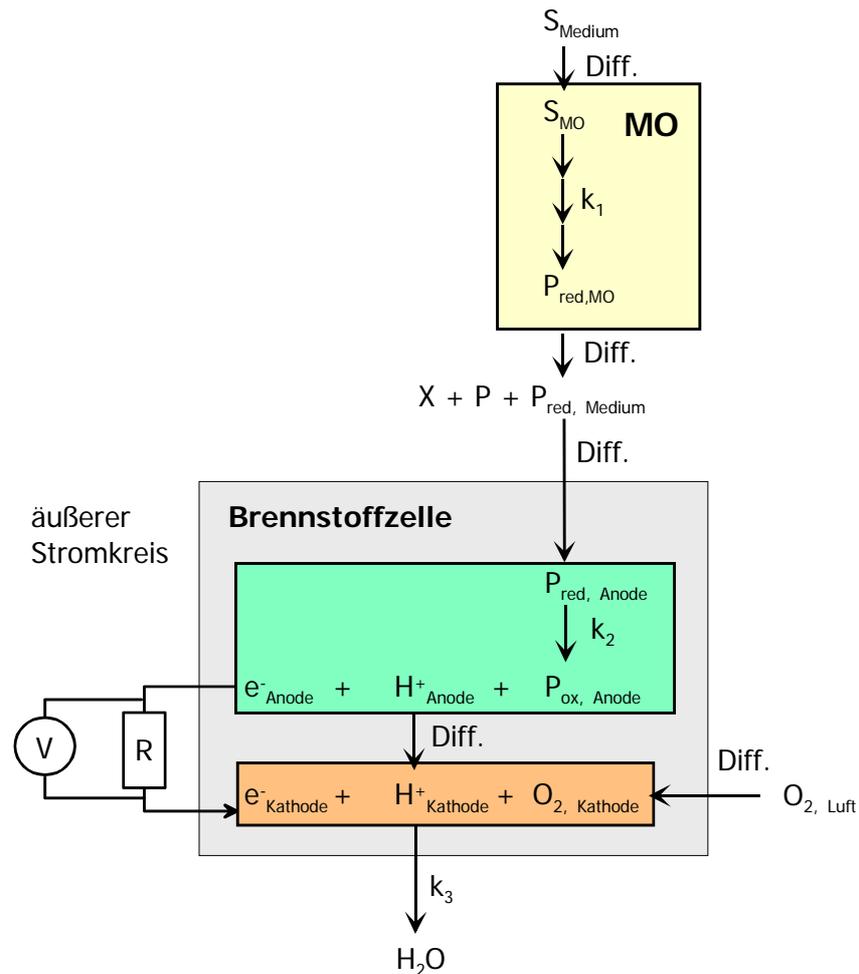


Abbildung 3-1: Prinzip der Entstehung des Stromflusses in einer Brennstoffzelle bzw. des Signals des Bioaktivitätssensors

Die Messung basiert auf der Erfassung eines Elektronenflusses, der durch den mikrobiellen Energiestoffwechsel induziert wird. Das Substrat S_{Medium} ist zunächst in der flüssigen Phase gelöst und gelangt durch einen Diffusionsprozess an die Zellmembran des Mikroorganismus MO und wird in die Zelle transportiert. Im Zellinneren findet der biochemische Abbau des Substrates S_{MO} statt. Die Mikroorganismen oxidieren die Substrate mit der Geschwindigkeitskonstanten k_1 . Im Rahmen dieser intrazellulären Prozesse entsteht einerseits weitere Biomasse X, verschiedene oxidierte Stoffwechselprodukte (P), wie zum Beispiel Kohlendioxid und Wasser, sowie reduzierte Stoffwechselprodukte $P_{\text{red,MO}}$. Die Reaktionsprodukte der Zelle gelangen durch Diffusionsprozesse durch die Zellmembran und verteilen sich anschließend im Medium $P_{\text{red,Medium}}$. Diese Reaktionen sind so lange möglich, wie die Mikroorganismen aktiv sind, d.h. wie sie im Medium verwertbares Substrat vorfinden und keine Inhibierungen auftreten.

Die Produkte $P_{\text{red,Medium}}$ gelangen an die Anode der Brennstoffzelle und werden hier mit Geschwindigkeitskonstanten k_2 oxidiert ($P_{\text{ox,Anode}}$). Durch diesen Prozess werden Elektronen an

die Anode abgegeben. Diese Elektronen e^-_{Anode} wandern durch den äußeren Stromkreis und werden dort an der Kathode (e^-_{Kathode}) mit Sauerstoff und Protonen zu Wasser umgesetzt.

3.1.1.2 Elektrodenreaktionen in einer Brennstoffzelle

Mit einer Brennstoffzelle wird das Potential (E) zwischen der Kathode und der Anode gemessen und mit Hilfe des bekannten Widerstandes kann der fließende Strom berechnet werden. Die Potentialdifferenz zwischen den Elektroden errechnet sich nach der Formel 3-1:

$$E = E_{\text{Kathode}} - E_{\text{Anode}}$$

oder mit Berücksichtigung der kinetischen Hemmung der Elektrodenreaktionen (Überspannung) an der Anode und Kathode:

$$E = (E_{\text{Kathode}} - \eta_{\text{Kathode}}) - (E_{\text{Anode}} - \eta_{\text{Anode}})$$

Formel 3-1: Potentialdifferenz in einer Brennstoffzelle

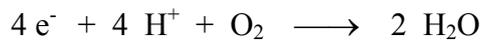
Bei der verwendeten Biobrennstoffzelle wird als Kathode eine Sauerstoffdiffusionskathode verwendet, damit entspricht das Potential an der Kathode dem Normalpotential des O^{2-}/O_2 -Redoxsystems $E_0' = 820 \text{ mV}$ (bei pH 7.0 und 25°C) und kann als konstant angenommen werden, da sich die Sauerstoffkonzentration in der Umgebungsluft nur minimal ändert. Das Potential an der Anode entspricht dem Redoxpotential in dem Medium, bei aeroben Prozessen liegt dieses Potential bei 200 mV gegen Silber/Silberchlorid entsprechend ca. 400 mV gegen die Normalwasserstoffelektrode. Die anfängliche Potentialdifferenz zwischen den Elektroden beträgt damit im stromlosen Zustand ca. 400 mV und steigt durch das Absinken des Redoxpotentials in dem Medium weiter an. Durch den fließenden Strom in der Brennstoffzelle verändert sich die Potentialdifferenz zwischen den Elektroden.

Theoretisch können damit alle Substanzen, deren Normalpotentiale unter diesem Bereich liegen, an der Anode der Brennstoffzelle oxidiert werden, durch Überspannungseffekte und der sterischen Hinderung bei größeren Molekülen (z.B. Enzymen) werden dagegen lediglich ein Teil der möglichen Moleküle in der Biobrennstoffzelle umgesetzt. Als Beispiele für theoretisch umsetzbare Substanzen in der Brennstoffzelle sind NADH, FADH, Acetat, Lactat, Ameisensäure, Wasserstoff, Succinat sowie die reduzierten Formen vom Menachinon, Ubichinon und den Cytochromen b, c_1 , a_3 zu nennen (die Redoxpotentiale sind im Anhang in der Tabelle 9-2 angegeben). Die Anodenreaktion in einer Biobrennstoffzelle kann damit als Konkurrenz zur Übertragung von Elektronen auf Stoffwechselintermediate wie NAD oder Chinon bzw. eine Übertragung auf den molekularen Sauerstoff angesehen werden.

Die Übertragung der Energie aus biochemischen Reaktionen zwischen den anabolen und katabolen Stoffwechselreaktionen erfolgt durch Redoxreaktionen zwischen entsprechenden Elektronendonatoren und –akzeptoren, wie zum Beispiel NADH und NAD. Bei den Redoxreaktionen werden die Elektronen von einem Elektronendonator abgegeben und von einem Elektronenakzeptor aufgenommen. Für die Reaktion an der Anode und Kathode in der Brennstoffzelle lassen sich die folgenden Gleichungen für die Halbzellenreaktionen angeben:



Reaktionsgleichung 3-1: Anodenreaktion des BAS



Reaktionsgleichung 3-2: Kathodenreaktion des BAS

Diese Redoxgleichungen lassen sich mit der NERNST - Gleichung beschreiben:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[OX]}{[RED]}$$

Formel 3-2: NERNST-Gleichung

E	Potential in V
E^0	Standardpotential in V
R	allg. Gaskonstante ($8,314 \text{ J K}^{-1} \text{ mol}^{-1}$)
T	Temperatur in K
n	Anzahl der übertragenen Elektronen pro Molekül
F	Faraday-Konstante ($96487 \text{ A s mol}^{-1}$)
[OX]	Konzentration an oxidierten Stoffen
[RED]	Konzentration an reduzierten Stoffen

In einer Halbzellenreaktion ist das Potential E ein Maß für die Tendenz einer Substanz oxidiert oder reduziert zu werden und wird als Redoxpotential der Substanz bezeichnet. Für die Berechnung dieser Potentiale ist damit die Kenntnis der Konzentrationen der beteiligten Stoffe und des Standardpotentials notwendig. Diese Voraussetzungen können in komplexen biologischen Prozessen im Allgemeinen nicht erfüllt werden, da meist eine Vielzahl von Reaktionspartnern nebeneinander vorliegen. In Abwasser liegen zum Beispiel die Redoxsysteme O_2/OH^{-} , NO_3^{-}/NO_2^{-} , NO_2^{-}/NH_4^{+} gleichzeitig vor und es lässt sich messtechnisch lediglich ein Mischpotential bestimmen.

3.1.1.3 Transport der elektroaktiven Substanzen an die Anode

Der Stofftransport an der Anode erfolgt durch drei Transportmechanismen (NAUMER und HELLER 1997):

- Migration (auf Potentialgefälle beruhende Wanderung geladener Teilchen)
- Diffusion (auf Konzentrationsgefälle beruhende Teilchenbewegung)
- Konvektion (Transport durch Bewegung des Lösungsmittels, z.B. durch thermische Strömungen oder Rühren)

Die Konzentrationsverhältnisse an der Elektrode werden vor allem von den Diffusionsprozessen beeinflusst. Das Plateau des Stroms in einer Strom-Spannungs-Kennlinie bezeichnet man als Diffusionsgrenzstrombereich. In diesem diffusionskontrollierten Bereich werden alle an die Anodeoberfläche gelangenden elektroaktiven Substanzen umgesetzt. Der Stromfluss hängt damit von dem Transport aus der Lösung an die Elektrode ab und ist proportional zur Konzentration der elektroaktiven Substanzen. Für die stationäre Diffusion an der Phasengrenze gilt nach NERNST in geringer Entfernung von der Elektrodenoberfläche, dass sich mit der Dicke der NERNST'schen Diffusionsgrenzschicht die Konzentration an der Elektrode linear ändert (Abbildung 3-2).

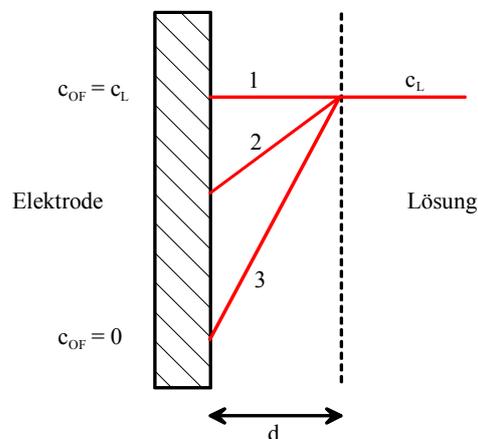


Abbildung 3-2: Konzentrationsgradient der elektroaktiven Substanzen in der NERNST'schen Diffusionsgrenzschicht (c_{OF} = Konzentration an der Elektrodenoberfläche, c_L = Konzentration in der Lösung, d = Dicke der Diffusionsgrenzschicht).

Im stromlosen Zustand 1 ist die c_{OF} gleich c_L , im Grenzstrombereich 3 werden die elektroaktiven Substanzen an der Anode sofort oxidiert, die Konzentration an der Elektrodenoberfläche ist null. Der Zustand 2 beschreibt einen Zwischenzustand. Den Zusammenhang zwischen dem Diffusionsgrenzstrom und der Konzentration der elektroaktiven Substanzen beschreibt die Massentransportgleichung (NAUMER und HELLER 1997):

$$I_{\text{Grenz}} = \frac{n \cdot F \cdot D \cdot A}{d} c_D$$

Formel 3-3: Massentransportgleichung

I_{Grenz}	Diffusionsgrenzstrom in A
n	Anzahl der pro Molekül übertragenen Elektronen
F	Faraday-Konstante (96487 A s mol ⁻¹)
D	Diffusionskoeffizient cm ² s ⁻¹
A	Elektrodenfläche in cm ²
d	Dicke der NERNST'schen Diffusionsgrenzschicht in cm
c_D	Konzentration der elektroaktiven Substanz in der Lösung in mol cm ³

Da während der Versuchsdurchführung die Größen n , D , A und d näherungsweise konstant sind, liegt eine direkte Proportionalität des Diffusionsgrenzstromes zur Konzentration der elektroaktiven Substanzen vor. Wenn alle an der Elektrode ankommenden elektroaktiven Substanzen sofort umgesetzt werden, befindet sich das System im diffusionskontrollierten Bereich, der Stromfluss ist maximal (Grenzstrom). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion ist dann die Diffusion der elektroaktiven Substanzen aus der Lösung zur Anode durch die NERNST'sche Diffusionsgrenzschicht (siehe Abbildung 3-2). Um die Konzentration der elektroaktiven Substanzen ermitteln zu können, muss die Strom-Spannungskennlinie der Substanz bekannt sein. Bei der Bestimmung des Redoxpotentials in einer Lösung wird laut der NERNST-Gleichung (Formel 3-2) lediglich das Verhältnis zwischen reduzierten und oxidierten Substanzen bestimmt, dagegen zeigt die Formel 3-3, dass bei einer Messung mit dem BAS eine Konzentration an reduzierten Stoffwechselsubstanzen bestimmt werden kann.

3.1.1.4 3-Elektrodensystem

In der Biobrennstoffzelle ändert sich während eines Versuches die Potentialdifferenz zwischen Anode und Kathode. Im Gegensatz zu der Brennstoffzelle wird bei dem 3-Elektrodensystem ein konstantes Potential vorgegeben. Das Prinzip des potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystems ist in der Abbildung 3-3 dargestellt.

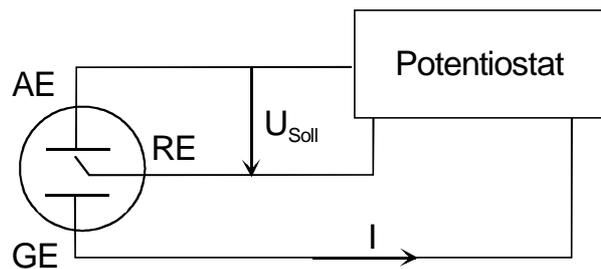


Abbildung 3-3: Prinzip des 3-Elektrodensystems

Das System besteht aus einer Arbeits-(AE), Referenz-(RE) und Gegenelektrode (GE), wobei sich die RE räumlich dicht an der AE befindet. Die Spannung U zwischen Referenz- und Arbeitselektrode wird in engen Grenzen gehalten, mit Hilfe eines Potentiostaten werden alle Abweichungen von einem vorgegebenen Sollwert des Potentials der AE durch einen Strom zwischen AE und GE automatisch korrigiert. Dieser Strom entspricht dem Diffusionsgrenzstrom und ist der jeweils im System vorhandenen Analytkonzentration bzw. bei geeigneten Randbedingungen der mikrobiellen Aktivität proportional. Die elektrochemischen Vorgänge bei dem potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystem und mit den oben angegebenen Einschränkungen auch bei der Biobrennstoffzelle lassen sich den amperometrischen Verfahren zuordnen, da hier an zwei Elektroden bei konstantem Potential ein Stromfluss gemessen wird.

3.1.1.5 Artificielle Elektronenüberträger

Der direkte Elektronenübergang von einem biologischen System über reduzierte Stoffwechselintermediate zu den Elektroden einer Brennstoffzelle läuft nur in einem geringen Umfang ab (HIGGINS und HILL 1979). Durch Einsatz eines wasserlöslichen Carrier-Moleküls (Redoxmediator) kann die Elektronenübertragung verbessert werden. Die Redoxmediatoren dienen als artificielle Elektronenakzeptoren und sollen die Elektronen effizient zur Anode transportieren, um dort umgesetzt zu werden. Die Abbildung 3-4 zeigt die Reaktionen in einer Biobrennstoffzelle in Gegenwart eines Mediators.

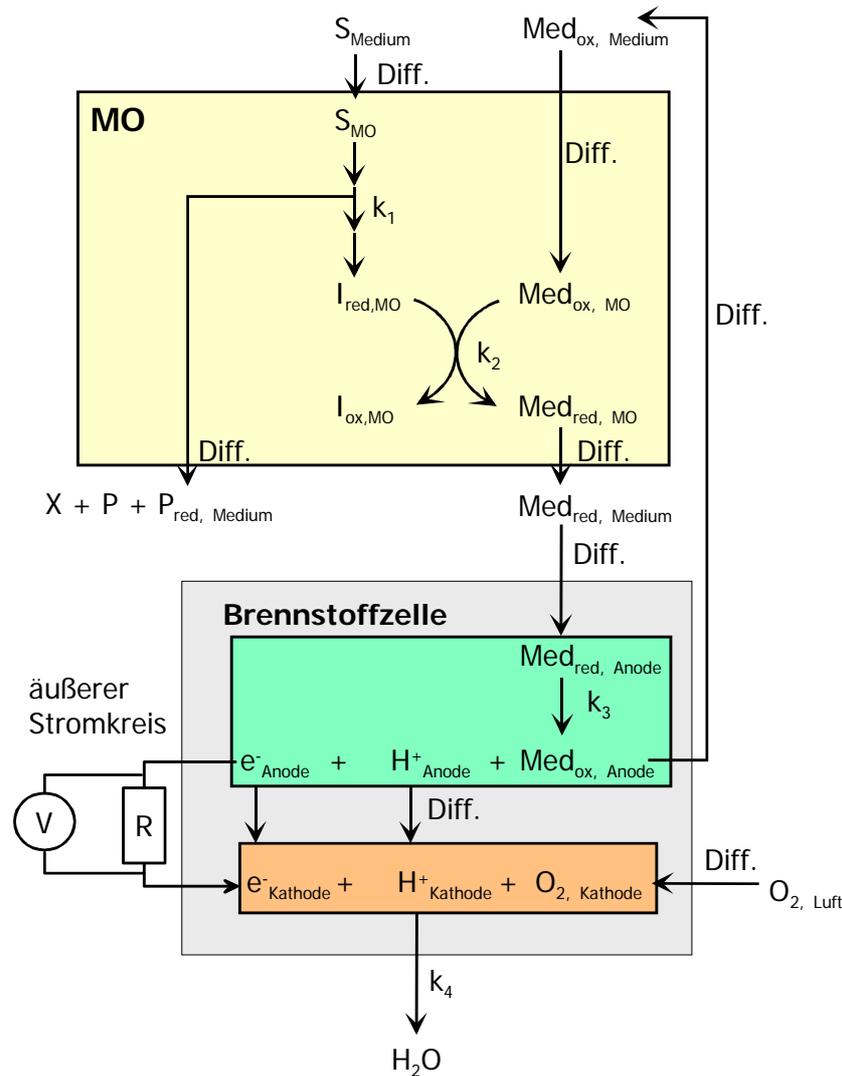
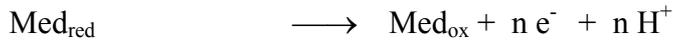


Abbildung 3-4: Prinzip des Stromflusses in einer Biobrennstoffzelle in Gegenwart eines Mediators

In dem Medium sind der oxidierte Mediator Med_{ox} und das Substrat S_{Medium} gelöst und werden von den Mikroorganismen aufgenommen. Das Substrat wird von den Mikroorganismen umgesetzt und es entstehen reduzierte Stoffwechselintermediate. Durch die Reaktion mit den Stoffwechselintermediaten $I_{\text{red,MO}}$ wird der Mediator mit der Geschwindigkeitskonstanten k_2 reduziert. Durch Diffusion wird der reduzierte Mediator zuerst aus der Zelle ausgeschleust und gelangt im Weiteren an die Anode. An der Anode wird $\text{Med}_{\text{red, Anode}}$ mit der Geschwindigkeitskonstanten k_3 oxidiert und kann anschließend erneut von Mikroorganismen aufgenommen werden. Durch diesen Prozess werden Elektronen an die Platinanode übertragen; diese Elektronen e^-_{Anode} wandern durch den äußeren Stromkreis und werden dort an der Kathode (e^-_{Kathode}) mit Sauerstoff und Protonen zu Wasser umgesetzt. Neben der Umsetzung des Mediators an Elektroden der Brennstoffzelle kann ebenfalls eine Oxidation von reduzierten Stoffwechselprodukten stattfinden (analog Abbildung 3-1).

Die Anodenreaktion in der Reaktionsgleichung 3-1 ändert sich entsprechend der folgenden Gleichung:



Reaktionsgleichung 3-3: Umsetzung eines Mediators an der Anode

Für die Umsetzung eines reduzierten Mediators an der Anode der Brennstoffzelle ergibt sich nach Reaktionsgleichung 3-3 und der Formel 3-2:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln \frac{[\text{Med}_{\text{ox}}][\text{H}^{+}]^n}{[\text{Med}_{\text{red}}]}$$

$[\text{Med}_{\text{ox}}]$

Konzentration an oxidiertem Mediator

$[\text{H}^{+}]$

Konzentration an Protonen

$[\text{Med}_{\text{red}}]$

Konzentration an reduziertem Mediator

3.1.2 Entwicklung der Biobrennstoffzellenforschung

Die Nutzung der Biobrennstoffzellen wurde bereits frühzeitig für die verschiedensten Anwendungsgebiete diskutiert. In den letzten Jahren ist wieder ein gesteigertes Forschungsinteresse in diesem Bereich festzustellen. Hierbei sind die Möglichkeiten einer Miniaturisierung, neue Anwendungsfelder, wie zum Beispiel die Energieversorgung von Mobiltelefonen oder der Antrieb von Robotern, neu isolierte Mikroorganismen oder innovative Zielstellungen in der Sensorik, die treibende Kraft der neuen Entwicklungen.

Die Biobrennstoffzellen lassen sich unter anderem hinsichtlich des verwendeten Elektrodenmaterials, der Nutzung eines Mediators, einer Kompartimentierung zwischen Anoden- und Kathodenraum, einer Immobilisierung der biologischen Komponente oder des Mediators, des eingesetzten Substrates und des Biokatalysators unterscheiden. Eine weitere Einteilung wird nach dem räumlichen Aufbau durchgeführt. Bei der indirekten Biobrennstoffzelle ist die biologische Erzeugung des Brennstoffes von dem Einsatz des Brennstoffes räumlich getrennt, dagegen laufen diese Prozesse in einer direkten Brennstoffzelle in einem Reaktor ab. Die Tabelle 3-1 zeigt eine Zusammenstellung von verwendeten Substrat-Biokatalysator-Kombinationen. Erste Forschungen auf dem Gebiet der bioelektrochemischen Brennstoffzelle wurden 1911 durchgeführt. Potter beobachtete, dass sich an einer Platinelektrode in einem anaeroben Glucose-Medium mit Bäckerhefe und *Escherichia coli* ein negatives Potential gegenüber einer Platinreferenzelektrode, die sich in einem zellfreien aeroben Kulturmedium befand, ausbildete (POTTER 1911). Von Cohen wurde diese Potentialdifferenz genutzt, um eine erste Biobrennstoffzelle zu entwickeln (COHEN 1931).

Tabelle 3-1: Zusammenstellung von in Brennstoffzellen verwendeten Substrat- und Biokatalysator-Kombinationen

Substrat	Biokatalysator	Referenz
Glucose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VIDELA und ARVIA 1975
Glucose	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ZHANG und HALME 1994
Glucose	Halophile Bakterien aus dem Baltischen Meer	ZHANG und HALME 1995
Acetat	<i>Desulfuromonas acetoxidans</i>	BOND et al. 2002
Benzoat	<i>Geobacter metallireducens</i>	BOND et al. 2002
n-Hexadekan	<i>Micrococcus cerificans</i>	VIDELA und ARVIA 1971
Glucose	<i>Bacillus WI</i>	AKIBA et al. 1987
Mono- und Disaccharide	<i>Proteus vulgaris</i>	KIM et al. 2000
Glucose/Glutaminsäure	Hefe	TROSOK et al. 2001
Lactat	<i>Shewanella putrefaciens</i>	KIM et al. 2002
H ₂ aus Abwasser	<i>Clostridium butyricum</i>	KARUBE et al. 1981
H ₂ aus Melasse	<i>Clostridium butyricum</i>	SUZUKI et al. 1980
H ₂ aus Glucose	<i>Enterobacter aerogenes</i>	TANISHO et al. 1989
H ₂ S aus Glucose	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	HABERMANN und POMMER 1991
Glucose	<i>E. coli</i>	DAVIS und YARBROUGH 1962 PARK und ZEIKUS 2000
Licht	<i>Synechococcus sp.</i>	YAGISHITA et al. 1993
Licht	<i>Anabaena variabilis</i>	YAGISHITA et al. 1996
Methanol, Formaldehyd, Ameisensäure	Methanol- und Formiatdehydrogenase	YUE und LOWTHER 1986
Glucose	Glucosedehydrogenase	PERSSON et al. 1985
Glucose	Glucoseoxidase	KATZ und WILLNER 2003
NADH	NAD-abhängiges Enzym	WILLNER et al. 1998

Der Einsatz der Biobrennstoffzelle in der Medizin wurde bereits frühzeitig diskutiert, zum Beispiel als Energiequelle für Herzschrittmacher. Ziel war es, eine Energiequelle zu schaffen, welche in den Körper implantiert werden kann und mit Glucose und Sauerstoff aus den Körperflüssigkeiten als Energielieferant arbeitet (WOLFSON et al. 1977 und v. STURM 1980).

Dieser Ansatz wurde in den letzten Jahren wieder aufgegriffen, von Heller wurden miniaturisierte, nicht kompartimentierte Brennstoffzellen entwickelt, welche als Elektroden zwei Kohlenstoffstäbe mit einem Durchmesser von 7 μm und einer Länge von 2 cm enthalten. Die Anode ist mit einem leitfähigen Redoxpolymer, welches Osmium als Elektronenüberträger und Glucoseoxidase als Biokatalysator enthält, beschichtet. Die Kathode ist mit einem weiteren Osmium-haltigen leitfähigen Polymer beschichtet, dieses enthält Bilirubin-Oxidase als Katalysator der Sauerstoffreduktion. Die beschriebene Brennstoffzelle arbeitet unter physiologischen Bedingungen und ist damit auf einen Einsatz im Blut abgestimmt. Die Brennstoffzelle wurde in eine Traube implantiert, hier war die Stromausbeute von dem Sauerstofftransport limitiert, die erzielten Stromausbeuten betragen 2,4 $\mu\text{W mm}^{-2}$ bei 0,52 Volt. Nach weiteren Entwicklungen soll die Brennstoffzelle zum Beispiel in der Medizin als Spannungsquelle für implantierbare, unabhängige Sensor-Transmitter-Systeme eingesetzt werden (MANO et al. 2002, MANO et al. 2003 und KIM et al. 2003a).

Von Chiao wurde eine Biobrennstoffzelle vorgestellt, die durch Mikrofabrikation ein Oberflächen-Volumen-Verhältnis von 500 cm^{-1} aufweist. Dieses wurde durch die Schaffung von Mikrokanälen mit einer Breite von 100 μm und einer Tiefe von 80 μm hervorgerufen. Als biologische Komponente wurde *Saccharomyces cerevisiae* und Methylenblau als Mediator eingesetzt. Mit dieser Zelle wurde eine Leistung von 0,5 $\mu\text{W cm}^{-3}$ bei einem Widerstand von 10 Ohm und bei offenem Kreislauf ein Potential von 343 mV erzielt (CHIAO et al. 2003).

Im Bereich der Robotik wurde von Wilkinson ein autonomer Roboter vorgestellt, welcher mittels Biobrennstoffzellen angetrieben wird. Der vorgestellte „Gastrobot“ wird von sechs in Reihe geschalteten Brennstoffzellen betrieben. Als Substrat für die *E. coli*-Zellen wurde Würfelzucker und als Mediator 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon (HNQ) verwendet. Die Anwendung wird von Wilkinson im Bereich der sogenannten „living off the land“-Aufgaben während „start and forget“-Missionen gesehen (WILKINSON 2000a und WILKINSON 2000b).

In den USA wurde im Rahmen der Weltraumforschung in den 50er und 60er Jahren an einer Nutzung von menschlichen Abfällen zur Gewinnung von Energie gearbeitet, Ziel war die Schaffung eines geschlossenen Kreislaufs in den Raumschiffen während längerer Missionen im Weltall. Diese Forschungen wurden jedoch ca. 1965 eingestellt, da die Stromausbeuten für einen praktischen Einsatz zu niedrig waren (LEWIS 1966). Hier sehen Park und Zeikus erneut

eine Anwendung der Biobrennstoffzelle aufgrund einer verbesserten Elektronenübertragung mit Neutralrot als Mediator bei anaerob-wachsenden Zellen von *E. coli* und *Actinobacillus succinogenes* (PARK und ZEIKUS 2000).

Von Tsujimura wurde eine bioelektrochemische Brennstoffzelle vorgestellt, welche auf Basis der Stoffwechselreaktionen der Photosynthese abläuft. Die Elektronen, welche durch die Lichtanregung in dem Photosystem übertragen werden, werden durch geeignete Mediatoren zu den Elektroden der Brennstoffzelle transportiert. In dem Anoden-Kompartiment werden Cyanobakterien der Gattung *Synechococcus* sp. und 2,6-Dimethyl-1,4-benzochinon als Mediator eingesetzt. Die Anodenreaktion ist die Oxidation von Wasser zu Sauerstoff, Protonen und Elektronen. Durch einen äußeren Stromkreis werden die Elektroden in das Kathoden-Kompartiment geleitet, dort reagieren diese mit 2,2'-Azinobis(3-Ethylbenzothiazolin-6-Sulfonat) (ABTS²⁻) als Mediator und Bilirubin-Oxidase als Biokatalysator wieder zu Wasser. Die Gesamtreaktion ist damit prinzipiell die Konversion von Lichtenergie in elektrische Energie. Mit dieser Brennstoffzelle wurden 2 – 2,5 % der Lichtenergie in chemische Energie umgesetzt und ein Stromfluss von 0,3 - 0,4 W m² Elektrodenfläche erzielt (TSUJIMURA et al. 2001).

Bei Schröder wurde die Anode mit einer leitfähigen Schicht aus Polyanilin beschichtet. Diese elektroaktive Schicht nimmt die Elektronen aus dem Stoffwechsel der Bakterien auf und überträgt sie auf die Anode. Durch regelmäßige Spannungspulse werden auftretende Ablagerungen, welche durch Stoffwechsel- sowie Nebenprodukte des elektrokatalytischen Oxidationsprozesses entstanden sind, chemisch umgesetzt und von der Oberfläche der Elektrode gelöst. Die Biobrennstoffzelle gibt kontinuierlich eine Stromdichte von 1,5 mA cm² ab (SCHRÖDER et al. 2003).

Chaudhuri und Lovley haben in einer Brennstoffzelle anaerob wachsende *Rhodospirillum rubrum* Zellen ohne einen Mediator eingesetzt. Die Brennstoffzelle wurde mit einer Kationenaustauschermembran in einen Anoden- und Kathodenraum geteilt, das Potential an der Anode wurde mit 200 mV gegen Ag/AgCl konstant gehalten. In dieser Brennstoffzelle wurden 2 mM Glucose innerhalb von 600 h abgebaut. Hierbei wurden 83 % von den theoretisch übertragbaren Elektronen aus der Oxidation der Glucose auf die Anode der Brennstoffzelle transferiert. Nach Austausch des Mediums zeigte sich umgehend eine Wiederaufnahme der Stromproduktion. Dies deutet an, dass die Mikroorganismen an der

Elektrodenoberfläche im Wesentlichen für das Stromsignal verantwortlich sind (CHAUDHURI und LOVLEY 2003). Von Bond und Lovley wurde eine Brennstoffzelle mit *Geobacter sulfureducens* eingesetzt. Dieser Organismus bildet eine stabile Population auf den Elektroden aus und kann diese direkt als Elektronenakzeptoren nutzen, als Elektronendonatoren wurden Acetat und Wasserstoff eingesetzt. Mit dieser Zelle wurde ein Strom von 65 mA m^{-2} erzielt (BOND und LOVLEY 2003).

Park und Zeikus haben eine zentral angeordnete Anode in einer zylindrischen, nicht kompartimentierten Brennstoffzelle eingesetzt. Die Kathode enthält eine interne protonendurchlässige Porzellanschicht. Die maximalen elektrischen Ausbeuten wurden bei Einsatz von Belebtschlamm als Biokatalysator und einer Mangan(IV)-Graphit-Anode sowie einer Eisen(III)-Graphit-Kathode erzielt. Eisen(III) und Mangan(IV) wirken hier als Mediatoren, welche eine 1000fache Vergrößerung der erzielbaren Ströme bewirken. Hier wurde ein Strom von 14 mA bei einer Spannung von 450 mV , eine Stromdichte von $1,75 \text{ mA m}^{-2}$ und eine Leistungsdichte von 788 mW m^{-2} erzielt. Ebenfalls haben Park und Zeikus gezeigt, dass „resting cells“ höhere Energieausbeuten erzielen als wachsende Zellen. Die „resting cells“ wurden mit Lactat als Elektronendonator eingesetzt, die Anode diente als Elektronenakzeptor (PARK und ZEIKUS 2003).

Von Rabaey wurde eine kompartimentierte Brennstoffzelle zur Anreicherung einer anaeroben Mischkultur eingesetzt. Die Mikroorganismen wurden über einen fünfmonatigen Zeitraum aus einem anaeroben Belebtschlamm einer kartoffelverarbeitenden Firma angereichert. Es wurde gezeigt, dass die elektrischen Ausbeuten bei einem höheren Substrat-Feeding abnehmen, bei einem Feeding von $0,5 \text{ g CSB L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ an Glucose betrug die elektrische Ausbeute $89 \pm 4 \%$, dagegen betrug die Ausbeute bei $5 \text{ g CSB L}^{-1} \text{ d}^{-1}$ nur $10 \pm 2 \%$ (RABAEY et al. 2003).

Auch in analytischen Anwendungen ist der Einsatz von Brennstoffzellen schon seit langem bekannt: von Matsunaga und Bennetto wurden Biomassesensoren nach dem Prinzip der Brennstoffzelle entwickelt (MATSUNAGA et al. 1980 und BENNETTO et al. 1987). In der Sensorik wurden u.a. Anwendungen der Biobrennstoffzellen zur Bestimmung von Vitamin B1 (SCHELLER et al. 1985), Zellzahlen (MIYABYASHI et al. 1987 und PATCHETT et al. 1988), Herbiziden (RAWSON et al. 1989) und toxischen Wirkungen (KREYSA et al. 1990) getestet.

Von Karube wurde erstmalig eine Biobrennstoffzelle zur Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB) eingesetzt, es wurde eine auf der Platin-Elektrode immobilisierte Kultur von *Clostridium butyricum* eingesetzt. Für eine Standardlösung wurde ein linearer Zusammenhang zwischen dem BSB und dem Signal der Brennstoffzelle gezeigt, für Proben aus dem industriellen Abwasserbereich betragen die relativen Fehler $\pm 10\%$ zur BSB-Standardmessmethode (KARUBE et al. 1977). In neueren Arbeiten zur Bestimmung des BSB auf Basis der Biobrennstoffzellen wurde von Pasco *E. coli* mit Kaliumhexacyanoferrat als Mediator eingesetzt (PASCO et al. 2000), die Messdauer wurde gegenüber dem Standardtest von 5 Tagen auf eine Stunde reduziert. Von Trosok wurden immobilisierte Hefen und Ferricyanid als Mediator verwendet (TROSOK et al. 2001). Der lineare Messbereich betrug $2\text{--}100\text{ mg L}^{-1}$ und es wurde eine Reproduzierbarkeit von $\pm 10\%$ bei einer siebenfachen Messung einer Standardlösung erzielt. Das metallreduzierende Bakterium *Shewanella putrefaciens* wurde von Kim in einer Brennstoffzelle ohne Mediator zur BSB-Messung verwendet (KIM et al. 2003b). Die Zelle lieferte ohne Wartung für fünf Jahre stabile Werte, der lineare Messbereich lag bei maximal 206 mg L^{-1} bei einer Abweichung von $\pm 3\text{--}12\%$. Als Messsignal wurden die Strom-Zeit-Kurven nach der Probendosierung herangezogen, bei einem BSB 206 mg L^{-1} erreichte der Strom ca. 5,5 h nach der Substratdosierung wieder das Ausgangssignal (CHANG et al. 2004).

Park und Zeikus haben gezeigt, dass die Energieerzeugung in einer Biobrennstoffzelle dem anaeroben Stoffwechsel von *E. coli* Reduktionsäquivalente entzieht und damit zu einer verringerten Bildung von Biomasse führt, im Vergleich zu einem Prozess ohne mikrobielle Energieerzeugung werden hier auch höher oxidierte Endprodukte gebildet. Die Autoren haben weiterhin eine anaerobe Mischkultur aus Belebtschlamm mit Glucose als Substrat und Neutral-Rot als Mediator zur Erzeugung von Energie in einer Biobrennstoffzelle eingesetzt (PARK and ZEIKUS 2000). Von Gil wurde der Einsatz einer Brennstoffzelle zur Reduktion einer Überschussschlamm-Produktion in der biologischen Abwasserreinigung diskutiert. Hierbei soll ausgenutzt werden, dass die mit einer Brennstoffzelle abgefangenen Elektronen dem Stoffwechsel nicht mehr zur Produktion von Biomasse zur Verfügung stehen (GIL et al. 2003).

Von Jang wurde eine Brennstoffzelle ohne Mediator und Kompartimentierung zur Stromerzeugung aus Abwasser verwendet. Die verwendete Brennstoffzelle besteht aus einem von unten nach oben durchströmten Zylinder mit einem Durchmesser von 10 cm. Als Anoden und

Kathodenmaterial wurde Graphit-Filz verwendet, die Anode wurde am unteren Ende der Säule eingesetzt, die Kathode am oberen Ende. Nach 20 Tagen wurde ein stabiler Wert von 2 mA mit diesem Aufbau erzielt (JANG et al. 2004).

Eine weitere Zusammenstellung der Prinzipien der Biobrennstoffzellen findet sich bei KATZ et al. (2003) und SELL (2001).

3.1.3 Elektronentransport

Für eine Anwendung sowohl als Brennstoffzelle als auch als Bioaktivitätssensor ist der effektive Transport der Elektronen zu den Elektroden von entscheidender Bedeutung. Allgemein ist der Strom einer Anodenreaktion von vorangehenden oder nachfolgenden chemischen oder biologischen Reaktionen, vom Transfer der reduzierten Substanzen zur Anodenoberfläche, von Oberflächenreaktionen (z.B. Adsorption) und dem Elektronentransfer an der Elektrodenoberfläche abhängig. Generell sind verschiedene Wege der Elektronenübertragung zwischen der biologischen Komponente und der Elektrodenoberfläche denkbar:

- die direkte Übertragung der Elektronen von dem Biokatalysator zur Elektrode,
- ein Elektronentransfer über Stoffwechselprodukte,
- der Elektronentransfer über natürliche Elektronenüberträger wie Huminstoffe oder Cytochrome und
- die Übertragung der Elektronen durch zugesetzte Mediatoren, hier kann der Mediator frei diffundierbar oder an der Elektrode immobilisiert sein.

Der einfachste Fall des Elektronentransports ist ein direkter Übergang der Elektronen von der biologischen Komponente auf die Elektrode. Dieser sogenannte „Tunnelmechanismus“ vom aktiven Zentrum eines Enzyms zur Anode einer Brennstoffzelle oder zur Transduceroberfläche eines Biosensors ist allerdings nur bei wenigen, relativ kleinen Enzymen (z.B. Cytochrom-c-Peroxidase, Meerrettich-Peroxidase) möglich, da die prosthetische Gruppe meist tief in einer Proteinhülle des Enzyms verborgen liegt und somit die Distanz für einen Elektronentransfer laut der MARCUS-Theorie zu groß ist (MARCUS 1993 und HABERMÜLLER et al. 2000).

Die Mikroorganismen besitzen in der Zellwand eingelagerte Proteine, welche durch Reaktionen an den Carboxyl- und Aminogruppen positive und negative Ionen bilden können (biopolaren Charakter). Damit könnten theoretisch auch die Organismen direkt als Elektrodendonatoren wirken. In der Literatur sind dazu widersprüchliche Angaben zu finden.

Matsunaga beschreibt die Notwendigkeit des direkten Kontakts der Mikroorganismen mit der Elektrode für die Entstehung des Stromsignals (MATSUNAGA et al. 1979). Dagegen können laut Park intakte Bakterienzellen nicht an einer Elektrode reagieren, da die elektroaktiven Proteine von Membranen umgeben seien (PARK et al. 1997).

Eine Übertragung der Elektronen über elektrochemisch aktive Stoffwechselsubstanzen wird von Zhang und Halme beschrieben (ZHANG und HALME, 1994). Diese Substanzen können Intermediate oder Endprodukte des Stoffwechsels sein. Es ist bekannt, dass einige Mikroorganismen elektroaktive Substanzen, wie Wasserstoff, Ameisensäure und Ammoniak, bilden (MATSUNAGA et al. 1979 sowie ASTON und TURNER 1984), die dann Ursache für den Strom einer Brennstoffzelle sein können. In vielen der eingesetzten Biobrennstoffzellen wurden Mikroorganismen oder Enzyme verwendet, welche Wasserstoff, eine der am stärksten elektroaktiven Substanzen, produzieren. Von Tanisho wurde bei anaerob-wachsenden Zellen von *Enterobacter aerogenes* auf Glucose gezeigt, dass der entstehende Wasserstoff die Hauptursache für den Stromfluss in der Brennstoffzelle ist (TANISHO et al. 1989). Riedel nennt als weitere elektroaktive Substanzen aus dem mikrobiellen Stoffwechsel Schwefelwasserstoff, Kohlendioxid und Wasserstoffperoxid, welche mit amperometrischen Elektroden nachgewiesen werden können (RIEDEL et al. 1989). Laut Zhang und Halme werden unter anaeroben Bedingungen von Hefen elektroaktive Substanzen wie NADH und NADPH in das Medium abgegeben, welche dann als Elektronendonatoren dienen können (ZHANG und HALME 1995).

Von Hernandez und Newman wurde der extrazelluläre Elektronentransfer als ein genereller Mechanismus der Mikroorganismen beschrieben, welcher der Energieerzeugung in der Wachstumsphase oder dem Erhaltungsstoffwechsel dienen könne. Bakterien könnten kleine elektroaktive Moleküle nutzen, welche intra- oder extrazellulär gebildet werden, um Elektronen zwischen reduzierten und oxidierten Komponenten zu übertragen (HERNANDEZ und NEWMAN 2001). Als Beispiele für diese Moleküle werden neben den Huminstoffen, Chinonen, Phenazinen und schwefelhaltigen Molekülen wie Cystein auch alle Moleküle angegeben, welche sich reversibel reduzieren lassen und ein geeignetes Redoxpotential besitzen. Zellen von *Shewanella oneidensis* MR-1 scheiden einen Chinon-ähnlichen Stoff aus, welcher als extrazellulärer Elektronenüberträger wirken kann (HERNANDEZ und NEWMAN 2001). Von Newman und Kolter wird die Rolle von ausgeschiedenen Chinonen im extrazellulären Elektronentransfer diskutiert (NEWMAN und KOLTER 2000). Bei Zellen von *Geobacter*

sulfurreducens wurde als extrazellulärer Elektronenüberträger ein c-Typ Cytochrom nachgewiesen; dieses kann als Elektronenüberträger auf unlösliche Eisen(III)-Hydroxide, Schwefel und Mangandioxid und zwischen symbiotischen Organismen genutzt werden (SEELIGER et al. 1998). Der Elektronentransfer zwischen Mikroorganismen und den Elektroden über ein in der Zellwand lokalisiertes Coenzym A wurde von Matsunaga und Nakajima zur Bestimmung von Zellzahlen eingesetzt (MATSUNAGA und NAKAJIMA 1985). Von Lovley wurde festgestellt, dass einige Mikroorganismen in der Lage sind, Huminstoffe als Elektronenakzeptoren für die anaerobe Oxidation von organischen Substanzen zu nutzen. Zellsuspensionen von *Geobacter metallireducens* sind in Abwesenheit von Huminstoffen nur zu einer langsamen Reduktion von Eisen(III)-Oxiden in der Lage; wenn allerdings Huminstoffe zudosiert werden, steigt die Umsatzrate an Eisen(III)-Oxid. Dieser Effekt wird durch die Fähigkeit zum Elektronentransfer durch die Huminstoffe erklärt (LOVLEY et al. 1996).

Eine Vielzahl von Autoren hat dargestellt, dass die Effizienz der direkten Elektronenübertragung gering sei (ALLEN 1972, BENNETTO et al. 1983, KIM et al. 2000). Bennetto sieht als Ursache für die geringe Elektronenübertragungsgeschwindigkeit die Barrierefunktion der Zellwand der Mikroorganismen, welche den Elektronentransfer zwischen der Anode als Elektronenakzeptor und Redoxintermediaten in der Zelle verhindert (BENNETTO et al. 1983). Um diese Ströme zu verstärken, können Redoxmediatoren eingesetzt werden. Diese Redoxmediatoren entziehen dem Elektronentransportsystem des Biokatalysators Elektronen und übertragen diese auf die Anode der Brennstoffzelle. Dabei muss allerdings betont werden, dass die Geschwindigkeitskonstante für den Elektronentransfer zwischen Biokatalysator und Redoxmediator hoch sein muss, um gegenüber einem natürlichen Substrat bevorzugt zu werden (HABERMÜLLER et al. 2000).

Ein geeigneter Mediator sollte wasserlöslich, leicht durch den Biokatalysator reduzierbar, leicht an der Anode oxidierbar, nicht toxisch, nicht biologisch abbaubar sein und ein Standardpotential haben, welches möglichst negativ sein sollte, um eine hohe Potentialdifferenz zwischen Anode und Kathode zu gewährleisten (STIRLING et al. 1983 und TANAKA et al. 1983).

Als Redoxmediatoren können anorganische Moleküle wie Hexacyanoferrat und organische Farbstoffe wie Methylenblau, Thionin und Chinone eingesetzt werden. Strukturell weisen eine Vielzahl der Mediatoren Ähnlichkeiten mit Stoffwechselkomponenten auf: 2-Hydroxy-

1,4-Naphthochinon (HNQ) zeigt eine vergleichbare Struktur mit dem Menachinon und Thionin mit der Isoalloxazingruppe von FAD oder FMN (SELL 2001).

Bezüglich der Wechselwirkungen der Redoxmediatoren mit den mikrobiellen Reaktionen lassen sich schon hinsichtlich der Vielfalt der verwendeten Mediatoren und deren physikalischen, chemischen und elektrochemischen Eigenschaften keine allgemeingültigen Aussagen treffen. So kann z.B. Hexacyanoferrat(III) wegen seiner Polarität nicht in das Zellinnere gelangen, die Reduktion geschieht wahrscheinlich im periplasmatischen Raum. Der Mediator 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon (HNQ) kann dagegen aufgrund seiner Molekülstruktur in das Innere der Zelle gelangen und dort reduziert werden. Auch von Molekülen wie dem Thionin oder Methylenblau ist bekannt, dass sie die Zellmembran passieren können und in der Zelle reduziert werden. Die Daten zur Kinetik der mikrobiellen HNQ-Reduktion lassen sich mit einem mathematischen Modell erklären, welches von der Voraussetzung ausgeht, dass der Mediator sowohl in oxidiertem als auch in reduzierter Form die Zellmembran passieren muss. Von Kreysa und Krämer wurde anhand von kinetischen Daten und einem mathematischen Modell gezeigt, dass der Mediator HNQ von den Mikroorganismen aufgenommen werden muss (KREYSA und KRÄMER 1989).

Von Bennetto wurde gezeigt, dass Redoxmediatoren wie Thionin, Toluidinblau und Methylenblau von NADH reduziert werden können und dass HNQ hier keine signifikanten Reduktionsraten aufwies (BENNETTO et al. 1985). Allerdings kann HNQ in Gegenwart von mikrobiellen Zellmembranfraktionen durch NADH reduziert werden (BENNETTO et al. 1987). Bennetto zeigte weiterhin, dass zwischen den Mediatoren und den verwendeten Mikroorganismen Unterschiede in den Reduktionsraten liegen, von *E. coli* wird Thionin zum Beispiel mit einer Rate von $3,7 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ und HNQ mit $1,2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ umgesetzt, dagegen setzt *Proteus vulgaris* Thionin mit $7,1 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ und HNQ mit $0,2 \mu\text{mol g}^{-1} \text{s}^{-1}$ um (BENNETTO et al. 1985). Dies bedeutet, dass für bestimmte Mikroorganismen jeweils der geeignetste Mediator ermittelt werden muss.

Eine Abnahme der Effektivität des Elektronentransports durch eine Oxidation der reduzierten Stoffwechselintermediate und Mediatoren mittels Sauerstoff wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (ZHANG und HALME 1994 sowie BENNETTO et al. 1983). Von Bennetto wurde gezeigt, dass einerseits eine direkte elektrochemische Umsetzung der Glucose nur in einem sehr geringen Umfang abläuft und andererseits dass bei *E. coli*-Zellen auch in Abwesenheit eines Substrates im Medium ein signifikanter Strom durch die endogene Oxidation der Glucose in einer Brennstoffzelle gemessen werden kann (BENNETTO et al. 1983).

Choi zeigte, dass die Stromausbeute einer Brennstoffzelle durch die Membranfluidität der Bakterien beeinflusst wird. Es wurden Versuche mit *Proteus vulgaris* durchgeführt, welche in der logarithmischen Wachstumsphase einer Temperatur- oder Ethanolbehandlung unterzogen wurden. Die Mikroorganismen wurden anschließend zentrifugiert, gewaschen und in einer Brennstoffzelle die Stromausbeute und die Fettsäurezusammensetzung der Lipidmembranen bestimmt. Es wurde gezeigt, dass bei einem hohen Anteil an gesättigten Fettsäuren die Stromausbeuten abnehmen (CHOI et al. 2003).

3.2 Abwasserreinigung

Ziel der Abwasserbehandlung ist es, unerwünschte Inhaltsstoffe so quantitativ wie möglich aus dem Abwasser zu entfernen und die von den Schmutz- und Schadstoffen ausgehenden negativen Wirkungen auf die Oberflächengewässer zu minimieren. Abwasser enthält verschiedene organische und anorganische Schmutzstoffe in fester (partikulärer), gelöster und kolloidaler Form. Partikuläre Stoffe lassen sich größtenteils durch Sedimentieren, Flotieren und Filtrieren eliminieren (mechanische Vor- und Nachklärung). Kolloidale und gelöste Stoffe lassen sich durch Mikroorganismen biologisch abbauen oder chemisch in partikuläre umwandeln und ausfällen (KÖHNE 1998).

Zur Behandlung der Abwässer können dabei je nach Herkunftsbereich und Verschmutzungsgrad verschiedene Verfahren oder Verfahrenskombinationen auf der Basis mechanischer, physikalischer, chemischer und biologischer Wirkungsmechanismen herangezogen werden (NEITZEL 1998). Die Abbildung 3-5 zeigt schematisch den Reinigungsprozess am Beispiel der Abwasserreinigungsanlage Kriftel. Die Reinigung des Abwassers erfolgt in mehreren Stufen, zunächst halten in der mechanischen Reinigungsstufe Siebrechen (3) die Partikel zurück, deren Durchmesser größer 3 mm ist und die den Kläranlagenbetrieb stören würden. Anschließend werden im belüfteten Sand/Fettfang (4) der Sand und das Fett aufgrund ihrer Dichte entfernt. Die übrigen ungelösten Inhaltsstoffe sinken im Vorklärbecken (5) zu Boden, da dort die Fließgeschwindigkeit herabgesetzt wird. Diese Stoffe werden durch Bodenräumer in einen Trichter geschoben und in die Faulbehälter gepumpt. In den Pufferbecken (6) werden Belastungsspitzen zwischengespeichert und in belastungsarmen Zeiten wieder abgearbeitet, auch im Havariefall können hier kontaminierte Abwässer gespeichert und so Schaden von der Biologie abgewendet werden. In der biologischen Stufe (8) werden die verbliebenen, gelösten, organischen Schmutzstoffe und Stickstoffverbindungen durch den Stoffwechsel der Mikroorganismen abgebaut. Hierbei werden die Prozesse Kohlenstoffelimination, Nitrifikation und Denitrifikation in verschiedensten Verfahrensvariationen angeordnet (siehe unten).

Durch die Zugabe von chemischen Fällungsmitteln im Ablauf (11) der biologischen Stufe werden die Phosphorverbindungen entfernt. Der flockige Belebtschlamm setzt sich im nachfolgenden Nachklärbecken (12) ab und das gereinigte Abwasser wird einem Vorfluter (z.B. Fluss) zugeführt. Der Belebtschlamm, der sich in den Nachklärbecken abgesetzt hat, wird über ein Rücklaufschlammumpwerk zum großen Teil wieder in die biologische Stufe zurückgeführt, um für die Reinigungsprozesse hohe Biomassekonzentrationen zur Verfügung zu stellen. Der sich darüber hinaus im Nachklärbecken ansammelnde überschüssige Schlamm wird nach einer maschinellen Vorentwässerung (14) zusammen mit dem bei der Vorklärung angefallenen Schlamm in die Faulbehälter (15) gepumpt. Dort entsteht Methan, welches in Blockheizkraftmodulen zur Strom- und Wärmeerzeugung genutzt wird. Der ausgefaulte Schlamm wird mit einer Bandfilterpresse (18) entwässert und einer landwirtschaftlichen Nutzung zugeführt.

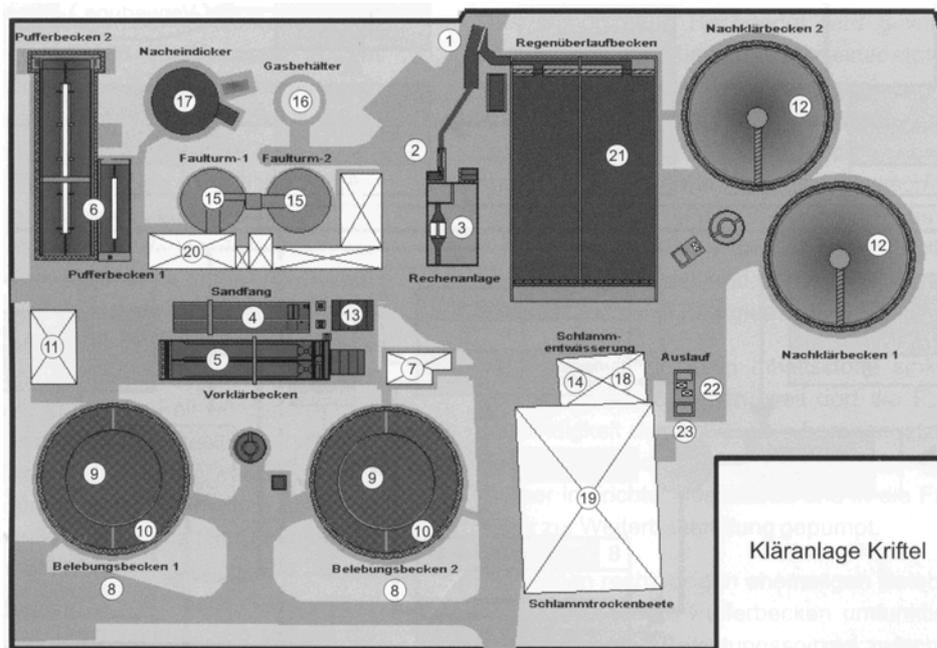


Abbildung 3-5: Schema einer Kläranlage am Beispiel der Abwasserreinigungsanlage Kriftel (1 Trennbauwerk, 2 Zulaufmessung, 3 Rechen, 4 Sandfang, 5 Vorklärbecken, 6 Pufferbecken, 7 Zwischenpumpwerk, 8 biologische Stufe, 9 Denitrifikationsbecken, 10 Nitrifikationsbecken, 11 chemische Phosphatfällung, 12 Nachklärbecken, 13 Schlammmeindicker, 14 maschineller Voreindicker, 15 Faulturn, 16 Gasbehälter, 17 Nacheindicker, 18 Schlammmentwässerung, 19 Schlamm-trockenbeete, 20 Betriebsgebäude mit Schaltwarte, 21 Regenüberlaufbecken, 22 und 23 Auslaufmessungen)

Die Grundlagen aller biologischen Abwasserreinigungsverfahren sind:

- aerobe (in Gegenwart von Sauerstoff),
- anoxische (bei Abwesenheit von molekularem Sauerstoff, aber in Gegenwart sauerstoffhaltiger Verbindungen wie z. B. Nitrat) oder

- anaerobe (unter Ausschluss von Sauerstoff und sauerstoffhaltigen Verbindungen) Stoffwechselprozesse der Mikroorganismen. Diese unterschiedlichen Verfahren benötigen geeignete Milieubedingungen hinsichtlich Sauerstoffkonzentration, pH-Wert, Verhältnis der Nährstoffe sowie der verfahrenstechnischen Auslegung der Kläranlagen.

In der biologischen Stufe einer Kläranlage sind die Schritte Kohlenstoffelimination, Nitrifikation und Denitrifikation in verschiedensten Verfahrensvariationen angeordnet. Es werden zum Beispiel aerobe und anaerobe Stufen, Submers- und Emersverfahren eingesetzt, die verschiedenen Verfahrensschritte können sowohl zeitlich als räumlich getrennt durchgeführt werden. Das Belebtschlammverfahren ist mit seinen technologischen Modifikationen das am weitesten verbreitete Verfahren in der aeroben Abwasserreinigung (MIKSCH und FINGERHUT 1990). Dieses Verfahren simuliert räumlich und zeitlich konzentriert die Selbstreinigungsprozesse der natürlichen Gewässer. Beim Belebtschlammverfahren wird das Abwasser kontinuierlich durch das Belebungsbecken geleitet. Die im Belebungsbecken suspendierten Mikroorganismen bilden als Kolonie mit Schweb- und Feststoffen Belebtschlammflocken. Es findet durch die Belebtschlammflocke ein Abbau bzw. die Umwandlung von organischen in mineralische Stoffe statt. Daneben laufen auch der Aufbau von Biomasse und Stoffumwandlungsvorgänge wie Nitrifikation und Denitrifikation ab. Für alle diese Reaktionen sind die Bakterien der Belebtschlammflocke verantwortlich.

Bei der Bildung der Belebtschlammflocke spielen extrazelluläre polymere Substanzen (EPS) eine bedeutende Rolle. Die EPS bestehen im Wesentlichen aus Polysacchariden und darin eingelagerten Proteinen. Extrazelluläre polymere Substanzen werden von verschiedenen Bakterienarten produziert und nutzen den Mikroorganismen auf vielseitigen Wegen:

- Bakterienarten, die unter Substratmangel aufwachsen und die zur Deckung ihres Substratbedarfes hochmolekulare Stoffe mit Hilfe von Exoenzymen spalten müssen, lagern diese Enzyme in die EPS ein, um sie nahe an der Zellmembran zu halten (Diffusionsbarriere).
- Bakterien, die in Symbiose mit anderen Arten leben, wie z.B. die Nitrifikantenarten *Nitrosomonas* sp. und *Nitrobacter* sp., verwenden die EPS als Mittel, um in räumlicher Nähe zu bleiben.
- Bakterienarten, die toxischen Stoffen ausgesetzt sind, dient die EPS als Schutz. Die toxischen Substanzen werden an die EPS gebunden und können daher nicht in das Zellinnere vordringen.

Die Polymerstrukturen müssen allerdings die Diffusion der Substratmoleküle, der Elektronendonatoren und -akzeptoren und der ausgeschiedenen Metabolite ermöglichen.

Das Belebtschlammverfahren wird wegen des geringen Nährstoffangebots des kommunalen Abwassers mit einer Biomassenrückführung betrieben, andernfalls würde die Biomassekonzentration im kontinuierlichen Betrieb abnehmen, da die Wachstumsrate geringer als die Verdünnungsrate ist. Die in einer biologischen Abwasserreinigungsstufe anfallenden organischen Schmutzstoffe werden in leicht (schnell) und schwer (langsam) abbaubare Stoffe eingeteilt. Für die leichtabbaubaren Stoffe liegen alle benötigten stoffwechselspezifischen Enzyme zum Abbau in ausreichenden Konzentrationen vor, dagegen muss bei schwer abbaubaren Substanzen der notwendige Enzymapparat erst synthetisiert werden.

3.2.1 Kohlenstoffabbau im Belebungsverfahren

In dem Belebtschlamm treten überwiegend Gram-negative, nicht sporenbildende Arten auf, die den Gattungen *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Achromobacter* und *Flavobacterium* zuzuordnen sind (MUDRACK und KUNST 1994). Die chemoorganoheterotrophe Ernährungsform von Mikroorganismen ist dadurch gekennzeichnet, dass als Energie-, Wasserstoff- und Kohlenstoffquelle ausschließlich organische Verbindungen genutzt werden. Sie ist bei den Mikroorganismen in der biologischen Reinigungsstufe von zentraler Bedeutung. Durch die Stoffwechselaktivität heterotropher Organismen werden die höhermolekularen organischen Abwasserinhaltsstoffe unter Energiegewinn biochemisch zu energiearmen niedermolekularen Verbindungen unter gleichzeitiger Bildung von Zellsubstanz umgesetzt. Der Abbau von Glucose verläuft zum Beispiel nach der folgenden Gleichung:



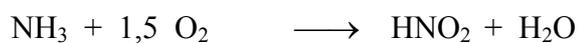
Reaktionsgleichung 3-4: Oxidation von Glucose (siehe auch Reaktionsgleichung 9-1)

3.2.2 Stickstoffelimination

Der Abbau von Stickstoffverbindungen hat immer mehr an Bedeutung gewonnen, da Stickstoff einen wesentlichen Einfluss auf das ökologische Gleichgewicht der Gewässer hat. Ammonium-Stickstoff und organisch gebundener Stickstoffe wirken sauerstoffzehrend. Durch den mikrobiellen Abbau in Gewässern kann die kritische Konzentration an gelöstem Sauerstoff unterschritten werden. Die Folge kann eine Störung der Biozönose bis hin zum Fischsterben sein. Sowohl Nitrit als auch Ammoniak sind stark fischgiftig. Um diese negati-

ven Auswirkungen auf die Vorfluter zu vermeiden, wird die Elimination der Stickstoffverbindungen in der biologischen Kläranlage durchgeführt. Da die nitrifizierenden Arten nur langsam wachsen und sehr empfindlich gegenüber Temperatur- und pH-Schwankungen sowie toxischen Abwasserinhaltsstoffen sind, stellt die Nitrifikation die Achillesferse der Stickstoffentfernung in Kläranlagen dar (WAGNER 2000).

Die Stickstoffelimination erfolgt durch die Prozessschritte Ammoniak-Oxidation (Nitrifikation) und anschließende Nitrat-Reduktion (Denitrifikation). Die Umwandlung von Ammoniak in Nitrat vollzieht sich in zwei Stufen, in der ersten Stufe oxidieren Mikroorganismen der Familie der Ammoniak-Oxidierer Ammoniak zu salpetriger Säure:



Reaktionsgleichung 3-5: Oxidation von Ammoniak (siehe auch Reaktionsgleichung 9-2)

Die Familie der Ammoniakoxidanten umfasst die Gattungen *Nitrosomonas*, *Nitrosococcus*, *Nitrospira*, *Nitrosoglobulus* und *Nitrosovibrio*, als typischer Vertreter wird *Nitrosomonas europaea* angesehen. In einer zweiten Stufe oxidieren die Nitrit-Oxidierer die entstandene salpetrige Säure zu Salpetersäure bzw. Nitrat:



Reaktionsgleichung 3-6: Oxidation von salpetriger Säure (siehe auch Reaktionsgleichung 9-3)

Zu den Nitrit-Oxidierern gehören Mikroorganismen der Gattungen *Nitrobacter*, *Nitrococcus*, *Nitrospira* und *Nitrospina*, eine typische Art ist *Nitrobacter winogradskyi* (PIRSING 1996). Ammoniak- und Nitrit-Oxidierer wirken in der Natur stets zusammen. Daher lassen sich die Gleichungen zu einer Gesamtgleichung zusammenfassen:



Reaktionsgleichung 3-7: Gesamtreaktion der Nitrifikation

Erst nach intensiven reaktionstechnischen und mikrobiologischen Untersuchungen wurde gezeigt, dass statt der geladenen Ionen Ammonium und Nitrit die undissoziierten Stoffe Ammoniak und salpetrige Säure die Substrate der Mikroorganismen sind (SCHMIDT et al. 1999 und PIRSING 1996). Die Mikroorganismen assimilieren mittels der aus den Oxidationsprozessen gewonnenen Energie Kohlendioxid als einzige Kohlenstoffquelle; die Nitrifikation ist damit ein autotropher, aerober Prozess. Da zur Fixierung von CO_2 ein hoher Energiebetrag von ca. 500 kJ pro mol Kohlenstoff benötigt wird, verbrauchen autotrophe Organismen bis zu 80 % ihrer Energie für die CO_2 -Fixierung. Probleme bei der stabilen technischen Umsetzung der Nitrifikation entstehen durch verschiedene Faktoren (SCHMIDT et al. 1999):

- Die Michaelis-Menten-Konstante K_S , Sauerstoff-Werte der Nitrifikanten sind im Vergleich zu den heterotrophen Mikroorganismen hoch, daher wird in den aeroben Stufen einer Kläranlage der Sauerstoff auf einer Konzentration größer 2 mg L^{-1} eingestellt.
- Die Nitrifikation ist ein temperaturempfindlicher Prozess, das Optimum des Prozesses wird bei 28 °C erreicht, sinkt die Temperatur unter 20 °C , sind deutliche Einbußen in der Nitrifikationsleistung festzustellen. Sinkt die Temperatur für einen längeren Zeitraum unter $5 - 10 \text{ °C}$ ist mit einem vollständigen Verlust der Aktivität zu rechnen.
- Bei ungünstigen C/N-Verhältnissen konkurrieren die Ammoniakoxidanten mit den heterotrophen Mikroorganismen um das Ammonium. Stehen große Mengen assimilierbarer Kohlenstoffverbindungen zur Verfügung ($C/N > 10$) führt die hohe Wachstumsrate der heterotrophen Organismen in Kombination mit ihrer hohen Affinität zum Ammonium schnell zu einem Substratmangel der Ammoniakoxidanten.
- Die Nitrifikation weist eine hohe pH-Wert-Empfindlichkeit auf, der optimale pH-Wert liegt in dem Bereich von 7,5 bis 8,5. Unterhalb von 6,0 bis 5,5 kann bei Reinkulturen kein Wachstum mehr festgestellt werden.
- Beide Teilschritte der Nitrifikation gehorchen einer Doppelsubstratkinetik mit Substratüberschusshemmung und Sauerstofflimitierung, zusätzlich wird eine kompetitive Hemmung von *Nitrosomonas* durch salpetrige Säure sowie von *Nitrobacter* durch Ammoniak beobachtet.
- Gegenüber Hemmstoffen sind die Nitrifikanten empfindlicher als die heterotrophen Mikroorganismen.
- Die Nitrifikanten weisen relativ langsame Wachstumsraten auf (ca. $0,04 \text{ h}^{-1}$), daher muss die Verweilzeit der Biomasse in dem Belebungsbecken auf diesen Prozess abgestimmt werden.

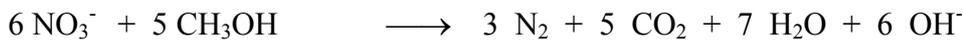
Denitrifikanten sind strikt respiratorische Mikroorganismen, zu dieser sehr heterogenen Gruppe gehören Gram-negative Bakterien der Gattung *Pseudomonas* und *Alcaligenes* sowie der Gattungen *Achromobacter*, *Bacillus*, *Spirillum* und *Xanthomonas*.

Unter anoxischen Bedingungen sind Denitrifikanten in der Lage, Nitrat anstelle von Sauerstoff als terminalen Elektronenakzeptor zur Energiegewinnung zu verwenden, als Elektronendonoren fungieren in Abhängigkeit von der Ernährungsweise organische oder anorganische Verbindungen. Denitrifizierende Mikroorganismen reduzieren Nitrat zu gasförmigen, abscheidbaren Verbindungen (N_2O , N_2):



Reaktionsgleichung 3-8: Allgemeine Denitrifikationsreaktion

Für die Nitrat-Atmung sind Elektronendonatoren in Form von organischen C-Verbindungen erforderlich, während die N-Verbindungen Elektronenakzeptoren sind. Mit Methanol bzw. Essigsäure als leicht abbaubaren Elektronendonatoren ergibt sich:



Reaktionsgleichung 3-9: Denitrifikation mit Methanol oder Essigsäure als Elektronendonatoren (siehe auch Reaktionsgleichung 9-4)

Während der Denitrifikation werden die bei der Oxidation der Substrate gebildeten Reduktionsäquivalente in die Atmungskette eingeschleust und sukzessiv über die Komponenten der Atmungskette auf Nitrat übertragen. Die Reduktion von Nitrat erfolgt über Nitrit, Stickstoffmonoxid und Distickstoffmonoxid zu molekularem Stickstoff. Die Schritte werden von den spezifischen Enzymen Nitrat-, Nitrit-, NO- und N₂O-Reduktase katalysiert. Die Denitrifikation entspricht biochemisch der Sauerstoffatmung, das Nitrat übernimmt die Funktion des Sauerstoffes als Elektronenakzeptor. Die Abbildung 3-6 zeigt den Prozess der Denitrifikation mit Essigsäure als leicht abbaubarem Elektronendonator.

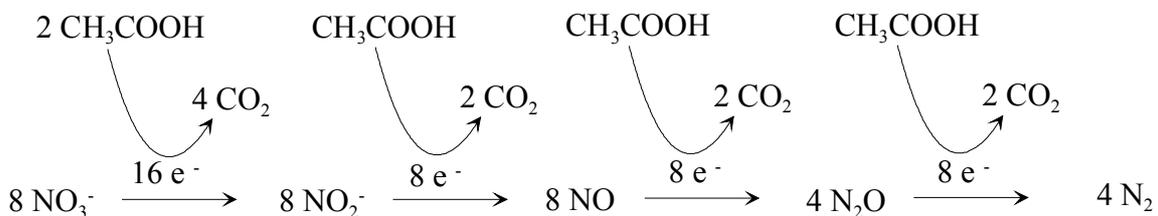


Abbildung 3-6: Schematische Darstellung der Denitrifikation mit Essigsäure als Elektronendonator (nach ALMEIDA et al. 1995)

Da die Elektronen eine höhere Affinität zu gelöstem Sauerstoff als zum Nitratsauerstoff aufweisen, ist eine wirkungsvolle Denitrifikation nur bei weitgehender Abwesenheit von gelöstem Sauerstoff möglich. Die Prozessstufe der Denitrifikation kann auf verschiedenen Wegen in die Gesamtkonzeption des Belebtschlammverfahrens zur kommunalen Abwasserreinigung integriert werden:

- nachgeschaltete Denitrifikation
- getrennte Denitrifikation mit externer Kohlenstoffquelle
- vorgeschaltete Denitrifikation

- simultane Denitrifikation
- intermittierende Denitrifikation.

Die vorgeschaltete Denitrifikation stellt hierbei die häufigste Verfahrensvariante dar, der nitrathaltiger Belebtschlamm aus dem Nitrifikationsbecken wird in das vorgeschaltete Denitrifikationsbecken rezirkuliert und dort mit organisch hochbelastetem Abwasser vermischt.

3.2.3 Bemessungsgrundlagen von Kläranlagen

Wichtige Parameter zur Beschreibung von Kläranlagen sind die Raumbelastung B_R und die Schlammbelastung B_{TS} (ATV, 1991). Die Raumbelastung (Formel 3-4) ist der Quotient aus organischer Belastung und Rauminhalt und wird in der Regel auf einen Tag bezogen, die Schlammbelastung (Formel 3-5) ist das Verhältnis vom angebotenen Substrat zur vorhandenen Bakterienmasse.

$$B_R = \frac{BSB_{5,Zu} * F_{AW}}{V_{BB}}$$

Formel 3-4: Raumbelastung

$$B_{TS} = \frac{B_R}{TS_{BB}}$$

Formel 3-5: Schlammbelastung

B_R	Raumbelastung in $\text{kg BSB}_5 \text{ m}^{-3} \text{ d}^{-1}$
$BSB_{5,Zu}$	BSB_5 -Belastung des Zulaufs in kg m^{-3}
F_{AW}	Abwasserzufluss in $\text{m}^3 \text{ d}^{-1}$
V_{BB}	Volumen des Belebungsbeckens in m^3
B_{TS}	Schlammbelastung in $\text{kg BSB}_5 \text{ kg}_{TS}^{-1} \text{ d}^{-1}$
TS_{BB}	Trockensubstanz im Belebungsbecken in kg m^{-3}

Die Verweilzeit (Formel 3-6) der Abwasserinhaltsstoffe in einer Kläranlage errechnet sich als Verhältnis des Volumens des Belebungsbeckens in m^3 zum Abwasserzufluss in $\text{m}^3 \text{ h}^{-1}$:

$$\tau = \frac{V_{BB}}{F_{AW}}$$

Formel 3-6: Verweilzeit

Das Schlammrücklaufverhältnis RV berechnet sich gemäß der Formel 3-7 als Verhältnis des aus dem Nachklärbecken ins Belebungsbecken zurückgeführten Belebtschlammes F_{RS} zu dem Abwasserzulauf (ATV 1997a).

$$RV = \frac{F_{RS}}{F_{AW}}$$

Formel 3-7: Rücklaufverhältnis

Das Rezirkulationsverhältnis RZ (Formel 3-8) berechnet sich als Quotient des aus dem Belebungsbecken in das Denitrifikationsbecken zurückgeführten Abwassers F_R und dem Abwasserzufluss (ATV 1997a).

$$RZ = \frac{F_R}{F_{AW}}$$

Formel 3-8: Rezirkulationsverhältnis

Der Abbaugrad ist ein Maß zur Beschreibung des biologischen oder chemischen Abbaus organischer Verbindungen, der bei der biologischen Abwasserreinigung vor allem auf den Stoffwechselfvorgängen der Mikroorganismen beruht. Der Abbaugrad kann durch verschiedene Summenparameter ausgedrückt werden, wie z.B. TOC, BSB oder CSB. Die Definition des Abbaugrades in einer Anlage erfolgt nach folgender allgemeiner Formel:

$$\alpha = \frac{\text{Parameter}_{\text{Zulauf}} - \text{Parameter}_{\text{Ablauf}}}{\text{Parameter}_{\text{Zulauf}}}$$

Formel 3-9: Abbaugrad

Der Abbaugrad in einer Anlage ist gleichzeitig ein Maß für die Effizienz und Stabilität der Anlage, kommt es z.B. ohne erkennbaren technischen Grund zu einem plötzlichen Abfall des Abbaugrades in einer biologischen Abwasserreinigungsanlage, so ist von toxischen Substanzen im Zulauf auszugehen.

3.3 Verfahren zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität

Geräte für die online Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in der biologischen Abwasserreinigung wurden bereits von einigen Firmen realisiert. Die meisten Systeme basieren auf der Messung der Sauerstoffzehrung. Daneben sind weitere Meßmethoden untersucht worden, welche sich zum Beispiel aus der schematischen Darstellung der mikrobiellen Vorgänge beim Substratabbau (Abbildung 1-1) ergeben. Die Zielstellungen waren dabei einerseits die Kontrolle von toxischen Einflüssen auf den Belebtschlamm und andererseits die Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB).

Von der Firma LAR Analytik und Umweltmesstechnik GmbH, Berlin wird das Nitrifikanten-Toximeter NitritoxMonitor[®] mit der Zielstellung des Schutzes der Kläranlagenbiologie angeboten, die Messgröße des Testsystems ist die Atmungshemmung der Nitrifikanten. Der Messablauf beginnt mit dem Einfüllen der zu testenden Probe in eine Messzelle, anschließend werden Nitrifikanten aus einem integrierten Fermenter zudosiert und der Sauerstoffverbrauch der Testorganismen gemessen. Die im Gerät vorgehaltene Nitrifikantenkultur wird dabei der Anlagenbiologie entnommen, damit soll einerseits eine Vergiftung der Mikroorganismen verhindert werden und andererseits eine repräsentative Biozönose bereitgestellt werden. Ein verringerter Sauerstoffverbrauch weist auf Probeninhaltsstoffe hin, die sich schädlich auf die Nitrifikationsleistung der Anlage auswirken. Weiterhin hat die Firma LAR ein Messgerät zur parallelen Bestimmung des BSB und der Belebtschlammrespiration im Angebot. Das Messsystem des BioMonitor[®] arbeitet nach dem Prinzip einer Miniaturkläranlage. Der direkt aus der Anlage zugeführte oder mit einem Schlammrecycling im Kreislauf geführte Belebtschlamm baut die Inhaltsstoffe des Abwassers ab. Der hierfür erforderliche Sauerstoff wird gemessen. Dieser Vorgang erfolgt in der Abwasserkaskade des BioMonitor[®]. Da die im Belebtschlamm enthaltenen Mikroorganismen ebenfalls Sauerstoff veratmen, wird zur genauen BSB-Bestimmung die Eigenatmung vom Gesamtsauerstoffverbrauch der Probe abgezogen. Diese Eigenatmung wird in der Referenzkaskade des BioMonitor[®] bestimmt. Anschließend wird der BSB der Probe aus der Differenz der Messwerte beider Kaskaden berechnet. Gegenüber Systemen mit nur einem Reaktionsbehälter erfolgt der Abbau nicht nur schneller, sondern durch den mehrstufigen Aufbau werden auch schwer abbaubare Stoffe in den hinteren Behältern der Abwasserkaskade erfasst. Die Messung der Eigenatmung des Belebtschlammes (Belebtschlammaktivität) dient nicht nur als Korrekturgröße zur genauen Bestimmung des BSB, zusätzlich informiert sie über den Zustand der Biomasse der Anlage.

Fällt z.B. die Belebtschlammaktivität langsam, kann das ein Anzeichen für die schleichende Vergiftung des Belebtschlammes durch toxische Substanzen sein.

Die Firma GIMAT GmbH Umweltmesstechnik, Polling vertreibt Zehrungsanalytoren und Toximeter. Bei den Zehrungsanalytoren wird die Sauerstoffzehrung als Maß für die Atmungsaktivität der Mikroorganismen verwendet. Ein Kompressor erzeugt ein Vakuum, über das die Probe angesaugt und in ein Messgefäß geleitet wird. Die Probe in dem Gefäß wird mit Sauerstoff gesättigt. Aus der zeitlichen Abnahme der Sauerstoffkonzentration nach der Unterbrechung der Sauerstoffversorgung kann der BSB₅ berechnet werden. In den Zehrungsanalytoren wird die Probe direkt aus der biologischen Stufe verwendet, daher kann auf Reagenzien und eine normierte Biologie verzichtet werden. Dagegen wird für die Toximeter die angesaugte Probe mit einem Belebtschlamm aus einem separaten Reaktor gemischt und anschließend die Zehrung an Sauerstoff bestimmt. Je nach Toxizität nimmt der Sauerstoffgehalt schnell oder langsam ab und es kann aus der zeitlichen Abnahme auf toxische Wirkungen auf die Mikroorganismen geschlossen werden.

Von der Firma STIP Isco GmbH, Groß-Umstadt werden verschiedene Geräte zur Messung des toxischen Einflusses auf den Belebtschlamm und des BSB angeboten. Der BIOX-1010 ist ein kontinuierlich arbeitendes Kurzzeit-BSB-Messgerät. Das Messverfahren basiert auf einer dynamischen Verdünnungsregelung zweier Mischpumpen in Abhängigkeit von der Atmung von Mikroorganismen. Diese werden in einem Bioreaktor auf Kunststoffringen immobilisiert. Abwasser und sauerstoffhaltiges Verdünnungswasser werden durch die beiden Mischpumpen so eingeregelt, dass sich im Bioreaktor ein gleich bleibender Sauerstoffverbrauch einstellt. Das Abwasser wird je nach Verschmutzungsgrad mehr oder weniger mit Verdünnungswasser vermischt. Der konstante Sauerstoffverbrauch im Bioreaktor entspricht einer bestimmten BSB-Konzentration. Über das Mischungsverhältnis von Abwasser- zu Verdünnungswasserpumpe und die konstante BSB-Konzentration im Bioreaktor berechnet sich die BSB-Konzentration im Abwasser. Der STIPTOX-adapt (W) ist ein Toximeter mit einer immobilisierten Wirbelbett-Biologie. Die Mikroorganismen wachsen wie beim BIOX-1010 innerhalb kleinerer Hohlzylinder und sind wie der Belebtschlamm einer Kläranlage an das Abwasser adaptiert. Sind Abwässer für die adaptierte Biologie nicht toxisch, wird der gelöste Sauerstoff im Bioreaktor von den Organismen veratmet. Ein toxischer Stoß hemmt die Atmung der Organismen und der Sauerstoffgehalt im Bioreaktor steigt an. Bei annähernd 20%iger Atmungshemmung wird automatisch eine weitere Abwasserverdünnung aktiviert, die sich so

einregelt, dass die Aktivitätsminderung im Ereignisfall 20% nicht übersteigt. Sie schützt die Biologie und ist ein Maß für die Toxizität. Das Mischungsverhältnis von Abwasser zu Verdünnungswasser sowie die Sauerstoffdifferenz dienen zur Toxizitätsanzeige (0 – 100%). Der STIPTOX-adapt (B) ist ein kontinuierlich arbeitendes Toximeter. Als Detektorbiologie wird hier direkt der Belebtschlamm der Kläranlage eingesetzt. Zur Messung wird das Abwasser kontinuierlich mit Belebtschlamm und Verdünnungswasser gemischt. Sind Abwässer für die adaptierte Biologie nicht toxisch, wird der gelöste Sauerstoff im Bioreaktor vom Belebtschlamm veratmet. Ein toxischer Stoß hemmt die Atmung des Belebtschlammes und der gelöste Sauerstoff im Bioreaktor steigt an. Der STIPTOX-norm ist ein Toximeter mit einer immobilisierten, normierten Biologie. Die normierten Mikroorganismen werden durch Zugabe einer Nährlösung aufgezogen und wachsen wie beim BIOX-1010 innerhalb kleiner Hohlzylinder. Die Regelung ist entsprechend der des STIPTOX-adapt (W).

Von der Firma KELMA NV, Niel, Belgien werden online Analysatoren zur Bestimmung des BSB und der Toxizität angeboten. Der RODTOX 2000 besteht aus einem Reaktor mit 10 L Belebtschlamm, welcher kontinuierlich belüftet wird. Die Konzentration an Sauerstoff wird nach der Dosierung von abbaubaren Referenzsubstraten und unbekanntem Proben bestimmt. Die Dosierung der Referenzsubstanzen dient zur Kalibrierung und Überprüfung der Belebtschlammorganismen, hierbei sind die Peakfläche und die Peakhöhe proportional zum BSB und die Steigung ein Maß für die mikrobielle Aktivität. Die Toxizität wird durch einen Vergleich von Peaks der Referenzsubstanzen vor und nach der Dosierung der Probelösung ermittelt. Der NITROX 2000 ist ein Online-Analysator zum Schutz des Nitrifikationsprozesses vor inhibierenden Einflüssen. Der zu testende Abwasserstrom wird mit einer Nitrifikantenkultur vermischt und die Aktivität der Mikroorganismen durch Messung der Sauerstoffaufnahme detektiert. Eine geringe Sauerstoffaufnahme weist auf toxische Komponenten in der Probe hin.

Die Firma AppliTek, Nazareth, Belgien bietet kombinierte BOD- und Toxizitätsmessgeräte an. Das Ra-COMBO[®] verwendet den Belebtschlamm aus der entsprechenden Abwasserreinigungsanlage, damit werden Effekte durch pH-Wert oder Temperaturverschiebung vermieden. Der Belebtschlamm wird kontinuierlich mit einer Schlauchpumpe durch den geschlossenen und vollständig durchmischten Respirationsbehälter gepumpt. Mit Hilfe eines Ventilsystems wird nach einer festgelegten Zeit die Durchflussrichtung durch den Respirationsbehälter umgekehrt. Dadurch wird an dem Sauerstoffsensoren in dem Behälter abwechselnd die Sauer-

stoffkonzentration des ein- und ausfließenden Abwasserstroms bestimmt. Das Steuerungssystem berechnet die Respirationsgeschwindigkeit auf der Grundlage des Massengleichgewichts für Sauerstoff in dem Behälter. Die Überprüfung des Systems wird durch die Dosierung einer Standardsubstanz durchgeführt.

Die online Respirometer der Firma Columbus Instruments, Columbus, USA basieren nicht auf einer Erfassung der Sauerstoffrespiration in der flüssigen Phase, sondern bestimmen die Änderungen der Konzentration in der Gasphase in einem integrierten Reaktor. Damit kann ein Rückschluss auf die Atmungsgeschwindigkeit und entsprechend auf die mikrobielle Aktivität getroffen werden.

Zur Detektion von inhibierenden Substanzen wurde von den Firmen Siemens Environmental Systems, Poole, Großbritannien und AZUR Newark, USA der Leuchtbakterientest zu einem Online-System weiterentwickelt. Das MICROTOX[®] OS System nutzt die Biolumineszenz der Leuchtakterien, um die Toxizität von Wasser anzuzeigen. Das System besteht aus einer Probenvorbereitungs- und einer Messeinheit, die Probenvorbereitungseinheit dient zur Filtration der Proben. In der Messeinheit werden die Proben mit den Testorganismen vermischt und die Lichtemission bestimmt. Das System ist in der Lage, alle 20 Minuten eine Probe zu verarbeiten und damit einen Schutz der Mikroorganismen im Belebtschlamm zu ermöglichen.

3.4 Simulationssoftware

Für die Vorgänge der Nährstoffelimination in biologischen Kläranlagen sind keine einfachen Ursache-Wirkungs-Beziehungen zu finden. Die Auswirkungen von z.B. Veränderungen im Zulauf zur Kläranlage auf das Belebtschlammesystem oder den Ablauf sind vielfältig. Zum besseren Verständnis der in der Kläranlage ablaufenden Prozesse werden daher mathematische Modelle erstellt. Einfache statische Modelle sind zum Beispiel das Arbeitsblatt A-131 und der HSG-Ansatz (ATV 1991 und BÖHNKE 1989), die zur Dimensionierung von Belebungsanlagen benutzt werden können. Derartige Modelle sind jedoch nicht geeignet, Aussagen zu dynamischen Vorgängen zu machen. Hierzu sind genauere Modelle erforderlich, die vorzugsweise mit Hilfe von Stoffbilanzen das Verhalten der Belebungsanlagen unter unterschiedlichen Belastungszuständen und Betriebsstrategien beschreiben. Man versteht unter dynamischer Simulation das Arbeiten mit einem solchen mathematischen Modell, das durch das Erkennen des zeitabhängigen Verhaltens Rückschlüsse auf das tatsächliche Reagieren der Anlage möglich macht.

Die Simulation kann bei Neu- und Ausbauplanungen von Kläranlagen eingesetzt werden, dies gilt sowohl bei Anlagen zur Reinigung kommunaler als auch industrieller Abwässer, wobei es sich bei der Planung stets um Offline-Anwendungen der Simulation handelt. Weitere Einsatzbereiche der Simulation ergeben sich beim Betrieb von Kläranlagen sowie bei der Aus- und Weiterbildung (ATV 1997b). Bei der Planung und im Betrieb der Abwasserreinigungsanlagen kann die Simulation auf vielfältige Wege eingesetzt werden:

- Ermitteln kritischer Belastungsfälle anhand der Grundlagendaten (z.B. Ganglinien von Temperatur, Frachten oder Abwasserzusammensetzung)
- Erkennen kritischer Betriebszustände, die bei Umbaumaßnahmen auftreten können
- Testen verschiedener Verfahrensvarianten unter gleichen Randbedingungen
- Entwickeln und Optimieren von Steuer- und Regelstrategien (z.B. Sauerstoffeintrag, Unterteilen der Beckenvolumina in unterschiedliche Beckenteile, interne Rezirkulation, Zudosieren externer C-Quellen)
- Beurteilen von Auswirkungen von Spitzenbelastungen und Änderungen der Abwasserzusammensetzung oder unvorhergesehenen Entwicklungen im Einzugsgebiet
- Entwicklung von Ausbaukonzepten (Stufenlösungen)

In der Aus- und Weiterbildung auf den Abwasserreinigungsanlagen sowie in der Forschung kann die Simulation zur Verbesserung des Verständnisses beitragen, es werden Prozesse und Größen darstellbar, welche über eine direkte Messung nicht zugänglich sind. Die Simulation erlaubt weiterhin das Erkennen und Unterscheiden von besonderen Betriebszuständen (z.B. Stoßbelastung) und Störfällen (z.B. Pumpenausfall, Auswirkungen toxischer Abwässer) und die Bewertung von Eingriffen in die Betriebsführung bei diesen Betriebszuständen.

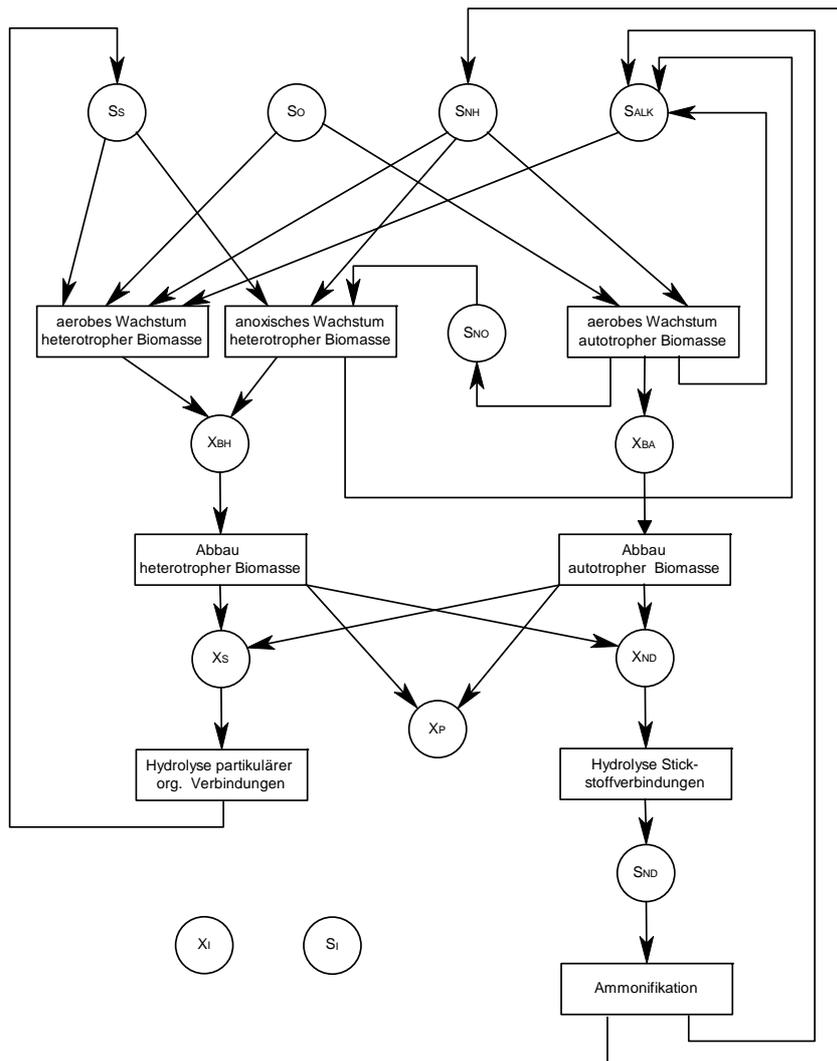


Abbildung 3-7: Stoffgruppen und Prozesse im ASM 1

Das Programm SIMBA[®] der ifak system GmbH, Magdeburg ist eine Software, mit der Kläranlagen modelliert und simuliert werden können. Die implementierten Modelle gestatten es, das Verhalten einer Kläranlage und der ablaufenden komplexen, biochemischen Prozesse der Abwasserreinigung zu analysieren. Die Simulation basiert auf dem Activated Sludge Model No. 1 (ASM 1); dieses wurde 1987 von einer Arbeitsgruppe der jetzigen IWA (International Water Association) aufgestellt (HENZE et al. 1987). Das Modell basiert auf einem Monod-Ansatz zur Charakterisierung des Wachstums von Mikroorganismen. Das ASM 1 beschreibt die Umwandlungsprozesse, die unter aeroben und anoxischen Bedingungen auf die verschiedenen Fraktionen der organischen Stoffe und des Stickstoffes in kommunalem Abwasser einwirken und beinhaltet keine Beschreibung von Transportprozessen. In der Publikation des ASM 1 werden Anhaltspunkte über die Größenordnung der Modellparameter gegeben. Die absoluten Werte dieser Parameter sind aber nicht Teil des Modells und müssen auf Grund der Erfahrung des Anwenders und mit Hilfe von experimentellen Methoden erarbeitet werden.

Den Kern des Modells bildet ein System gekoppelter Differentialgleichungen. Das ASM 1 charakterisiert das Abwasser und den Belebtschlamm mit Hilfe von 7 gelösten und 6 partikulären Stoffen bzw. Stofffraktionen (Tabelle 3-2). Auf diese Stoffe wirken insgesamt 8 Umwandlungsprozesse ein, die das Wachstum und den Sauerstoffbedarf der heterotrophen Mikroorganismen, die Denitrifikation, die Lyse der Mikroorganismen, den Abbau von kolloidalen und partikulären organischen Stoffen sowie die Nitrifikation beschreiben (Abbildung 3-7).

Tabelle 3-2: Stoffe und Stoffgruppen des ASM 1

Stoffgruppe	Symbol	Einheit
biologisch inerte, gelöste organische Stoffe	S_I	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{m}^{-3}$
biologisch schnell abbaubare, gelöste organische Stoffe	S_S	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{m}^{-3}$
biologisch inerte, partikuläre organische Stoffe	X_I	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{m}^{-3}$
biologisch langsam abbaubare organische Stoffe	X_S	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{m}^{-3}$
aktive heterotrophe Biomasse	X_{BH}	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{m}^{-3}$
aktive autotrophe Biomasse	X_{BA}	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{m}^{-3}$
partikuläre Zerfallsprodukte der Biomasse	X_P	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{m}^{-3}$
gelöster Sauerstoff	S_O	$\text{g} \text{m}^{-3}$
Nitrat- und Nitrit-Sauerstoff	S_{NO}	$\text{g}_N \text{m}^{-3}$
Ammoniak- und Ammonium-Stickstoff	S_{NH}	$\text{g}_N \text{m}^{-3}$
biologisch abbaubarer, gelöster organisch gebundener Stickstoff	S_{ND}	$\text{g}_N \text{m}^{-3}$
partikuläre organische Stickstoffverbindungen	X_{ND}	$\text{g}_N \text{m}^{-3}$
Alkalinität	S_{ALK}	$\text{mol} \text{m}^{-3}$

Das ASM 1 ist auf Erhaltungssätzen aufgebaut, zur Beschreibung der organischen Inhaltsstoffe wird der CSB benutzt, da nur mit dieser Messgröße eine Bilanzierung möglich ist. Die Prozessgeschwindigkeiten werden durch kinetische Ausdrücke mit Hilfe von 14 Parametern und die Prozess durch 5 stöchiometrische Parameter beschrieben (Tabelle 3-3).

Das in dem Programm SIMBA[®] implementierte Modell ASM1m ermöglicht es den Einfluss der Temperatur zu simulieren. Dafür wurden unter anderem temperaturabhängige Faktoren für die Wachstumsgeschwindigkeit μ_H und μ_A sowie für die Zerfallsrate b_H und b_A berücksichtigt (siehe Handbuch zum Programm SIMBA[®], Fa. ifak system GmbH, Magdeburg).

Tabelle 3-3: Parameter des Belebtschlamm-Modells ASM 1 mit typischen Werten und der Schwankungsbreite für eine Abwassertemperatur von 20 °C (nach BORNEMANN et al. 1998)

Parameter	Symbol	Wert	Schwankung
Stöchiometrische Parameter:			
Ertrag der heterotrophen Biomasse in $\text{g}_{\text{CSB}} \text{g}^{-1}_{\text{CSB}}$	Y_{H}	0,64	0,6 – 0,7
Ertrag der autotrophen Biomasse in $\text{g}_{\text{CSB}} \text{g}^{-1}_{\text{N}}$	Y_{A}	0,24	
Stickstoffanteil der Biomasse in $\text{g}_{\text{N}} \text{g}^{-1}_{\text{CSB}}$	i_{XB}	0,086	
Stickstoffanteil in den inerten Zerfallsprodukten der Biomasse in $\text{g}_{\text{N}} \text{g}^{-1}_{\text{CSB}}$	i_{XP}	0,06	0,05 – 0,07
Anteil der inerten Zerfallsprodukte an der Biomasse	f_{p}	0,08	0,07 – 0,1
Kinetische Parameter:			
Sättigungsbeiwert der schnell abbaubaren Substanzen in $\text{g}_{\text{CSB}} \text{m}^{-3}$	K_{S}	5	1 – 5
Sättigungsbeiwert des Sauerstoffs für die heterotrophe Biomasse in $\text{g}_{\text{O}_2} \text{m}^{-3}$	K_{OH}	0,2	0,2 – 0,5
Sättigungsbeiwert des Sauerstoffes für die autotrophe Biomasse in $\text{g}_{\text{O}_2} \text{m}^{-3}$	K_{OA}	0,4	0,3 – 0,6
Sättigungsbeiwert der Nitratatmung in $\text{g}_{\text{NO}_3\text{-N}} \text{m}^{-3}$	K_{NO}	0,5	
Sättigungsbeiwert des $\text{NH}_4\text{-N}$ -Abbaus in $\text{g}_{\text{NH}_4\text{-N}} \text{m}^{-3}$	K_{NH}	0,5	0,2 – 0,7
Sättigungsbeiwert der Hydrolyse langsam abbaubarer Substanzen in $\text{g}_{\text{CSB}} \text{g}^{-1}_{\text{CSB}}$	K_{X}	0,03	
max. spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der heterotrophen Biomasse in d^{-1}	μ_{H}	4	3 – 6
max. spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der autotrophen Biomasse in d^{-1}	μ_{A}	0,9	bis 1
spezifische Zerfallsgeschwindigkeit der heterotrophen Biomasse in d^{-1}	b_{H}	0,4	0,3 – 0,5
spezifische Zerfallsgeschwindigkeit der autotrophen Biomasse in d^{-1}	b_{A}	0,15	
maximale spezifische Hydrolyserate in d^{-1}	k_{H}	3,0	1 – 10
Korrekturfaktor für die anoxische Atmung der heterotrophen Biomasse	η_{g}	0,8	
Korrekturfaktor für die Hydrolyse unter anoxischen Bedingungen	η_{h}	0,6	0,5 – 0,7
Ammonifikationsrate $\text{m}^3_{\text{CSB}} \text{g}^{-1} \text{d}^{-1}$	k_{A}	0,08	

In dem ASM 1 führt das aerobe und anoxische Wachstum der heterotrophen Biomasse zu einer Zunahme der Aktivität der heterotrophen Biomasse, dagegen führt der Abbau der heterotrophen Biomasse zu einer Verringerung der Aktivität, dieser Zusammenhang ist in der Formel 3-10 dargestellt. Die Gleichung zeigt, dass in dem ASM 1 inhibierende Stoffe nicht vorgesehen sind.

$$\frac{dX_{BH}}{dt} = \left[\begin{array}{l} \text{aerobes Wachstum der} \\ \text{heterotrophen X} \end{array} \right] + \left[\begin{array}{l} \text{anoxisches Wachstum der} \\ \text{heterotrophen X} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Abbau der} \\ \text{heterotrophen X} \end{array} \right]$$

$$\frac{dX_{BH}}{dt} = \left[\mu_H \left(\frac{S_S}{K_S + S_S} \right) \left(\frac{S_O}{K_{O,H} + S_O} \right) X_{BH} \right] + \left[\mu_H \left(\frac{S_S}{K_S + S_S} \right) \left(\frac{S_O}{K_{O,H} + S_O} \right) \left(\frac{S_{NO}}{K_{NO} + S_{NO}} \right) \eta_G X_{BH} \right] - [b_H X_{BH}]$$

Formel 3-10: Differentialgleichung zur Beschreibung der Änderungen der aktiven heterotrophen Biomasse im ASM 1 (X = Biomasse)

Die Änderungen der Konzentration der autotrophen Biomasse werden von dem Wachstum und dem Abbau der autotrophen Biomasse beeinflusst (Formel 3-11).

$$\frac{dX_{BA}}{dt} = \left[\begin{array}{l} \text{aerobes Wachstum der} \\ \text{autotrophen X} \end{array} \right] - \left[\begin{array}{l} \text{Abbau der} \\ \text{autotrophen X} \end{array} \right]$$

$$\frac{dX_{BA}}{dt} = \left[\mu_A \left(\frac{S_{NH}}{K_{NH} + S_{NH}} \right) \left(\frac{S_O}{K_{O,A} + S_O} \right) X_{BA} \right] - [b_A X_{BA}]$$

Formel 3-11: Differentialgleichung zur Beschreibung der Änderungen der aktiven autotrophen Biomasse im ASM 1 (X = Biomasse)

Als Bestimmungsmethoden zur Abschätzung von X_{BH} und X_{BA} kamen verschiedene Methoden zum Einsatz. Kappeler und Gujer haben die Konzentration der heterotrophen Biomasse mittels der Bestimmung der Sauerstoffaufnahme in Batch-Untersuchungen ermittelt (KAPPELER und GUJER 1992). Von Wentzel wurde die Wichtigkeit des Parameters X_{BH} für die kinetische Simulation betont. Zur Bestimmung dieser Größe wurden Batch-Tests durchgeführt, in denen der CSB, die Konzentration der Stickstoffkomponenten sowie die Sauerstoffaufnahme und über Massenbilanzen die Konzentration der heterotrophen Biomasse bestimmt wurden (WENTZEL et al. 1998). Die Ammonium-, Nitrat und Sauerstoffaufnahme wurde von Kristensen zur Charakterisierung der Nitrifikanten, Denitrifikanten und heterotrophen Mikroorganismen eingesetzt (KRISTENSEN et al. 1992). Xu und Hultman haben die hetero- und autotrophe Aktivität der Mikroorganismen über Messungen des CSB und der Sauerstoffaufnahme und eine anschließende Modellkalibrierung bestimmt (XU und HULTMAN 1996).

4 Material und Methoden

4.1 Material

Die Standardlaborchemikalien wurden von den Firmen Fluka (Neu-Ulm), Roth (Karlsruhe) und VWR (Darmstadt) bezogen, eingesetzt wurden die Chemikalien in den Reinheiten purum und purissimum. Die verwendeten Mikroorganismen-Reinkulturen wurden von der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig) bezogen und der Belebtschlamm wurde den Abwasserreinigungsanlagen in Frankfurt-Niederrad, Frankfurt-Sindlingen und Kriftel entnommen.

4.2 Medien und Puffer

4.2.1 M1-Medium

Pepton (Fa. Roth)	5	g
Fleischextrakt (Fa. VWR)	3	g
Wasser <small>bidest.</small>	ad 1000	mL

Der pH-Wert wurde auf 7,0 eingestellt, für die Kultivierung von *Bacillus subtilis* wurde dem Medium $10 \text{ mg L}^{-1} \text{ MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ zugesetzt.

4.2.2 AM-Medium

Als Mineralmedium für die Kultivierung von *E. coli* 498 wurde ein definiertes Medium nach SÜSSMUTH et al. (1987) eingesetzt.

K_2HPO_4	3,5	g	
KH_2PO_4	1,5	g	
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	1	g	
$\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	0,5	g	
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,1	g	
Glucose	2	g	(separat autoklaviert)
Wasser <small>bidest.</small>	ad 1000	mL	

4.2.3 Medium 382

Für die Kultivierung von *E. coli* TG 1 wurde das Medium 382 der DSMZ verwendet.

10xM9-Salze	100	mL	
1M MgSO ₄ ·7 H ₂ O	1	mL	(separat autoklaviert)
0,1M CaCl ₂ ·2 H ₂ O	1	mL	(separat autoklaviert)
1M Thiamin-HCl	1	mL	(sterilfiltriert)
Glucose (200 g L ⁻¹)	10	mL	(separat autoklaviert)
L-Prolin (4 mg mL ⁻¹)	5	mL	(sterilfiltriert)
Wasser bidest.	ad 1000	mL	

10xM9-Salze:

Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	75,3	g
KH ₂ PO ₄	30	g
NH ₄ Cl	10	g
NaCl	5	g
Wasser bidest.	ad 1000	mL

Für die kontinuierliche Kultivierung von *E. coli* TG 1 im Chemostaten wurde eine Glucosekonzentration von 1 g L⁻¹ eingestellt (Batch-Versuch: 3 g L⁻¹), damit sollte sichergestellt werden, dass die Kohlenstoffquelle der wachstumslimitierende Faktor ist.

4.2.4 Komplexmedien für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* im Komplexmedium wurden die Medien 393 (YPD Medium) und 186 (YM Medium) der DSMZ eingesetzt.

YPD Medium:

Hefeextrakt (Fa. Roth)	10	g
Pepton (Fa. Roth)	20	g
Glucose	20	g
Wasser bidest.	ad 1000	mL

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 6,5 eingestellt.

YM Medium:

Hefeextrakt (Fa. Roth)	3	g
Malzextrakt (Fa. Fluka)	3	g
Pepton (Fa. Roth)	5	g
Glucose	10	g
Wasser <small>bidest.</small>	ad 1000	mL

4.2.5 Mineralmedium für die Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae*

Für die Kultivierung von *S. cerevisiae* in einem Mineralmedium wurde Difco Yeast Nitrogen Base (Difco Laboratories, Detroit, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Universalmedium für Hefen, welches bis auf die Kohlenstoffquelle alle nötigen Bestandteile beinhaltet. Als Kohlenstoffquelle wurde dem Medium Glucose zugesetzt.

10fach Yeast Nitrogen Base	100	mL
Glucose-Lösung (170 g L ⁻¹)	59	mL
Wasser <small>bidest.</small>	ad 1000	mL

10fach Yeast Nitrogen Base:

Yeast Nitrogen Base	67	g
Wasser <small>bidest.</small>	ad 1000	mL

4.2.6 Modifiziertes Eremenco-Medium

Für die Kultivierung von *Pseudomonas fluorescens* (DSMZ 6147) wurde das modifizierte Eremenco-Medium eingesetzt (ONKEN und JOSTMANN 1984).

(NH ₄) ₂ SO ₄	1,3	g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	7	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O (216 mg mL ⁻¹)	46,3	µL
KH ₂ PO ₄	1	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O (216 mg mL ⁻¹)	0,9	mL
MnCl ₂ · H ₂ O (37 mg mL ⁻¹)	0,3	mL
FeCl ₃ · 6 H ₂ O (146 mg mL ⁻¹)	34,2	µL
Glucose-Lösung (500 g L ⁻¹)	10	mL
Wasser <small>bidest.</small>	ad 1000	mL

Zur Herstellung dieses Mediums wurden 800 mL bidestilliertes Wasser vorgelegt, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ und KH_2PO_4 eingewogen und autoklaviert. $\text{CaCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$, $\text{MnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ und $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ wurden separat in bidestilliertem Wasser gelöst und autoklaviert. Die Glucoselösung wurde ebenfalls separat autoklaviert. Die Stammlösungen wurden steril zusammengegeben und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt.

4.2.7 Medium 11

Zur Kultivierung von *Lactobacillus pentosus* wurde das Medium 11 der DSMZ eingesetzt.

Casein Pepton (Fa. VWR)	10	g
Fleischextrakt (Fa. VWR)	10	g
Hefeextrakt (Fa. Roth)	5	g
Glucose-Lösung (500 g L ⁻¹)	40	mL
Tween 80	1	g
K ₂ HPO ₄	2	g
CH ₃ COONa	5	g
Ammoniumcitrat	2	g
MgSO ₄ ·7 H ₂ O (216 mg mL ⁻¹)	0,9	mL
MnSO ₄ ·H ₂ O (93 mg mL ⁻¹)	0,5	mL
Wasser bidest.	ad 1000	mL

Nach Vorlage von 800 mL bidestilliertem Wasser wurden die entsprechenden Mengen Casein Pepton, Fleischextrakt, Hefeextrakt, Tween 80, K₂HPO₄, CH₃COONa sowie Ammoniumcitrat eingewogen und der pH-Wert auf 6,4 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde das Medium mit steriler Glucose-, MgSO₄·7 H₂O - und MnSO₄·H₂O - Lösung komplettiert und mit sterilem Wasser auf 1 L aufgefüllt.

4.2.8 Azotobacter-Medium

Für die Kultivierung von *Azotobacter vinelandii* wurde das Medium 3 der DSMZ verwendet.

Glucose	5	g
Mannitol	5	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,1	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,1	g
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	5	mg
K ₂ HPO ₄	0,9	g
KH ₂ PO ₄	0,1	g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	0,01	g
CaCO ₃	5	g
Wasser bidest.	ad 1000	mL

Glucose und Mannitol wurden jeweils in 50 mL Wasser gelöst, separat autoklaviert und anschließend dem Medium zugesetzt. Der pH-Wert des Mediums wurde auf 7,3 eingestellt.

4.2.9 Medium für Methylobacterium

Für die Kultivierung von *Methylobacillus sp.* (DSM Nr. 8269) wurde das Medium 125 der DSMZ eingesetzt.

KNO ₃	1	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,2	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,02	g
Na ₂ HPO ₄	0,23	g
NaH ₂ PO ₄	0,07	g
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	1	mg
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	5	µg
H ₃ BO ₃	10	µg
MnSO ₄ · 5 H ₂ O	10	µg
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	70	µg
MoO ₃	10	µg
Wasser bidest.	ad 1000	mL

Der pH-Wert des Mediums wurde auf 6,8 eingestellt und 5 ml sterilfiltriertes Methanol als Kohlenstoffquelle zugesetzt.

4.2.10 Medium 830 B

Für die denitrifizierende Kultivierung von *Pseudomonas* sp. (DSM Nr. 50117) wurde das Medium 830 B verwendet.

Hefeextrakt (Fa. Roth)	0,5	g
Proteose Pepton (Fa. VWR)	0,5	g
Casamino acids (Fa. Roth)	0,5	g
Glucose	0,5	g
Stärke (Fa. Roth)	0,5	g
Natriumpyruvat	0,3	g
K ₂ HPO ₄	0,3	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05	g
Wasser <small>bidest.</small>	ad 1000	mL

Der pH-Wert wurde mit K₂HPO₄ oder KH₂PO₄ auf 7,2 eingestellt.

4.2.11 Abwasser-Medium nach DIN 38412

In den vorliegenden Untersuchungen wurden als Modellsubstrat für ein kommunales Abwasser das synthetische Abwasser nach DIN 38412-24 bzw. DIN 38412-26 und eine Modifikation dieses Substrates eingesetzt. Hierfür wurde das Medium hinsichtlich der Stickstoffquelle verändert, statt Harnstoff wurde Ammoniumchlorid eingesetzt.

Es wurden jeweils 200fach Konzentrate der Substrate mit bidestilliertem Wasser angesetzt, die Tabelle 4-1 zeigt die Zusammensetzung der Lösungen. Die Lösung A wurde bei -20 °C eingefroren und die Lösung B bei Zimmertemperatur gelagert. Als Nährlösung für die Modellkläranlage wurden je 5 mL der Lösungen A und B mit Trinkwasser auf 1 L verdünnt.

Tabelle 4-1: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers

Substanz	Abwassermedium nach DIN		Modifiziertes Medium	
	c in mg L ⁻¹	c in g L ⁻¹	c in mg L ⁻¹	c in g L ⁻¹
	Anwendungs- Konzentration	200fach Konzentrat	Anwendungs- Konzentration	200fach Konzentrat
Lösung A:				
Pepton (Fa. Roth)	160	32	160	32
Fleischextrakt (Fa. VWR)	110	22	110	22
Harnstoff	30	6	-	-
Ammoniumchlorid	-	-	120	24
NaCl	7	1,4	7	1,4
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	4	0,8	4	0,8
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	2	0,4	2	0,4
Lösung B:				
K ₂ HPO ₄	28	5,6	28	5,6

4.2.12 Nitrifikanten-Medium

Zur Kultivierung der Nitrifikanten kam ein Medium nach EN ISO 9509 zum Einsatz. In einem Liter Wasser wurden 5,04 g NaHCO₃ und 2,65 g (NH₄)₂SO₄ gelöst. Das Nährmedium wurde 10fach verdünnt eingesetzt, es enthielt dann 56 mg Stickstoff je Liter und hatte einen pH-Wert von 7,6.

4.2.13 Denitrifikanten-Medium

NaNO ₃	0,42 g
NaCH ₃ COO · 3 H ₂ O	0,42 g
KH ₂ PO ₄	0,15 g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0,15 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,02 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,05 g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	6,5 mg
Wasser <small>bidest.</small>	ad 1000 mL

4.2.14 Medium für anaeroben Abbau

NaCH ₃ COO · 3 H ₂ O	1,04	g
KH ₂ PO ₄	0,38	g
Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	0,47	g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,05	g
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,13	g
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0,017	g
Wasser <small>bidest.</small>	ad 1000	mL

4.2.15 Sörensen-Puffer

Zur Herstellung eines Puffers nach Sörensen (0,2 mol L⁻¹, pH-Wert 7,0) wurden 61,2 mL der Lösung B zu 38,8 mL der Lösung A gegeben.

Lösung A: 9,078 g L⁻¹ KH₂PO₄

Lösung B: 11,876 g L⁻¹ Na₂HPO₄ · 2 H₂O

4.3 Methoden

4.3.1 Stammhaltung der Mikroorganismen

Die Stammhaltung der Mikroorganismen erfolgte auf Agarplatten mit dem entsprechenden Medium, es wurden jeweils 1,5 % Agar zugesetzt. Inkubiert wurden die Agarplatten in einem Inkubator (2771, Fa. Köttermann, Uetze/Hänigsen) bei der vorgeschriebenen Temperatur, anschließend wurden die Platten im Kühlschrank gelagert und alle 3 Monaten überimpft.

4.3.2 Kultivierung der Vorkulturen

Die Kultivierung der Vorkultur erfolgte auf dem Schüttel-Inkubator (Certomat H bzw. Certomat R mit Heizhaube Certomat HK, Fa. B. Braun, Melsungen) in dem entsprechenden Medium bei den für die Mikroorganismen vorgegebenen Temperaturen bei 150 rpm.

4.3.3 Analytik

4.3.3.1 Optische Dichte

Die Messung der optischen Dichte erfolgte bei 600 nm mit dem Photometer Lambda 25 (Perkin Elmer, Rodgau) gegen Wasser. Probenlösungen wurden mit Wasser auf einen Messwert zwischen 0,1 und 0,5 eingestellt, alle Messungen erfolgten als Doppelbestimmungen.

4.3.3.2 Biotrockenmasse

Die Bestimmung der Biotrockenmasse erfolgte gravimetrisch. In ausgewogenen Zentrifugengläsern wurde ein definiertes Volumen der Probe gegeben und für 15 min bei 15000 x g zentrifugiert (Zentrifuge Centrikon 401, Rotor A 8.24, Fa. Kontron, Zürich, Schweiz). Der Überstand wurde verworfen und die Zentrifugenröhrchen bei 105 °C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Die Gefäße wurden in einem Exsikkator abgekühlt und durch Rückwiegen der Trockenrückstand bestimmt.

4.3.3.3 Dehydrogenaseaktivität (TTC-Test)

Die Dehydrogenasen haben in der Atmungskette eine große Bedeutung. Sie gehören zu den Oxidoreduktasen, die Wasserstoff bzw. je zwei Protonen und Elektronen von Wasserstoffdonatoren abspalten und reversibel auf Wasserstoffakzeptoren übertragen. Durch die Aktivität der Dehydrogenasen wird das synthetische Substrat 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), eine farblose, in Wasser lösliche Verbindung, zu rotem Formazan reduziert. Das Formazan kann durch Ethanol aus den Zellen extrahiert und anschließend photometrisch bestimmt werden (DEV 1993).

Die Testdurchführung wurde in Anlehnung an den Dr. Lange Küvetten-Test LCK 318 (Dr. Lange, Düsseldorf) zur Bestimmung der Schlammaktivität ausgeführt. Für die Kalibrierung wurde eine 1,3,5-Triphenyltetrazolium-Formazan-Lösung (0,1 mg mL⁻¹ Ethanol, Fa. Fluka, Neu-Ulm) mit Ethanol verdünnt und die Extinktion bei 440 nm gemessen (Photometer LASA 10, Dr. Lange, Düsseldorf). Die Messung der Proben erfolgte als Doppelbestimmung. In einen Spritzenkörper wurden 4 mL Probe und 1 mL Lösung 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid -Lösung (0,5 g TTC in 100 mL bidest. Wasser, Fa. Fluka, Neu-Ulm) pipettiert und die Probe für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubation wurde ein Membranfilter (LCW 904, Dr. Lange, Düsseldorf) auf die

Spritze geschraubt, der Ansatz filtriert und das Filtrat verworfen. Zur Extraktion des Farbstoffes aus den Zellen wurden über den Membranfilter 3 mL Ethanol angesaugt, nach 10 min wurde der Spritzeninhalt in eine Küvette filtriert und die Extinktion bei 440 nm gegen Ethanol bestimmt.

4.3.3.4 Proteingehalt

Die Proteinbestimmung wurde nach der Methode von Bradford durchgeführt, die auf einer Bindung des Farbstoffs Coomassie Blau G-250 an positiv geladene Proteine basiert. Dabei tritt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 565 nm (unprotonierte blaue anionische Form) ein.

Die Färbelösung Roti-Quant[®] (Fa. Roth, Karlsruhe) wurde nach Herstellerangaben verdünnt. Zur Kalibrierung wurden 5 – 100 µL einer Proteinlösung (1 mg Rinderserumalbumin mL⁻¹, Fa. Fluka, Neu-Ulm) mit 3 mL des Bradford-Reagenz gemischt und nach 2 min die Extinktion bei 595 nm bestimmt (Photometer Lambda 25, Perkin Elmer, Rodgau).

Der Proteingehalt in flüssigen Proben wurde direkt durch Zugabe von 3 mL Reagenz und anschließender Extinktionsbestimmung vermessen. Zur Bestimmung des Proteingehaltes in den Zellen wurde 1 mL der Probe mit 0,9 mL 0,4 M NaOH gemischt. Die Proben wurden 2 min im siedenden Wasserbad erhitzt und anschließend für 10 min bei 4000 rpm zentrifugiert (Zentrifuge Centrikon 401, Rotor A 72.20, Fa. Kontron, Zürich, Schweiz). Aus dem Überstand wurden 5 – 100 µL für die Proteinbestimmung eingesetzt.

4.3.3.5 Glucose

Die Bestimmung der Glucosekonzentration erfolgte mit dem Glucoseanalysator YSI 2700 Select (Yellow Springs, Ohio, USA). Das immobilisierte Enzym Glucoseoxidase oxidiert D-Glucose mit Sauerstoff zu D-Glucono- δ -Lacton und Wasserstoffperoxid. Das Wasserstoffperoxid diffundiert durch eine Celluloseacetatmembran zu einer Platinelektrode, wo es dann reduziert wird. Der resultierende Strom ist proportional zur Konzentration der Glucose in der Probenlösung.

4.3.3.6 Chemischer Sauerstoffbedarf

Der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) wurde mit Küvettentests der Fa. Dr. Lange, Düsseldorf bestimmt. Der CSB ist ein Summenparameter, der den Gehalt an oxidierbaren

Wasserinhaltsstoffen angibt und damit als ein Maß für die Substratbelastung der Abwässer dient.

Je nach zu erwartendem CSB kamen die Tests LCK 414 (5 - 60 mg L⁻¹), LCK 314 (15 - 150 mg L⁻¹) oder LCK 514 (100 - 2000 mg L⁻¹) zum Einsatz. Die oxidierbaren Stoffe reagieren mit schwefelsaurer Kaliumdichromat-Lösung in Gegenwart von Silbersulfat als Katalysator. Störendes Chlorid wird mit Quecksilber maskiert. Es erfolgt zum Beispiel die Oxidation des Kohlenstoffes eines organischen Substrates und dabei die Reduktion des Chroms vom Kaliumdichromat von Cr⁺⁶ zu Cr⁺³, dieses kann photometrisch bestimmt werden.

Der Bodensatz einer Testküvette wurde durch Schwenken resuspendiert und 2 mL der Probe zupipettiert. Anschließend wurde die Probe für zwei Stunden auf 148°C erhitzt (Thermostat LT 100, Dr. Lange, Düsseldorf). Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die Extinktion im Photometer LASA 10 (Dr. Lange, Düsseldorf) bestimmt, das Photometer zeigt den CSB in mg O₂ L⁻¹ an.

4.3.3.7 Bestimmung des organischen Kohlenstoffes

Die Bestimmung des TOC (total organic carbon) bzw. DOC (dissolved organic carbon) erfolgte mit dem Total Carbon Analyser TOC-5000 der Fa. Shimadzu (Kyoto, Japan) nach dem Differenzverfahren (EN 1484 1997). Die Probe wurde einmal komplett (TC oder DC) und einmal nur der anorganische Kohlenstoff durch Ansäuern und Ausgasen mit nachfolgender Bestimmung des entstandenen Kohlendioxids (TIC oder DIC) vermessen. Die rechnerische Differenz TC - TIC bzw. DC - DIC ergibt den TOC bzw. DOC .

Zur Bestimmung des DOC wurde die Probe bei 15000 x g für 10 min zentrifugiert (Zentrifuge Centrikon 401, Rotor A 8.24, Fa. Kontron, Zürich, Schweiz) und anschließend durch ein hydrophiles Nylonfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm (Fa. Roth, Karlsruhe) filtriert, die TOC-Bestimmung erfolgte direkt im homogenisierten Zustand. Die Auswertung erfolgte mittels zuvor aufgenommenen Kalibriergeraden, zur Kalibrierung wurden eine Phthalat-Lösung mit $\beta(C_{\text{org}}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}$ und eine Karbonat-Lösung mit $\beta(C_{\text{anorg}}) = 1000 \text{ mg L}^{-1}$ eingesetzt.

4.3.3.8 Ammonium, Nitrat und Nitrit

Die Bestimmung der Stickstoffverbindungen erfolgte photometrisch mit den Küvettestests der Fa. Dr. Lange, Düsseldorf. Die Tabelle 4-2 zeigt die entsprechenden Parameter mit Testbereich, Bestellnummer sowie dem Prinzip der Messmethode. Die Durchführung erfolgte

nach den Angaben des Herstellers, zur Auswertung wurde das Photometer LASA 10 (Dr. Lange, Düsseldorf) eingesetzt.

Tabelle 4-2: Eingesetzte Küvetten-Tests zur Bestimmung der Stickstoffkonzentrationen

Parameter	Bereich (*) in mg L ⁻¹	Test- nummer	Prinzip
Nitrat-N	0,23 – 13,5	LCK 339	In schwefel- und phosphorsaurer Lösung reagieren Nitrationen mit 2,6-Dimethylphenol zu 4-Nitro-2,6-dimethylphenol
Nitrat-N	5 – 35	LCK 340	
Nitrit-N	0,6 – 6	LCK 342	in saurer Lösung reagieren Nitrite mit primären, aromatischen Aminen unter Bildung von Diazoniumsalzen, diese bilden mit aromatischen Verbindungen, die eine Amino- oder Hydroxylgruppe enthalten, intensiv gefärbte Azofarbstoffe
Ammonium-N	47 – 130	LCK 302	Ammoniumionen reagieren bei pH 12,6 mit Hypochlorit- und Salicylionen in Gegenwart von Nitroprussid als Katalysator zu Indolphenolblau
Ammonium-N	2 – 47	LCK 303	
Ammonium-N	0,015 – 2	LCK 304	

(*) Arbeitsbereich laut Herstellerangaben

4.3.3.9 Sauerstoffzehrungsmessungen

Die Sauerstoffzehrung wurde online im Belebungsbecken und offline bestimmt. Für die online Bestimmung wurde die Sauerstoffzufuhr in dem Reaktor (siehe Abbildung 4-2 und Abbildung 4-3) kurzzeitig abgeschaltet und die Abnahme der Sauerstoffkonzentration pro Zeiteinheit bestimmt. Die offline Bestimmung erfolgte angelehnt an die EN ISO 8192 (1995) und EN ISO 9509 (1995). Aus dem Belebungsbecken wurden 50 mL Belebtschlamm entnommen und in ein Reaktionsgefäß gegeben. Der Reaktor bestand aus dem Gefäß ($\varnothing_1 = 65$ mm, $\varnothing_A = 75$ mm, H = 73 mm), einem Planschliffdeckel ($\varnothing = 100$ mm, H = 6 mm), einem Schnellverschluss DN 60 und einem Silikonring DN 60. Die Temperierung des Reaktors auf

25 °C erfolgte über ein Wasserbad und einen Thermostaten (U3, Fa. Julabo, Seelbach). Das Medium wurde über den Kompressor (Fa. KNF Neuberger, Freiburg) belüftet. Ein Schreiber (Servogor 120, ABB Goerz, Wien, Österreich) zeichnete den Verlauf des Sauerstoffgehaltes (Sauerstoffmessgerät 530 mit Elektrode TriOxmatic EO 200, WTW, Weilheim) auf. Nachdem die Belüftung abgeschaltet worden war, fiel der Gehalt an Sauerstoff ab. Die Neigung der resultierenden Geraden der Sauerstoffkonzentration ergibt die Schlammatmung OV_{ges} in $mg\ L^{-1}\ min^{-1}$. Zur Bestimmung der Aktivität der Nitrifikanten wurde die Belüftung wieder gestartet. Nachdem die Lösung wieder mit Sauerstoff gesättigt war, wurde 1mg Allylthioharnstoff (Fa. Fluka, Neu-Ulm) in das Reaktionsgefäß gegeben. Nun wurde die Belüftung erneut abgeschaltet, der Verbrauch an Sauerstoff ist jetzt nur auf eine Veratmung der Kohlenstoffverbindungen zurückzuführen (OV_C). Die Differenz zwischen beiden Messungen entspricht der Nitrifikationsatmung OV_N .

4.3.4 Elektrochemische Bestimmung der mikrobiellen Aktivität

4.3.4.1 Messung mit dem Bioaktivitätssensor

Der verwendete Bioaktivitätssensor besteht aus einer Platinanode (Fa. Goodfellow, Bad Nauheim) und einer Sauerstoffdiffusionskathode (Fa. Gaskatel, Kassel). Die Sauerstoff-Diffusionskathode besteht aus einem Trägernetz, auf das ein Katalysatorgemisch aufgebracht ist, und einer darauf aufgewalzten Polytetrafluorethylen-Folie, die als Elektrolytbarriere dient. Das Trägernetz dient als Stützgerüst und zur Stromableitung und besteht aus einem vernickelten Silbergitter. Das Katalysatorgemisch besteht aus Manganoxid, Aktivkohle und Polytetrafluorethylen (PTFE). Der eigentliche Katalysator ist das Manganoxid. Das leitfähige Gerüst um die Katalysatorkörner ist eine Aktivkohle mit einer Oberfläche von $1100\ m^2\ g^{-1}$, das PTFE dient als hydrophobes Bindemittel.

Das Gehäuse des Bioaktivitätssensors (Abbildung 4-1) besteht aus einem dreiteiligen Polymethylmethacrylat-Gehäuse (Eigenbau DECHEMA e.V., Frankfurt). Der Mittelteil bildet den durchströmten, kanalförmigen Innenraum. An den Innenraum des Bioaktivitätssensors wurden die Schlauchanschlüsse (Fa. Serto Jacob, Fuldabrück) angeschraubt. An die Platinanode mit einer Fläche von $530\ mm^2$ wurde ein Platindraht durch Widerstandspunktschweißen als Ableitung befestigt (Typ HZ, Messer Griesheim, Krefeld). Dieser Anodenkontakt wurde durch eine Bohrung im Anodenteil geführt, die Anodenoberfläche mit einem Adhäsionskleber (Pattex der Fa. Henkel, Düsseldorf) an dem entsprechenden Seitenteil aufgeklebt und die Bohrung für den Anoden-Kontakt mit einem Silikonkleber (Scrintec 600, Fa. Roth, Karlsruhe-

he) abgedichtet. Zum Abdichten der Zelle wurden in die Seitenteile O-Ringe eingeklebt. Die Sauerstoffdiffusionskathode wurde auf die entsprechende Größe zurechtgeschnitten und der Kathoden-Kontakt in die dafür vorgesehene Vorrichtung eingelegt (HOLTMANN und SELL 2002).

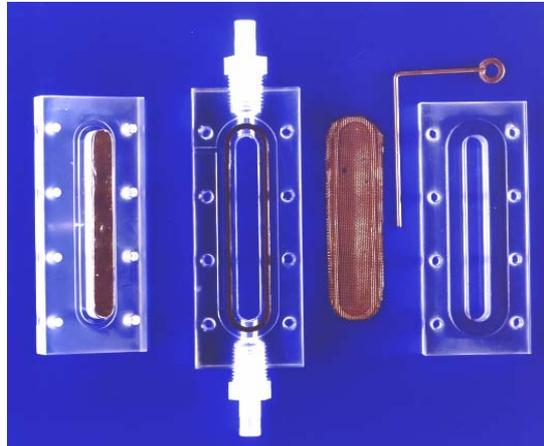


Abbildung 4-1: Fotografie der Komponenten des BAS

Der BAS wurde senkrecht befestigt und mit einer Schlauchpumpe von unten nach oben durchströmt. Die Pumpe förderte das Messmedium aus dem Reaktor durch den Sensor und wieder in das Reaktionsgefäß. Die Anode und Kathode wurden über einen Widerstand von 1000Ω mit dem Multimeter kontaktiert. Mit dem Multimeter wurde das Potential zwischen den Elektroden gemessen. Die Erfassung des Signals des Bioaktivitätssensors erfolgte mit dem Digitalmultimeter (DMM 2000, Fa. Keithley, Germering) über eine Messdatenerfassungssoftware (Fa. M. Bliedernicht - EDV-Systeme, Mainz) und einem PC.

4.3.4.2 Untersuchungen mit dem potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystem

Das 3-Elektrodensystem besteht aus einer Arbeitselektrode (Platin-Stift-Elektrode, Elektrodenfläche $0,15 \text{ cm}^2$ 6.0331.000, Fa. Metrohm, Filderstadt), einer Gegenelektrode (Doppel-Platinblech-Elektrode, 6.0309.100, Fa. Metrohm, Filderstadt) und einer Referenzelektrode (gesättigtes Silber/Silberchlorid, Fa. Ingold, Steinbach). Es wurde ein Potentiostat (PS 6, Fa. Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) benutzt, dessen Steuerung und Messwerterfassung (PS-Remote V 2.2., Fa. Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf) mit einem PC erfolgte. Mit diesem Messaufbau lassen sich einerseits Ströme bei voreingestelltem Potential messen und andererseits cyclovoltammetrische Untersuchungen durchführen. Hierbei wird das Potential von einem Startwert mit einem konstanten Spannungsvorschub verändert, bis der Umschaltpunkt erreicht ist. Anschließend wird das Potential wieder auf den Startwert eingestellt, diese Schleifen können mehrfach durchfahren werden.

Die Untersuchungen wurden in 50 mL-Reaktoren mit 5 Schlifföffnungen NS24 durchgeführt. Der Reaktorinhalt wurde über ein Durchflussmesser (Fa. Krohne, Duisburg) und ein Tauchrohr mit Porzellanfritte mit 20 L Stickstoff pro Stunde begast, um eine Reoxidation der reduzierten Substanzen durch Sauerstoff zu vermeiden. In drei Schlifföffnungen wurden die Elektroden eingesetzt, die fünfte Öffnung diente zur Dosierung von Substanzen und zur Entnahme von Proben.

4.3.5 Batch-Versuche

Der Reaktor setzte sich aus einem Glasgefäß ($\varnothing_I = 65$ mm, $\varnothing_A = 75$ mm, $H = 73$ mm) mit einem Füllvolumen von 250 mL und einem Planschliffdeckel ($\varnothing = 100$ mm, $H = 6$ mm) aus Glas zusammen, dieser wurde mit einem Schnellverschluss DN 60 fixiert und mit einem Silikonring DN 60 abgedichtet. Im Deckel befanden sich fünf Schlifföffnungen NS24. Durch ein Tauchrohr wurde das Kulturmedium mittels einer Schlauchpumpe (Masterflex 7523-35, Cole-Parmer und Pumpenkopf L/S-Standard, Cole-Parmer, Illinois, USA) mit einer Flussrate von 80 mL min^{-1} aus dem Reaktor abgezogen, durch den Bioaktivitätssensor gepumpt und wieder über das Tauchrohr in den Reaktor geleitet. Als Pumpenschläuche wurden Tygon-Schläuche mit einem Innendurchmesser von 3,17 mm (VWR, Darmstadt) verwendet, die weiteren Schlauchverbindungen wurden mit Tygon-Schläuchen ($\varnothing_I = 3,2$ mm, $\varnothing_I = 4,8$ mm, Fa. Roth, Karlsruhe) hergestellt. In einer weiteren Schlifföffnung wurde ein Tauchrohr mit Porzellanfritte zur Begasung eingesetzt, bei anaeroben Fermentationen wurden 20 L Stickstoff pro Stunde über ein Durchflussmesser (Fa. Krohne, Duisburg) in den Reaktor geleitet. Bei aeroben Fermentationen erfolgte die Belüftung über einen Kompressor (Fa. KNF Neuberger, Freiburg) und einen Durchflussmesser (Fa. Krohne, Duisburg) mit 40 L h^{-1} . Der Reaktor wurde über ein Wasserbad mit Thermostat (U3, Fa. Julabo, Seelbach) temperiert. Die Durchmischung des Reaktorinhaltes erfolgte mit einem Magnetrührer (Variomag Elektronik Rührer, Fa. Roth, Karlsruhe). Proben konnten über ein T-Stück in den Schlauchleitungen aus dem Reaktor entnommen werden.

4.3.6 Versuche im Chemostaten

Für eine kontinuierliche Kultivierung im Chemostaten wurde der unter 4.3.5 beschriebene Aufbau erweitert. In eine der NS 24 Schlifföffnungen wurde ein weiteres Taurohr für das Feeding und den Abzug des Mediums eingesetzt. Das Feeding und der Abzug von Kulturbrühe erfolgten über eine Schlauchpumpe (Ismatec mp13 GJ-10, Wertheim) und einen Pumpenschlauch (Tygon, $\varnothing_I = 1,52$ mm, $\varnothing_A = 3,02$ mm, Fa. VWR, Darmstadt). Die Durch-

flussrate wurde je nach Verdünnungsstufe variiert. Bei Pulsexperimenten wurde nach Einstellen des Fließgleichgewichtes Glucose zugesetzt, dazu wurden unterschiedliche Volumina einer Glucoselösung mit 500 g L^{-1} in den Reaktor gegeben. Zwischen den einzelnen Probenaufgaben wurde wiederum das Einstellen des Fließgleichgewichtes abgewartet.

4.3.7 Modellkläranlagen

In dieser Arbeit wurden zwei Laborkläranlagen eingesetzt, die Anlage I stellt einen Eigenbau dar, während die Anlage II eine kommerziell erhältliche Laborkläranlage ist (KLD 4, Fa. Behr, Düsseldorf). Die Anlagen arbeiten jeweils nach DIN 38412-24 (1981) bzw. DIN 38412-26 (1995). Anlage I besteht aus einem aeroben Belebungsbecken und einem Nachklärbecken, die Anlage II besitzt zusätzlich eine vorgeschaltete anoxische Denitrifikationsstufe sowie eine Sauerstoffregelung.

4.3.7.1 Laborkläranlage I

In der Abbildung 4-2 ist die Modellkläranlage I schematisch dargestellt.

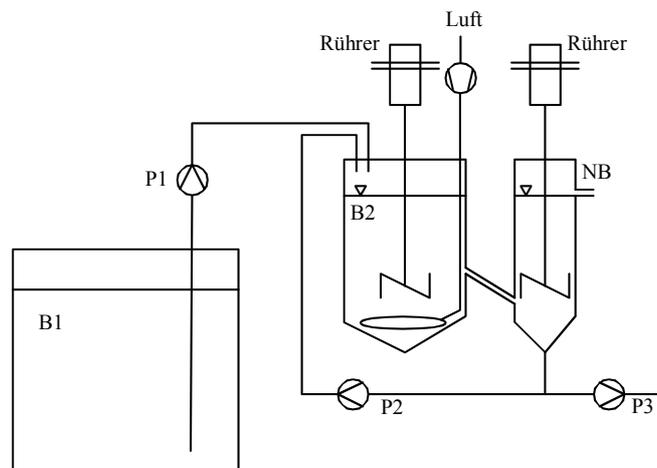


Abbildung 4-2: Schematische Darstellung der Modellkläranlage (B 1 = Abwasservorratsgefäß 30 L, B 2 = Belebungsbecken, NB = Nachklärbecken, P = Schlauchpumpen)

In dem Vorratsgefäß B 1, welches auf ca. $6 \text{ }^\circ\text{C}$ temperiert wurde, befand sich das synthetische Abwasser, das mit der Pumpe P 1 (Modell 131900, Fa. Desaga, Wiesloch) in das Belebungsbecken B 2 (Fa. Schott, Mainz) gefördert wurde. Die Belüftung des Belebungsbeckens erfolgte über einen perforierten Schlauch mit Druckluft, der Volumenstrom wurde über ein Rotameter (Porter Instruments, Hatfield, USA) eingestellt. Das Medium wurde mit einem Propellerrührwerk (RZR 1, Fa. Heidolph, Schwabach) und einem Intermig-Rührer durchmischt. In dem Belebungsbecken wurden der pH-Wert und die Konzentration an Sauerstoff gemessen (WTW pH 522, Fa. WTW, Weilheim, mit Elektrode U 455, Fa. Ingold, Steinbach

und WTW Oxi 530 mit Elektrode TriOxmatic EO 200, Fa. WTW, Weilheim), Bohrungen im Deckel des Belebungsbeckens ermöglichten die Befestigung der Elektroden. Optional konnte die Anlage mit einer pH-Regelung ausgestattet werden (pH-Meter pH 219 R, Fa. WTW, Weilheim, mit Elektrode U 455, Fa. Ingold, Steinbach und Pumpen zur Säure/Lauge-Dosage, Fa. Ismatec, Wertheim). Als Schläuche wurden Pharmed-Schläuche ($\varnothing_I = 6,4$ mm, $\varnothing_A = 9,6$ mm, Fa. Roth Karlsruhe) verwendet.

Um ein Absetzen des Belebtschlammes in der Verbindung zwischen Belebungs- und Nachklärbecken zu verhindern, wurde in diesem Verbindungsstück durch einen Schlauch Luft im Gegenstrom eingeblasen. Im Nachklärbecken (Fa. Fischer, Frankfurt am Main) nach DIN 38412-26 (1995) wurde der Belebtschlamm vom Ablauf durch Sedimentation abgetrennt und in dieser eingedickten Form als Rücklaufschlamm über die Pumpe P3 (101 U Watson Marlow, Falmouth, Großbritannien) in das Belebungsbecken zurückgeführt. Um ein Verstopfen durch Ablagerungen im Nachklärbecken zu verhindern, wurde ein Rührer (RZR 1, Fa. Heidolph, Schwabach) eingesetzt. Der Rührer wurde über eine Zeitschaltuhr gesteuert und jede Stunde für 10 s betrieben. Der Abzug des anfallenden Überschussschlammes erfolgte nach Bedarf mit der Pumpe P 3 (Modell 131900, Fa. Desaga, Wiesloch). Der Überlauf des Nachklärbeckens wurde in die Kanalisation abgeleitet. Die Tabelle 4-3 zeigt die Betriebsdaten der Modellkläranlage.

Zum Animpfen der Kläranlage wurde 1 L Belebtschlamm aus einer kommunalen Abwasserreinigungsanlage in das Belebungsbecken gegeben und mit synthetischem Abwasser (nach 4.2.11) auf das Gesamtvolumen der Anlage aufgefüllt. Der Anschluss des Bioaktivitätssensors erfolgte im Bypass an das Belebungsbecken. Es wurde ein Volumenstrom von 250 mL min^{-1} durch die Zelle gepumpt. Die Messdatenerfassung erfolgte analog zu 4.3.4.1.

4.3.7.2 Laborkläranlage II

Das Verfahrensfließbild der Modellkläranlage II sowie eine Fotografie der Anlage sind in der Abbildung 4-3 dargestellt. Die Pumpen, Rührer und der Kompressor sind Bestandteile der Anlage KLD 4 (Fa. Behr, Düsseldorf).

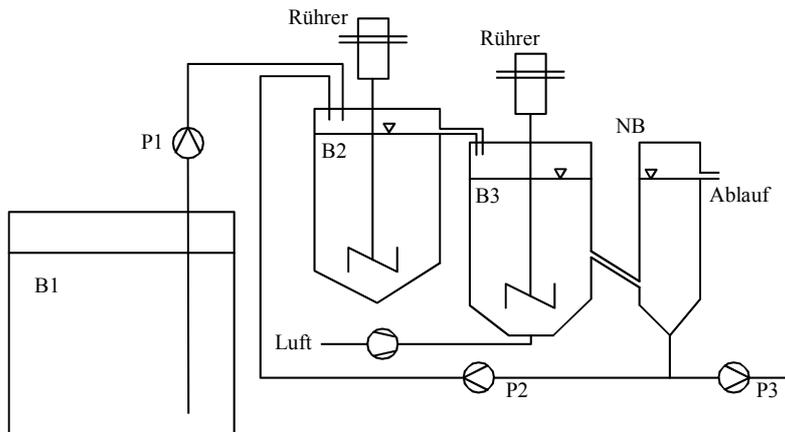


Abbildung 4-3: Schematische Darstellung und Fotografie der Modellkläranlage II mit vorgeschalteter Denitrifikation (B 1 = Abwasservorratsgefäß, gekühlt, B 2 = anoxisches Denitrifikationsbecken, B 3 = Belebungsbecken, NB = Nachklärbecken, P = Schlauchpumpen)

Das synthetische Abwasser wurde mit der Pumpe P 1 aus dem gekühlten Vorratsgefäß B 1 in das anoxische Becken B 2 gepumpt. Die Durchmischung des Mediums in dem Becken B 2 erfolgte mit einem Magnetrührer, die Drehzahl wurde so gewählt, dass keine Sedimentation der Belebtschlammflocken stattfand. Das Abwasser-Belebtschlamm-Gemisch gelangte über einen Überlauf in das Belebungsbecken B 3. In dieser aeroben Stufe wurde der Zuluftstrom geregelt, um einen konstanten Sauerstoffgehalt in der Anlage zu gewährleisten (Sauerstoffeintragsregelung GWS 200, Fa. Behr, Düsseldorf mit Sauerstoffmessgerät Oxi 340 und Elektrode CelloX 325, Fa. WTW, Weilheim). In dem Nachklärbecken NB wurde der Belebtschlamm von dem geklärten Abwasser durch Sedimentation abgetrennt und in dieser eingedickten Form als Rücklaufschlamm über die Pumpe P2 in das Belebungsbecken zurückgeführt. Bei dem gewählten verfahrenstechnischen Ansatz wurde die Rezirkulation des in der Nitrifikationsstufe gebildeten Nitrates mit dem Schlammrücklauf über die Pumpe P2 gekoppelt; in der Tabelle 4-3 beschreiben damit die Parameter F_{RS} und F_R denselben Strom in der Anlage. Um ein Verstopfen durch Ablagerungen im Nachklärbecken zu verhindern, wurden mittels eines Kompressors und einer Zeitschaltuhr periodisch Luftblasen in das Nachklärbecken geleitet, um Ablagerungen zu resuspendieren. Der Abzug des anfallenden Überschussschlammes erfolgte nach Bedarf mit der Pumpe P3. Der Überlauf des Nachklärbeckens wurde in die Kanalisation abgeleitet. In der Tabelle 4-3 sind die Betriebsdaten der Modellkläranlagen zusammengestellt.

Zum Animpfen wurde die Modellkläranlage mit 1 L des Belebtschlammes aus einer kommunalen Kläranlage befüllt und bis zum Gesamtvolumen der Anlage mit synthetischem Abwasser

aufgefüllt. Der Bioaktivitätssensor wurde entsprechend dem Versuchsziel entweder im Bypass der aeroben oder der anoxischen Stufe eingesetzt, der Volumenstrom durch den Bioaktivitätssensor betrug 250 mL min^{-1} . Die Messdatenerfassung erfolgte analog zu 4.3.4.1.

Tabelle 4-3: Betriebsdaten der Laborkläranlagen

Bezeichnung	Symbol	Wert		Einheit
		KA I	KA II	
Füllvolumen Belebungsbecken	V_{BB}	6,2	4,8	L
Füllvolumen Nachklärbecken	V_{NB}	2,4	2,3	L
Füllvolumen Denitrifikationsbecken	V_{DB}	-	4,25	L
Abwasserzulauf	F_{AW}	10	10	L d^{-1}
Drehzahl Rührer im Belebungsbecken	n_{BB}	150	150	min^{-1}
Drehzahl Rührer im Denitrifikationsbecken	n_{DB}	-	50	min^{-1}
Rücklaufschlammstrom	F_{RS}	10	20	L d^{-1}
Schlammrücklaufverhältnis	RV	1	2	-
Rezirkulationsstrom	F_R	-	20	L d^{-1}
Rezirkulationsverhältnis	R	-	2	-
Überschussschlammstrom	$F_{ÜS}$	-	-	L d^{-1}
Zuluft im Belebungsbecken	F_{luft}	65	variabel	L h^{-1}

Die Messtechnik der Laboranlage II stammte von der Fa. Sensortechnik Meinsberg, Ziegra-Knobelsdorf. Die folgende Aufstellung zeigt die verwendeten Elektroden und Messverstärker:

pH-Wert:	pH- Messverstärker MV 10, pH-Elektrode EGA 501 S
Redoxpotential:	Redox-Messverstärker MV 15, Redox-Elektrode EMC 30
Sauerstoffkonzentration:	Sauerstoff-Messverstärker MV 30, Sauerstoffelektrode MF 31
Temperatur:	Temperatur-Messverstärker MV 50, PT 1000

Die Spannungsversorgung erfolgte über Netzteile N 20. Die Datensicherung wurde mit einer A/D-Karte (DATAshuttle, Fa. Strawberry Tree, Sunnyval, USA) mit der entsprechenden Software und einem PC durchgeführt.

4.3.8 Entwicklung eines Prototypen

Für den Praxiseinsatz des BAS auf kommunalen und industriellen Abwasserreinigungsanlagen war eine Modifikation des Laboraufbaus notwendig, um das System an die

Gegebenheiten auf den Anlagen anzupassen. Diese Modifikationen betrafen einerseits die Auswahl der verwendeten Komponenten hinsichtlich Dauerbetriebstauglichkeit und andererseits die Automatisierung des Messsystems. Die Entwicklung eines entsprechenden Prototyps wurde in Kooperation mit der Firma Dr. Lange, Düsseldorf durchgeführt. Die Abbildung 4-4 zeigt die Funktionsweise des Prototypen anhand eines Blockschaltbildes und eine Fotografie des Systems.

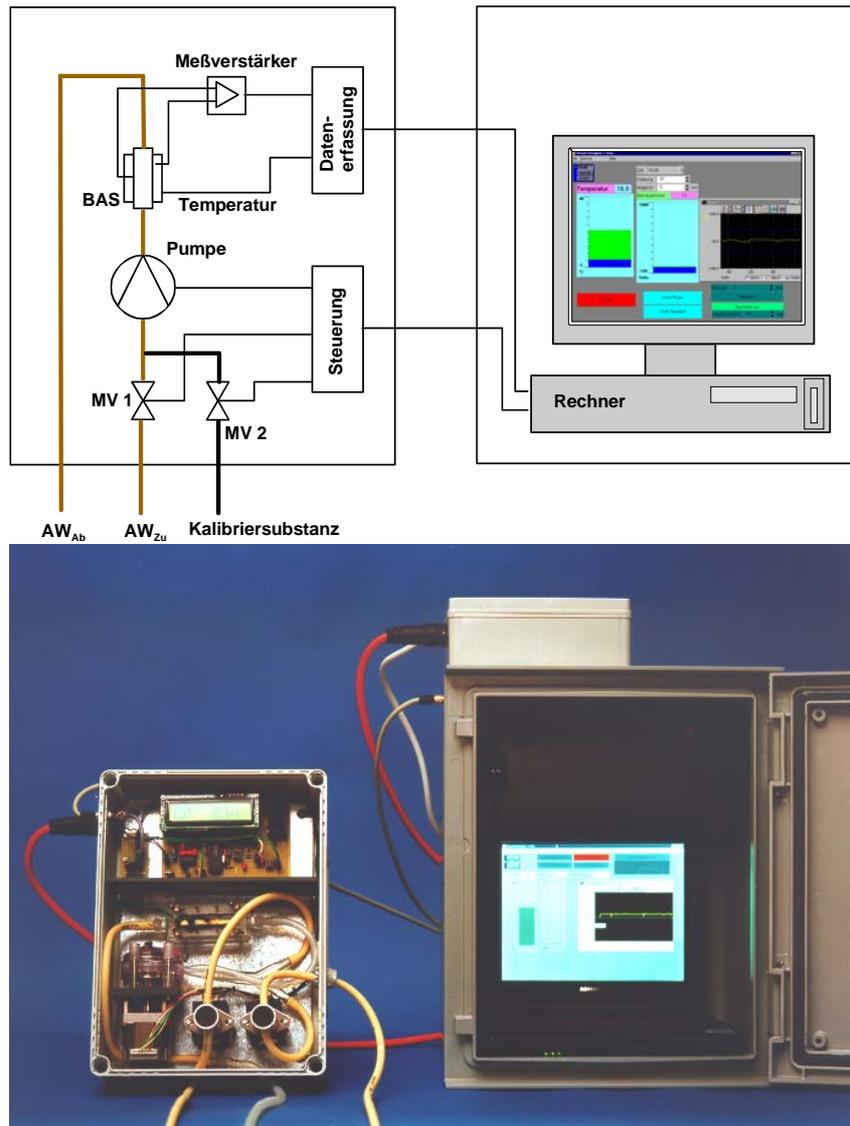


Abbildung 4-4: Blockschaltbild und Fotografie des Prototypen

Der Prototyp besteht aus zwei Komponenten, einer Mess- und einer Steuerungseinheit. Diese Aufteilung wurde vor dem Hintergrund einer möglichst großen Flexibilität bei der Installation auf Abwasserreinigungsanlagen durchgeführt. Für die Einbindung des Messsignals in Mess- und Regelungskonzepte sind geringe Totzeiten notwendig und, da lange Transportwege der Probe große Totzeiten nach sich ziehen, sollte die Aufstellung des Prototypen möglichst nah

am Messort erfolgen. Durch die Trennung in zwei Komponenten kann die Steuereinheit an einem für das Bedienpersonal günstigen Ort und die Messeinheit direkt an der biologischen Klärstufe installiert werden. Die Messeinheit muss nur bei notwendigen Wartungen zugänglich sein. Die Integration beider Komponenten in wetterfeste Gehäuse gemäß der Schutzart IP 65 (International Protection) ermöglichte eine Vor-Ort-Aufstellung auch im Freien. Die Schutzart IP 65 bietet einen staubdichten Fremdkörperschutz sowie einen Wasserschutz gegen Strahlwasser aus allen Richtungen und ist damit für einen Aufbau auf Abwasserreinigungsanlagen geeignet.

Kernstück des Prototypen bildet der Bioaktivitätssensor, dieser ist im unteren Teil der Messeinheit zusammen mit den weiteren flüssigkeitsführenden Komponenten angeordnet. Diese Trennung in einen Trocken- und Nassteil innerhalb der Messeinheit vermeidet bei undichten Schlauchleitungen elektrische Kurzschlüsse. Neben dem BAS beinhaltet der Nassteil zwei Ventile (Fa. Sirai, Steinhöring) und eine Pumpe (Fa. Watson Marlow, Falmouth, Großbritannien). Die Ventile ermöglichen das Umschalten zwischen zwei Probenströmen oder auf eine Kalibrierlösung. Die Pumpe fördert das Messmedium mit einer festen Drehzahl, der Volumenfluss beträgt bei einem Schlauch mit Innendurchmesser von 6,4 mm 250 mL min^{-1} . Der Analysator ist so ausgelegt, dass auf eine Feinfiltration verzichtet werden kann; im Zulauf wurde je nach Einsatzort ein Grobfilter mit einer Maschenweite von 8 mm eingesetzt. Neben dem BAS-Signal wird auch die Temperatur an der Anode des Sensors gemessen. Im oberen Teil der Messeinheit sind die elektronischen Schaltungen zur Erfassung der Messsignale und Steuerung der Komponenten des Prototypen angeordnet.

Die Bestandteile der Steuereinheit sind ein Laptop (Fa. Toshiba, Neuss) und eine A/D-Karte (DASport, Fa. Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Echterdingen). Das Datenerfassungssystem wird über eine parallele Schnittstelle mit dem Laptop verbunden. Der Laptop dient zur Visualisierung und Speicherung der Daten sowie zur Steuerung der Pumpe und Ventile. Die Steuerung des Prototypen sowie die Datenverarbeitung erfolgt mittels eines Visual-Designer-Programms (Fa. Intelligent Instrumentation, Leinfelden-Echterdingen). Visual Designer gehört zu den Applikationsgeneratoren und erlaubt eine grafische Programmierung sowie eine Konfiguration mit Hilfe von Funktionsblöcken in Datenflussdiagrammen. Die Abbildung 4-5 zeigt den Aufbau und die Oberfläche des Programms.

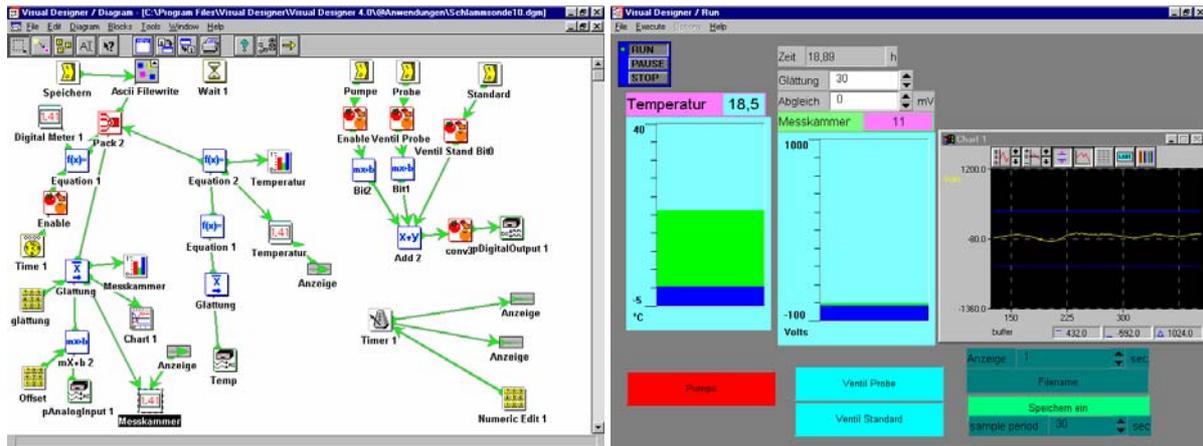


Abbildung 4-5: Aufbau und Programmoberfläche des Visual-Designer-Programms

Innerhalb der Programmoberfläche werden die aktuelle Uhrzeit, die Messwerte für die Temperatur und das BAS-Signal als Digitalanzeigen und Balkendiagramm dargestellt. Das BAS-Signal wird weiterhin in einem y-t-Diagramm visualisiert. Das Diagramm wird entsprechend dem in dem Feld „Anzeige“ eingegebenen Wert aktualisiert. Unter „Filename“ wird der Speicherort der entsprechenden Datei festgelegt, die Speicherung der Daten mit dem Schalter „Speichern ein/Speichern aus“ gestartet bzw. beendet. Das Speicherintervall wird unter „Sample period“ festgelegt. Über die entsprechenden An/Aus-Schaltflächen lassen sich die Pumpe und Ventile steuern. Das BAS-Signal kann über die Felder „Glättung“ und „Abgleich“ bearbeitet werden.

Die Übertragung der Daten zwischen der Mess- und Steuerungseinheit wird mittels eines abgeschirmten Messkabels mit verschraubbaren Mini-DIN-Steckern durchgeführt. Die Stromversorgung des Prototypen erfolgt über die Steuerungseinheit, diese versorgt über entsprechende Transformatoren und Leitungen (CA-Serien-Stecker) die Messeinheit mit den notwendigen Spannungen von 5 V und 12 V.

Die Konstruktion der Prototypen ist so ausgelegt, dass das Gerät entweder als Stand-alone-Messgerät eingesetzt oder in ein Prozessleitsystem eingebunden werden kann.

5 Ergebnisse

5.1 Untersuchungen in Abwesenheit von mikrobieller Aktivität

Den Untersuchungen zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität wurden Untersuchungen in zellfreien Systemen bzw. in Abwesenheit aktiver Mikroorganismen vorangestellt. Ziel war die grundlegende Deutung des Einflusses von Substraten, Stoffwechselprodukten und Chemikalien auf das Signal des BAS. Mit diesen Untersuchungen sollte auch getestet werden, ob das Auftreten des Signals direkt durch die Elimination des Substrates oder durch die Bildung von Stoffwechselprodukten verursacht wird. Unter 3.1.3 wurde ausgeführt, dass einige Substanzen in Brennstoffzellen elektrochemisch aktiv sind; weiter wurde dargestellt, welche Substanzen, ausgehend von ihrem Normalpotential, theoretisch an der Anode des Bioaktivitätssensors umgesetzt werden können. Auf Basis dieser theoretischen Betrachtungen erfolgte die Auswahl der Testsubstanzen für die zellfreien Untersuchungen.

Daneben sollte der Einfluss der Durchflussgeschwindigkeit durch den BAS auf die Signale untersucht werden. Nach der Massentransportgleichung (Formel 3-3) ist ein Zusammenhang zwischen dem BAS-Signal bzw. dem gemessenen Strom und der Dicke der Diffusionsgrenzschicht zu erwarten. Die Dicke der Diffusionsgrenzschicht in dem BAS wird maßgeblich von der Strömungsgeschwindigkeit durch den Sensor beeinflusst. In einem ersten Punkt wurde eine elektronische Charakterisierung des BAS durchgeführt, Ziel war die Beschreibung des BAS hinsichtlich des linearen Messbereichs, des Rauschverhaltens und der Nachweisgrenze.

5.1.1 Elektronische Charakterisierung des BAS

Für diese Untersuchungen wurde an den BAS ein Stromgeber angeschlossen, Stromstärken von 1 nA – 20 mA angelegt und die resultierenden BAS-Signale aufgezeichnet. Der weitere Messaufbau entspricht dem in Kapitel 4.3.4.1, die Stromquelle dient damit als Ersatz für die Stromgenerierung durch die Mikroorganismen an den Elektroden des BAS (siehe Abbildung 3-1). Die Abbildung 5-1 zeigt das BAS-Signal in Abhängigkeit vom angelegten Strom.

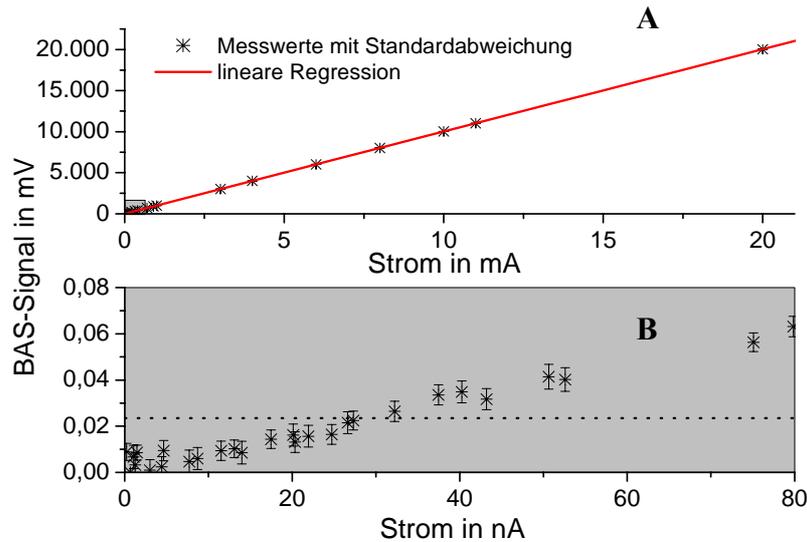


Abbildung 5-1: Untersuchungen zur Charakterisierung des BAS (A – gesamter Messbereich, B - Messbereich zur Festlegung der Nachweisgrenze, weitere Erläuterungen im Text)

Die Abbildung 5-1 A zeigt, dass das Signal bis zu einem angelegten Strom von 20 mA und einem daraus resultierenden BAS-Signal von 20 V einen linearen Verlauf aufweist. Die Gleichung der Regressionsgeraden lautet:

$$\text{BAS-Signal [V]} = 1002 \left[\frac{\text{V}}{\text{A}} \right] \cdot \text{Strom [A]} - 0,76 \cdot 10^{-6} \text{ [A]}$$

Formel 5-1: Geradengleichung des linearen Bereichs des BAS (das Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2 = 1$ und die Standardabweichung der Approximation $SD = 3 \cdot 10^{-4}$)

Die Formel 5-1 entspricht wie erwartet dem OHM'schen Gesetz und die Steigung dem im Messaufbau integrierten Widerstand (siehe 4.3.4.1).

In dem Teil B der Abbildung ist der Messbereich zur Festlegung der Nachweisgrenze dargestellt. Diese Ausschnittsvergrößerung zeigt, dass sich das BAS-Signal bis zu einem Strom von 14 nA nicht signifikant ändert. Das BAS-Signal betrug in diesem Bereich maximal 10 μV und die mittlere Standardabweichung der Messungen betrug 4,5 μV . Die Nachweisgrenze errechnet zu 23,5 μV , dabei wird die Nachweisgrenze als Summe aus dem Mittelwert des Signalrauschens und der dreifachen Standardabweichung definiert. Diese Nachweisgrenze ist in der Abbildung als gepunktete Linie dargestellt. Aus diesen Aussagen lässt sich ein Arbeitsbereich für den Sensor von 23,5 μV bis 20 V festlegen.

Für den Prototypen (4.3.8) ergeben sich nach einem analogen Verfahren eine Nachweisgrenze von 17,2 μV und ein linearer Messbereich bis 10 mV.

5.1.2 Wirkung verschiedener Chemikalien auf das Messsignal

Die Untersuchungen wurden in einem zellfreien System durchgeführt. In einen 250 mL Reaktor mit Sörensen-Puffer (nach 4.2.15) wurden die Testsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen dosiert und die resultierenden Änderungen des BAS-Signals aufgezeichnet. An Substraten kamen Glucose, Ammonium, Nitrat, Nitrit sowie Methanol zum Einsatz und an Stoffwechselprodukten wurden Ameisensäure, Acetat, Propionat, Lactat, Succinat und Kohlendioxid getestet. Die Auswirkungen von Chemikalien wurden exemplarisch mit den Substanzen Huminsäure, Wasserstoffperoxid, Cystein, Gluthation, Durochinon, Kalium-Hexacyanoferrat, Kaliumborhydrid und Ascorbinsäure untersucht. Die Abbildung 5-2 zeigt beispielhaft die Wirkung von Ameisensäure, Succinat und Wasserstoffperoxid auf das Signal des BAS.

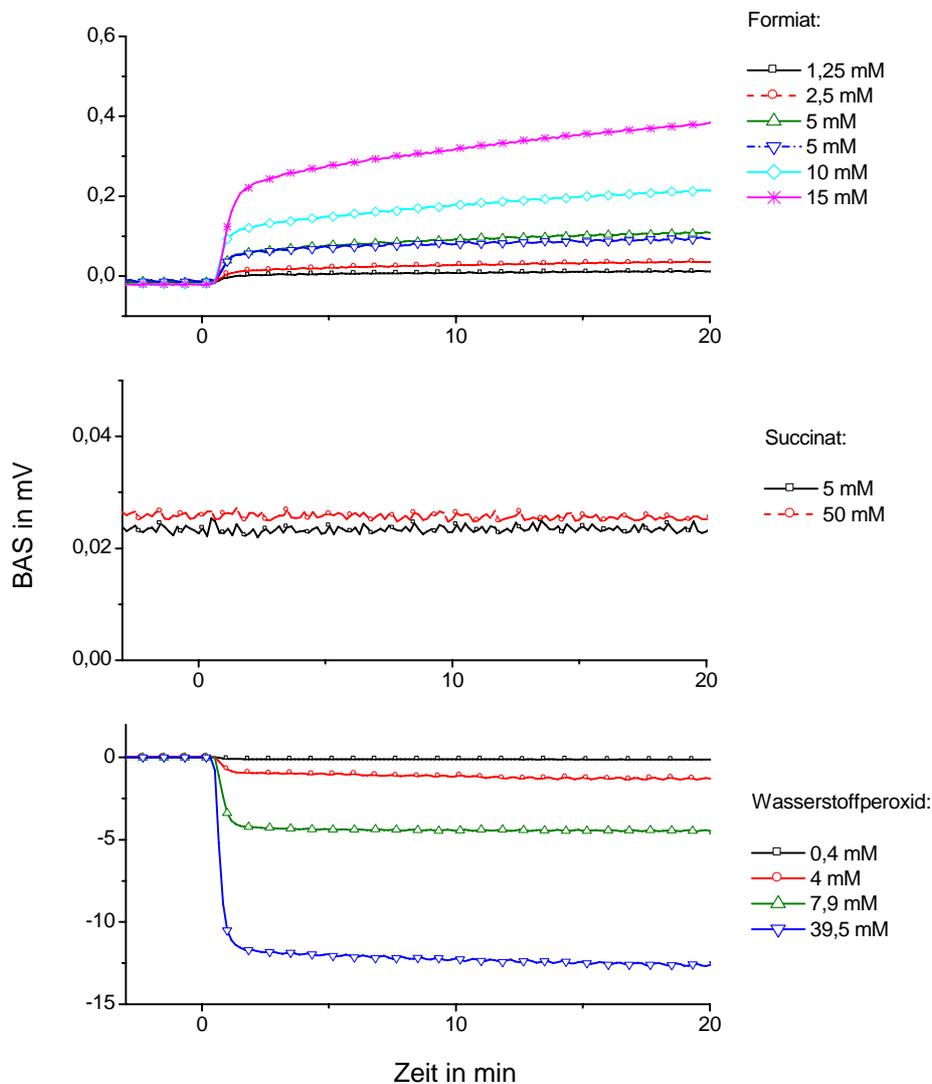


Abbildung 5-2: Wirkung von Ameisensäure, Succinat und Wasserstoffperoxid in einem zellfreien System auf das Signal des BAS (bei $t = 0$ h wurde jeweils die Substanz zudosiert)

Nach der Dosierung der Ameisensäure bei $t = 0$ h kam es jeweils zu einem sofortigen Anstieg des BAS-Signals und einer asymptotischen Annäherung an einen maximalen Wert. Es zeigte sich, dass dieses Maximum linear von der Konzentration an Ameisensäure abhängig war, der Anstieg betrug $0,03 \text{ mV mM}^{-1}$. Die Umsetzung von Ameisensäure an Edelmetallen (Platin oder Palladium) tritt bei Raumtemperatur unter Dehydrierung auf, hierbei wird Kohlendioxid gebildet (BEYER 1984). Die Dosierung von Succinat zu dem Puffer zeigte keine Auswirkung auf das Signal des BAS. Dagegen bewirkte die Dosierung von Wasserstoffperoxid einen sehr starken, konzentrationsabhängigen Signalabfall, das Signal fiel sehr schnell ab und erreichte nach ca. 2 min jeweils einen konstanten Wert. Der Signalabfall wies eine Konzentrationsabhängigkeit von $-0,34 \text{ V pro mM}^{-1}$ auf. Das Wasserstoffperoxid wirkt als Oxidationsmittel und entzieht dem System Elektronen, um durch die Aufnahme der Elektronen eine stabilere Elektronenkonfiguration anzunehmen. Die Tabelle 5-1 zeigt die Zusammenfassung der durchgeführten Versuche zur Wirkung von Chemikalien auf das Messsignal.

Tabelle 5-1: Zusammenfassung der Wirkung von Chemikalien auf das Signal des BAS

Substanz	Test-Konzentration	qualitative Beschreibung	Bemerkung
Glucose	0,6 – 5,6 mM	keine Beeinflussung	Substrat
Ammonium als Ammoniumchlorid	0,2 – 83 mM	keine Beeinflussung	Substrat
Nitrat als Natriumnitrat	25 – 250 mM	keine Beeinflussung	Substrat
Nitrit als Natriumnitrit	5 – 50 mM	keine Beeinflussung	Substrat
Methanol	1 – 1000 mM	geringe Beeinflussung	Substrat
Ameisensäure (als Natriumformiat)	1,25 – 15 mM	starker, konzentrationsabhängiger Signalanstieg ($0,03 \text{ mV mM}^{-1}$)	Stoffwechselprodukt
Acetat (als Natriumacetat)	5 – 50 mM	sehr geringer, kurzfristiger Signalabfall	Stoffwechselprodukt
Propionat (als Propionsäure)	5 – 100 mM	sehr geringer, kurzfristiger Signalabfall	Stoffwechselprodukt
Lactat (als Natriumlactat)	5 – 100 mM	sehr geringer, kurzfristiger Signalabfall	Stoffwechselprodukt
CO ₂	(*)	keine Beeinflussung	Stoffwechselprodukt

Succinat (als Bernsteinsäure)	5 – 50 mM	keine Beeinflussung	Stoffwechselprodukt
Huminsäure	0,8 – 200 mg/L	keine Beeinflussung	beteiligt am Elektronentransfer
Wasserstoffperoxid	0,4 – 39,5 mM	starker, konzentrationsabhängiger Signalabfall (-0,34 mV mM ⁻¹)	Oxidationsmittel
Cystein	8 µM – 4 mM	starker, konzentrationsabhängiger Signalanstieg (3,76 mV mM ⁻¹)	Aminosäure
Glutathion	0,6 – 34 mM	kurzfristiger, starker Signalanstieg, anschließend konzentrationsabhängiges, erhöhtes Signal (0,01 mV mM ⁻¹)	biologisches Redoxsystem
Kaliumhexacyanoferrat	4 µM – 4 mM	starker, konzentrationsabhängiger Signalanstieg (8,83 mV mM ⁻¹)	Mediator
Kaliumborhydrid	0,4 mM	sehr starker Signalanstieg	Reduktionsmittel
Ascorbinsäure	0,04 – 4 mM	Signalanstieg	Vitamin, Reduktionsmittel
Durochinon	4 µM	keine Beeinflussung	Mediator, strukturelle Ähnlichkeit mit Ubichinon

(*) Kohlendioxid wurde gasförmig mit einem Fluss von 6 L h⁻¹ eingeleitet

Aus der Gruppe Substrate zeigte lediglich das Methanol eine Wirkung an den Elektroden des BAS. Bei einer Konzentration von 1000 mM stieg das Signal um 0,052 mV an, bei einer Dosierung von 100 mM wurde keine Signaländerung registriert. Neben der oben beschriebenen Wirkung der Ameisensäure auf das BAS-Signal zeigten aus der Gruppe der Stoffwechselprodukte Acetat, Propionat und Lactat einen kurzfristigen Abfall des Signals, nach ca. 5 min war das BAS-Signal jedoch dem vor der Dosierung vergleichbar.

Von den eingesetzten Chemikalien bewirkten Reduktionsmittel wie Kaliumborhydrid, Ascorbinsäure, Cystein und Glutathion einen Anstieg des Signals am BAS, unterschiedlich war die Stabilität des Signalanstiegs bei diesen Substanzen. Die Dosierung von Ascorbinsäure und Kaliumborhydrid bewirkte lediglich eine kurzfristige Änderung des Signals, dagegen blieb das Signal nach der Dosierung von Cystein und Glutathion für längere Zeit auf einem erhöhten Niveau.

5.1.3 Auswirkungen der Strömungsgeschwindigkeit

Diese Untersuchungen wurden in Gegenwart von Belebtschlamm als Biomasse, aber in Abwesenheit eines Substrats durchgeführt. Dadurch sollten Änderungen der mikrobiellen Aktivität vermieden werden, dabei aber evtl. auftretende Matrixeffekte durch den Belebtschlamm berücksichtigt werden. Für diese Untersuchungen wurde das Belebungsbecken der Laborkläranlage I als Batch-Reaktor verwendet und 6 Liter Belebtschlamm aus der Kläranlage Frankfurt-Niederrad eingesetzt. Das messbare Sensorsignal war hier auf die Ausscheidung von reduzierten Stoffwechselintermediaten aus dem Erhaltungsstoffwechsel der Mikroorganismen zurückzuführen und hatte sich während des Versuches nicht signifikant geändert. Die Abbildung 5-3 zeigt den Verlauf des BAS-Signals in Abhängigkeit vom Durchfluß durch den Sensor. Durch die Erhöhung der Fließgeschwindigkeit wird der konvektive Stofftransport verbessert und damit die NERNST'sche Diffusionsgrenzschicht (Formel 3-3) verringert.

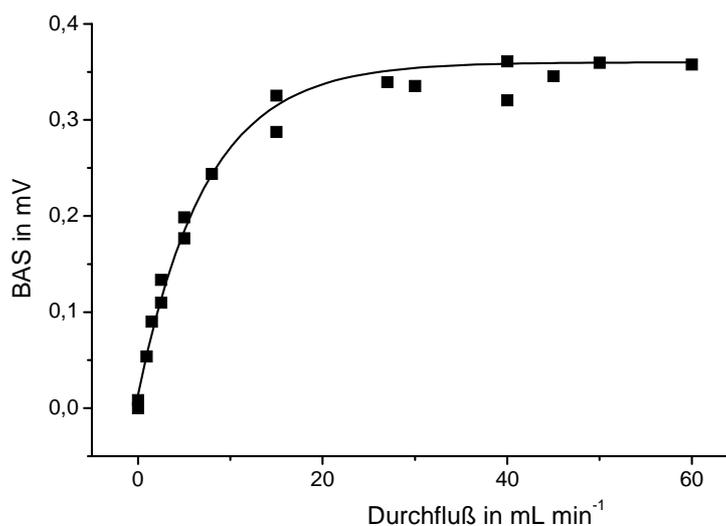


Abbildung 5-3: BAS-Signal als Funktion der Durchflussgeschwindigkeit

Es zeigte sich bei geringen Strömungsgeschwindigkeiten eine lineare Abhängigkeit des BAS-Signals von der Durchflussgeschwindigkeit, oberhalb von 30 mL min⁻¹ blieb das Sensorsignal

konstant. Gemäß der Massentransportgleichung (Formel 3-3) ist der Stromfluss in dem Sensor linear abhängig von der Dicke der NERNST'schen Diffusionsgrenzschicht. Diese Grenzschicht ist bei niedrigen Anströmgeschwindigkeiten relativ groß, es kommt zu einer Verarmung der Konzentration an elektroaktiven Substanzen an der Anodenoberfläche. In diesem Bereich werden die elektroaktiven Substanzen nur zu einem Teil umgesetzt. Bei einer Zunahme der Strömungsgeschwindigkeit wird die Grenzschicht dünner und es werden die gebildeten Substanzen quantitativ im BAS umgesetzt.

Für die weiteren Untersuchungen wurden Strömungsgeschwindigkeiten von über 30 mL min^{-1} eingesetzt, damit wurde sichergestellt, dass die Sensorsignale nicht von einer Limitierung der elektroaktiven Substanzen an der Elektrodenoberfläche beeinflusst werden. Die erhaltenen Ergebnisse wurden im kontinuierlichen Betrieb der Laborkläranlagen verifiziert, es zeigte sich wiederum, dass das Sensorsignal bei Strömungsgeschwindigkeiten über 30 mL min^{-1} unabhängig von dem Durchfluss ist.

5.2 Untersuchungen mit Modellorganismen

Da die Mikroorganismen in einer Belebtschlammflocke immer eine Mischkultur von verschiedenartigen Organismen darstellen, welche auf Änderungen der Kultivierung und der Betriebsbedingungen auf verschiedene Arten reagieren, wurden zunächst Untersuchungen mit Modellorganismen durchgeführt. Hier können die Versuchsbedingungen weitestgehend konstant gehalten werden. Damit erlauben die Versuche mit Modellorganismen wie *E. coli* Aussagen bezüglich

- einer Vergleichbarkeit mit etablierten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität,
- der Wirkung von Stoffwechselgiften auf den Stoffwechsel der Mikroorganismen und die entsprechenden Folgen auf das BAS-Signal sowie
- zur Charakterisierung des BAS-Signals.

Die so erzielten Aussagen sollten sich dann entsprechend auch auf die Messung der mikrobiellen Aktivität des Belebtschlammes übertragen lassen.

5.2.1 Reproduzierbarkeit von Versuchen

Um Versuche mit den Modellorganismen durchführen zu können, wurden in einer ersten Messreihe die Messmethode und Versuchsdurchführung hinsichtlich der Reproduzierbarkeit untersucht. Dazu wurden fünf Batch-Versuche mit *E. coli* DSM 498 im Mineralmedium nach 4.2.2 unter aeroben Bedingungen durchgeführt, das Ergebnis zeigt die Abbildung 5-4. In dieser Abbildung ist ebenfalls eine Sterilkontrolle dargestellt, hier wurde das Medium ohne Mikroorganismen eingesetzt.

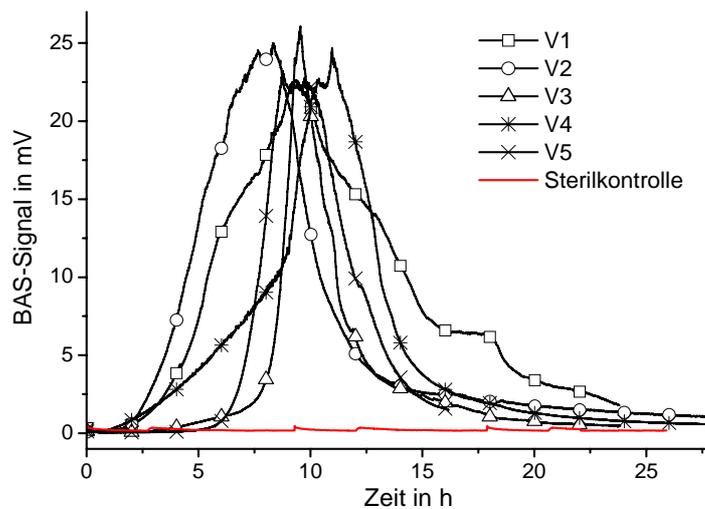


Abbildung 5-4: Reproduzierbarkeit der Versuche sowie Sterilkontrolle

Es zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Kurvenverläufen hinsichtlich der Anlaufphasen, der maximalen Signale und der Geschwindigkeiten des Signalabfalls. Für die Fläche der BAS-Peaks ergab sich ein Mittelwert von 0,14 Flächeneinheiten und eine Standardabweichung von $\pm 0,05$ Flächeneinheiten, für den Zeitpunkt des maximalen Signals ein Wert von $9,4 \pm 1,0$ h, für die Peakhalbwertsbreite $4,6 \pm 2,3$ h und für das maximale Signal des BAS ein Mittelwert von $24,3 \pm 1,4$ mV. Die Abweichungen liegen in dem Bereich der biologischen Schwankungen. Trotz dieser Abweichungen kann zwischen allen Versuchen eine ausreichende Übereinstimmung festgestellt und damit die Versuchsdurchführung als geeignet angesehen werden, um vergleichende Untersuchungen als 1-fach-Bestimmung durchzuführen. Während der Sterilkontrolle änderte sich das Signal des BAS nicht.

5.2.2 Vergleich des BAS-Signals mit etablierten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität und dem 3-Elektrodensystem

Mit diesen Untersuchungen sollte unter definierten Bedingungen eine Vergleichbarkeit zwischen etablierten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität und der elektrochemischen Bestimmung mit dem BAS aufgezeigt werden.

5.2.2.1 Vergleich mit etablierten Methoden zur Bestimmung des Zellzustandes

Um das Signal des BAS mit konventionellen Methoden zur Bestimmung der Zellzahl und des Zellzustandes vergleichen zu können, wurden aerobe Batch-Versuche mit *E. coli* im AM-Medium (4.2.2) durchgeführt. Als etablierte Verfahren zur Bestimmung eines Aktivitäts-

parameters kamen die Bestimmung der Biotrockenmasse als Parameter für die Zellmassenzunahme, die Messung des Substratabbaus mittels der Glucose-Messung sowie der Bestimmung der Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff (DOC), die Messung der Proteinkonzentration als Parameter für die Konzentration der Zellbestandteile sowie die Messung der Aktivität der Dehydrogenasen als Schlüsselenzym des Stoffwechsels zum Einsatz.

Die Abbildung 5-5 zeigt zwei Versuche: In der Abbildung A sind das BAS-Signal, die Biomassekonzentration und der Glucose-Abbau dargestellt; in der Abbildung 5-5 B sind das BAS-Signal, der Abbau an gelöstem organischem Kohlenstoff und die Geschwindigkeit der DOC-Elimination (Abbildung B) gezeigt.

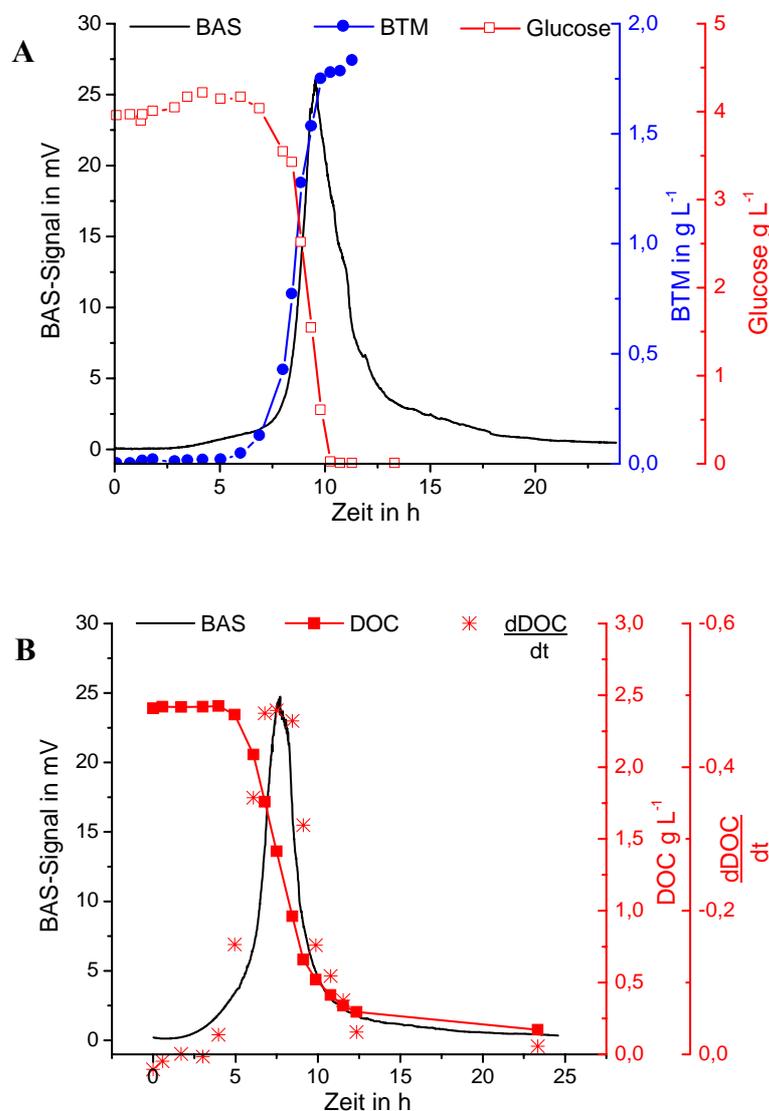


Abbildung 5-5: Zeitlicher Verlauf des BAS-Signals, des Glucose-Abbaus und der Biomassekonzentration (Versuch A) sowie des BAS-Signals, der DOC-Konzentration und des Substratabbaus pro Zeiteinheit (Versuch B) während aerober Batch-Versuche mit *E. coli*

In dem Versuch A begann nach ca. 5 h ein Abbau der Glucose und eine Zunahme der Biomassekonzentration, das Signal des BAS zeigte bereits nach 3 h einen leichten Anstieg. Während der exponentiellen Phase des Wachstums der *E. coli*-Kultur stieg das BAS-Signal schnell an, gleichzeitig kam es zu einer Abnahme der Glucose-Konzentration und einer Zunahme des Biomassengehaltes. Nach 9,6 h war die Glucose vollständig abgebaut, danach kam es nur noch zu einer geringen Zunahme der Biomassenkonzentration. Das BAS-Signal erreichte zu diesem Zeitpunkt sein Maximum und fiel im weiteren Verlauf ab.

Dieses Ergebnis zeigt einen Zusammenhang zwischen dem Signal des BAS und der Substrataufnahme sowie der Bildung von Biomasse. Allerdings wird der Abfall des Sensorsignals nach dem Verbrauch der Glucose nicht zufriedenstellend beschrieben, die gemessene Aktivität kann sowohl auf eine verlangsamte Umsetzung der bereits gebildeten elektroaktiven Substanzen und damit auf eine „scheinbare“ Aktivität als auch auf eine „echte“ Aktivität zurückzuführen sein. Daher wurde in dem Versuch B die Substratabnahme als DOC-Elimination bestimmt. Hier wird nicht nur das Ausgangssubstrat Glucose, sondern es werden die gesamten gelösten, organischen Kohlenstoffverbindungen gemessen. Nach 2 h begann das BAS-Signal langsam zu steigen, in dem Zeitraum von 6,0 bis 7,6 h stieg das Signal stark an und erreichte bei $t = 7,6$ h seinen maximalen Wert, anschließend fiel das BAS-Signal wieder ab. Die DOC-Elimination begann nach 4,0 h, zwischen 6,0 und 9,0 h war die DOC-Elimination angenähert linear. Im weiteren Verlauf war der Abbau an DOC verlangsamt, bei $t = 23,3$ h betrug die DOC-Konzentration $0,17 \text{ g L}^{-1}$. Diese Restkonzentration ist auf nicht abbaubare Substanzen in dem Medium zurückzuführen. Wie die Differenzierung der Kurve des gelösten organischen Kohlenstoffes zeigt, war das BAS-Signal während des Versuches proportional zum Substratabbau pro Zeiteinheit. Das Ergebnis der grafischen Darstellung des BAS-Signals gegen $\frac{d\text{DOC}}{dt}$ und einer nachfolgenden linearen Regression (mit dem Programm ORIGIN[®]) zeigt die Formel 5-2

$$\text{BAS}[\text{mV}] = -33,86 \left[\frac{\text{mV} \cdot \text{L} \cdot \text{h}}{\text{g}} \right] \frac{d(\text{DOC})}{dt} \left[\frac{\text{g}}{\text{L} \cdot \text{h}} \right] - 0,02 [\text{mV}]$$

Formel 5-2: Proportionalität zwischen dem BAS-Signal und dem Substratabbau (das Bestimmtheitsmaß beträgt $R^2 = 0,85$ und die Standardabweichung der Approximation $SD = 2,82$)

Es wird damit die Anforderung einer Proportionalität zwischen der gemessenen mikrobiellen Aktivität und dem Abbau des Substrates bzw. der Abwasserinhaltsstoffe erfüllt.

Die Abbildung 5-6 zeigt in zwei weiteren Versuchen das BAS-Signal und den Proteingehalt (Versuch A) sowie das BAS-Signal und die Dehydrogenaseaktivität (Versuch B).

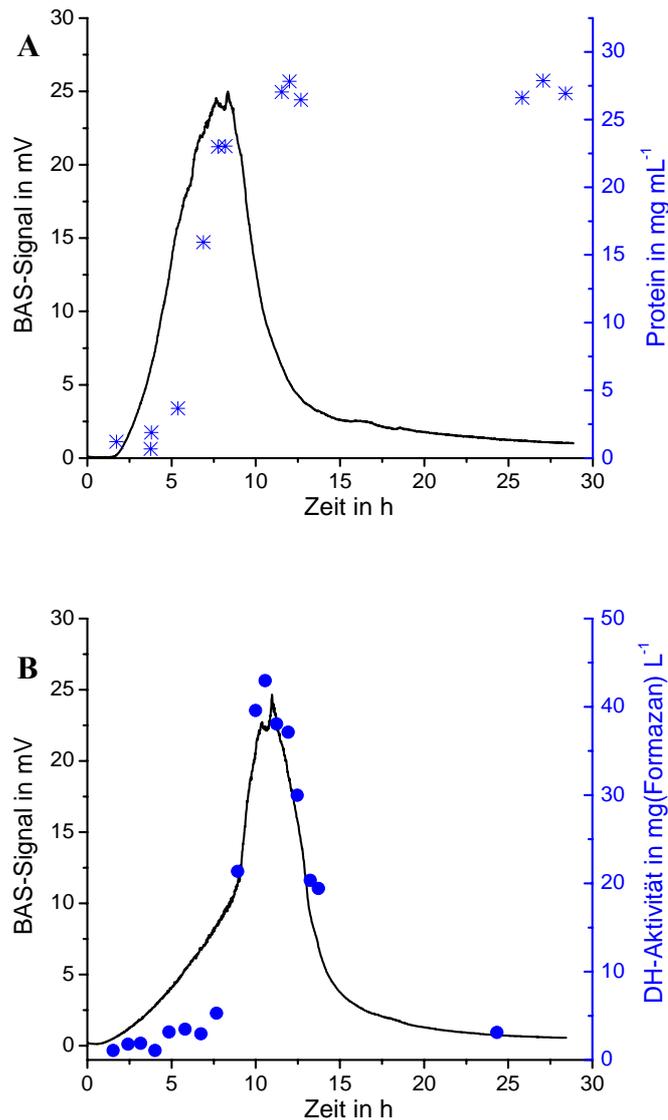


Abbildung 5-6: Zeitlicher Verlauf des BAS-Signals und des Proteingehaltes (A) sowie des BAS-Signals und der Dehydrogenaseaktivität (B) während aerober Batch-Versuche mit *E. coli*

In dem Versuch A begann das BAS-Signal nach 1,5 h zu steigen, erreichte nach 8,4 h seinen maximalen Wert und fiel anschließend wieder ab. Die Proteinkonzentration begann nach ca. 4 h zu steigen. In der exponentiellen Wachstumsphase stieg die Konzentration an Protein stark an und blieb mit Beginn der stationären Phase konstant.

Der Versuch B zeigte eine gute Übereinstimmung zwischen dem Signal des BAS und der Aktivität der Dehydrogenasen, lediglich zu Versuchsbeginn waren Abweichungen zwischen den Signalen zu erkennen. Das Maximum der Signale wurde jeweils nach ca. 11 h erreicht. Im Folgenden fielen die Signale wieder auf die Ausgangswerte ab. Zwischen dem Signal des BAS und der Dehydrogenaseaktivität ergibt sich ein linearer Zusammenhang (Formel 5-3).

$$\text{BAS [mV]} = 0,47 \left[\frac{\text{mV} \cdot \text{L}}{\text{mg}_{\text{Formazan}}} \right] \cdot \text{Dehydrogenaseaktivität} \left[\frac{\text{mg}_{\text{Formazan}}}{\text{L}} \right] + 1,81 \text{ [mV]}$$

Formel 5-3: Proportionalität zwischen dem BAS-Signal und der Aktivität der Dehydrogenasen ($R^2 = 0,92$ und $SD = 2,26$)

5.2.2.2 Vergleich zwischen dem 3-Elektrodensystem und dem BAS

Unter 3.1 wurde neben dem Messprinzip des Bioaktivitätssensors die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität mit dem potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystem dargestellt. Die folgenden Untersuchungen zeigen einen Vergleich zwischen dem BAS-Signal und dem Signal des 3-Elektrodensystems (nach 4.3.4.2). Die Abbildung 5-7 zeigt das Ergebnis eines aeroben Versuches, welcher mit *E. coli* im AM-Medium durchgeführt wurde.

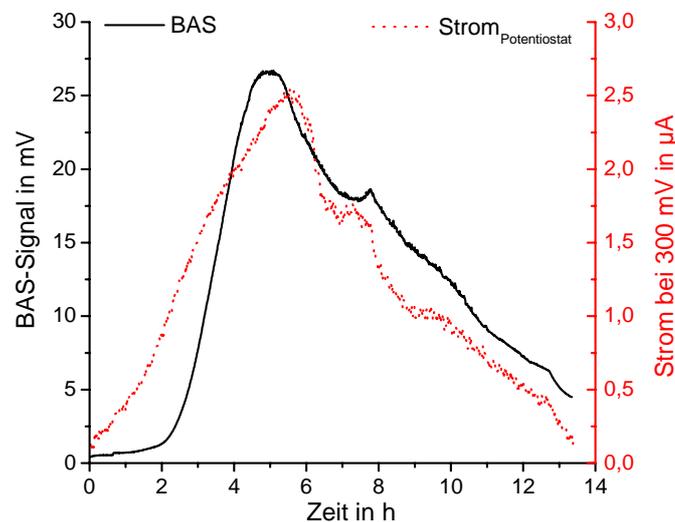


Abbildung 5-7: Messung der mikrobiellen Aktivität mit dem BAS und dem potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystem

Das Signal des BAS begann ca. 1 Stunde nach dem Animpfen zu steigen und erreichte nach 5 h das maximale Signal. Im weiteren Verlauf fiel das Signal des BAS wieder ab. Der Stromfluss bei 300 mV im 3-Elektrodensystem begann dagegen direkt nach dem Animpfen des Versuches zu steigen und erreichte 60 min nach dem BAS sein maximales Signal.

Die Kurvenverläufe zeigen eine vergleichbare Tendenz, lediglich zu Beginn des Versuches waren qualitative Unterschiede zwischen den elektrochemischen Methoden festzustellen. Ein bedeutender Unterschied ist allerdings in den Stromstärken festzustellen, das maximale Signal bei der Messung mit dem 3-Elektrodensystem betrug 2,5 µA. Wird dagegen das Signal des BAS über das OHM'sche Gesetz auf den Strom umgerechnet, ergibt sich ein maximales Signal von 26,5 µA. Die Anode des BAS hat eine Fläche von 5,3 cm², dies ergibt eine maxi-

male Stromdichte von $5 \mu\text{A cm}^{-2}$. Die Fläche der Arbeitselektrode des 3-Elektrodensystems beträgt $0,15 \text{ cm}^2$, entsprechend betrug die maximale Stromdichte $16,7 \mu\text{A cm}^{-2}$.

5.2.3 Stoffwechseltypen und Kultivierungsbedingungen

Durch die Kultivierung von verschiedenen Mikroorganismen mit unterschiedlichen Stoffwechselwegen und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen sollte untersucht werden, inwieweit die Signale des BAS von diesen Faktoren abhängen.

Die Abbildung 5-8 zeigt einen Vergleich zwischen der aeroben und anaeroben Batch-Kultivierung von *E. coli* TG 1 im Medium 382 (4.2.3). Parallel wurden jeweils die optische Dichte und die Substratkonzentration bestimmt.

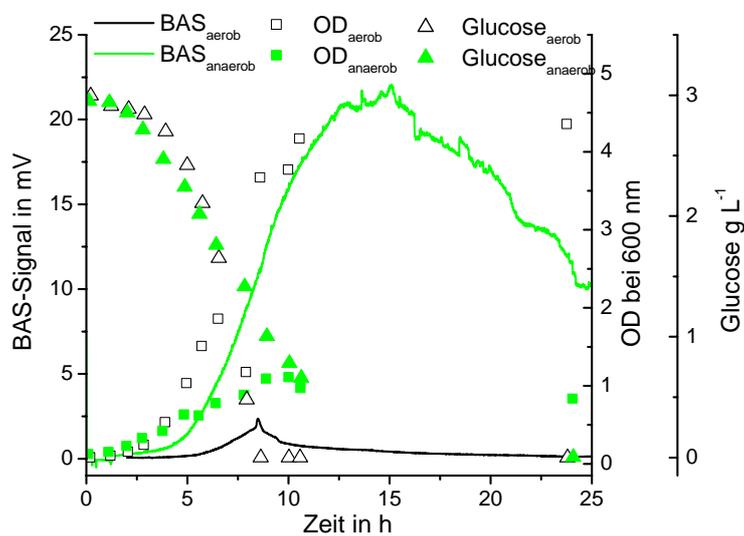


Abbildung 5-8: Vergleich zwischen einer aeroben und einer anaeroben Kultivierung von *E. coli*

Die Abbildung 5-8 zeigt, dass wie erwartet unter aeroben Bedingungen mehr Biomasse gebildet wurde als unter anaeroben Bedingungen. Während die aerobe Fermentation mit einer optischen Dichte von 4,3 endete, lag der Wert bei 1,0 bei der anaeroben Fermentation. Diese Beobachtung entspricht den Erwartungen, da aufgrund des geringeren Energiegewinns bei anaerobem Stoffwechsel weniger Biomasse gebildet werden kann. Die Ausgangskonzentration der Glucose lag bei beiden Versuchen bei 3 g L^{-1} , im Aeroben war der Substratabbau schneller als im Anaeroben.

Das Signal des Bioaktivitätssensors startete bei beiden Versuchen ungefähr bei 0,2 mV. Unter aeroben Bedingungen trat das maximale BAS-Signal bei $t = 8,5 \text{ h}$ auf, unter anaeroben Bedingungen wurde die maximale Aktivität nach 15 h gemessen. Das Maximum lag im Aeroben bei 2,3 mV und im Anaeroben bei 21,8 mV. Somit ergibt bei der anaeroben Fermentation ein fast zehnmal so hohes Signal wie bei der aeroben Prozessführung. Auch die maximalen Stei-

gungen der BAS-Signale unterscheiden sich stark voneinander, im Aeroben liegt die Steigung bei $0,84 \text{ mV h}^{-1}$ und im Anaeroben bei $3,51 \text{ mV h}^{-1}$. Der Signalabfall war ebenfalls bei der aeroben Fermentation schneller als bei der anaeroben Kultivierung. Bei den Versuchen fielen jeweils die Zeitpunkte des maximalen Signals mit dem Zeitpunkt, an dem die Glucose aufgebraucht war, zusammen.

Einen weiteren Vergleich zwischen einer aeroben und anaeroben Batch-Fermentation zeigt die Abbildung 5-9. Hier wurde *Saccharomyces cerevisiae* im Mineralmedium nach 4.2.5 eingesetzt.

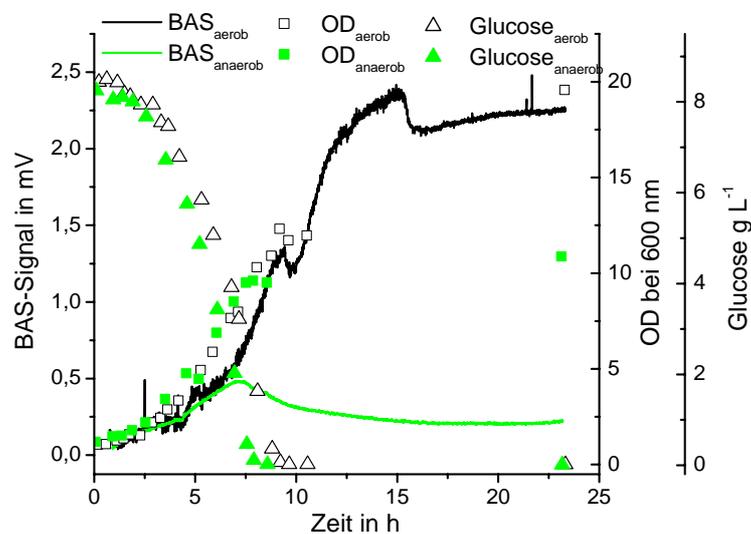


Abbildung 5-9: Vergleich zwischen einer aeroben und einer anaeroben Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Analyse der optischen Dichte zeigte zu Versuchsende im Aeroben eine doppelt so hohe Biomassekonzentration wie im Anaeroben. Unter aeroben Bedingungen stieg die optische Dichte von 1,0 auf 19,5 und unter anaeroben Bedingungen von 1,0 auf 10,8. Der Verbrauch der Glucose war bei den Prozessen vergleichbar, die Glucose wurde innerhalb von 8 h abgebaut. Das Bioaktivitätssignal im Aeroben stieg innerhalb von 15 h auf 2,2 mV, dagegen stieg das BAS-Signal im Anaeroben innerhalb von 8 h auf 0,5 mV. Die maximale Höhe des Bioaktivitätssignals war im Aeroben damit 4,4-mal höher als im Anaeroben. Bei diesen Prozessen fielen die maximalen Signale des BAS nicht mit dem Erreichen der Glucose-Konzentration von Null zusammen. Bei der aeroben Fermentation begann das BAS-Signal bereits zu fallen, während noch Glucose in dem Medium vorhanden war. Dagegen erreichte das BAS-Signal bei der anaeroben Kultivierung 6,7 h nach dem vollständigen Glucoseabbau das maximale Signal. Die Steigungen des BAS-Signals in der exponentiellen Wachstumsphase betragen im

Aeroben $0,14 \text{ mV h}^{-1}$ und im Anaeroben $0,03 \text{ mV h}^{-1}$. Der Abfall des BAS-Signals war während der aeroben Prozessführung sehr gering und erreichte im Versuchszeitraum nicht wieder das Ausgangssignal.

Durch den Einsatz von Mikroorganismen mit verschiedenen Stoffwechselwegen sollte versucht werden, Hinweise auf den Einfluss der Stoffwechselwege auf das Sensorsignal zu erhalten. Die Tabelle 5-2 zeigt die in dieser Untersuchung verwendeten Mikroorganismen mit einer kurzen Beschreibung der Stoffwechselbesonderheit sowie die entsprechenden Kultivierungsbedingungen.

Tabelle 5-2: In Batch-Versuchen eingesetzte Mikroorganismen mit unterschiedlichem Stoffwechsel

Organismus	Kurzbeschreibung des Stoffwechsels	DSM Nr.	Medium nach	Kultivierungsbedingungen
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	strikt respiratorischer Stoffwechsel, kein Gärungsstoffwechsel	6147	4.2.6	30 °C, aerob
<i>Pseudomonas</i> sp.	Denitrifikant, strikt respiratorischer Stoffwechsel, kein Gärungsstoffwechsel	50117	4.2.10	30 °C, anoxisch (20 L N ₂ h ⁻¹)
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Milchsäurebakterium, enthält keine Porphyrine und Cytochrome und führt keine Elektronentransportphosphorylierung durch	20314	4.2.7	30 °C, anaerob (20 L N ₂ h ⁻¹)
<i>Azotobacter vinelandii</i>	obligat aerober Stickstofffixierer, enthält sauerstoffempfindliche Nitrogenasen	85	4.2.8	30 °C, aerob
<i>Methylobacillus</i> sp.	obligat Methanol oxidierendes Bakterium	8629	4.2.9	30 °C, aerob

Die Abbildung 5-10 zeigt das BAS-Signal, die optische Dichte und den Verlauf der Glucosekonzentration während eines aeroben Versuchs von *Pseudomonas fluorescens* und während einer anoxischen Kultivierung von *Pseudomonas* sp. im Denitrifikanten-Medium.

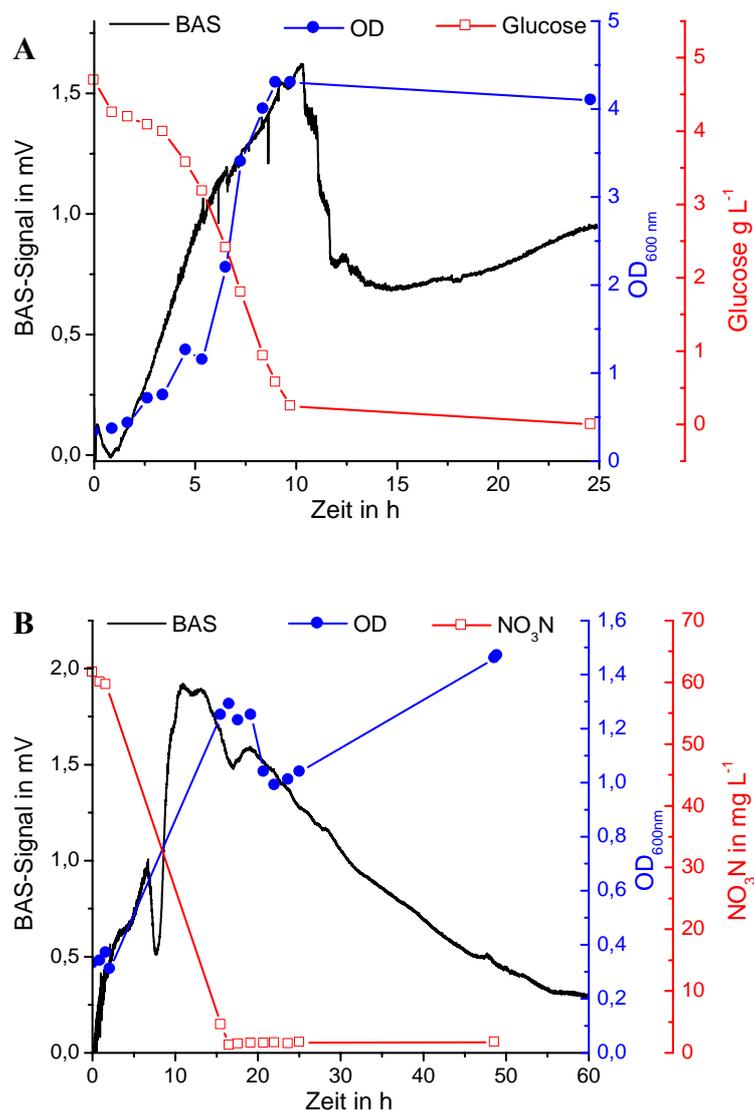


Abbildung 5-10: BAS-Signal, OD und Glucose bei der aeroben Fermentation von *Pseudomonas fluorescens* (Versuch A) und bei der anoxischen Fermentation von *Pseudomonas sp.* (Versuch B)

Zu Beginn der aeroben Fermentation von *Pseudomonas fluorescens* änderten sich die optische Dichte, der Substratgehalt und das BAS-Signal nicht in einem signifikanten Umfang. Nach 3,4 h betrug die Glucosekonzentration $4,0 \text{ g L}^{-1}$. Anschließend wurde die Glucose in der exponentiellen Phase schnell abgebaut und erreichte nach 10 h einen Wert von $0,2 \text{ g L}^{-1}$. Parallel zu diesem Substratabbau war ein Anstieg der Biomassekonzentration zu erkennen, die optische Dichte stieg von $\text{OD} = 0,7$ nach 2,7 h auf $\text{OD} = 4,3$ nach 9 h an. Das BAS-Signal stieg während der exponentiellen Phase des Wachstums stark an und erreichte nach 10,2 h den maximalen Wert von $1,62 \text{ mV}$. Im weiteren Verlauf sank das BAS-Signal nicht wieder auf das Ausgangssignal, nach 15 h betrug das Signal $0,70 \text{ mV}$.

Bei der anoxischen Fermentation von *Pseudomonas sp.* begann das Wachstum direkt nach dem Animpfen, bei $t = 0$ h betrug die Konzentration an Nitrat-Stickstoff 62 mg L^{-1} und die optische Dichte 0,33. Nach 16,6 h war das Nitrat vollständig abgebaut und die OD auf 1,2 gestiegen. Den Wachstumsphasen entsprechend begann das Signal des BAS direkt nach dem Animpfen zu steigen und erreichte nach 10,7 h den maximalen Wert von 1,9 mV. Auf diesem Niveau blieb das Signal für 2,6 h und begann nach 13,3 h wieder zu fallen.

In der Abbildung 5-11 sind die Ergebnisse der aeroben Fermentation von *Azotobacter vinelandii* und *Methylobacillus sp.* dargestellt.

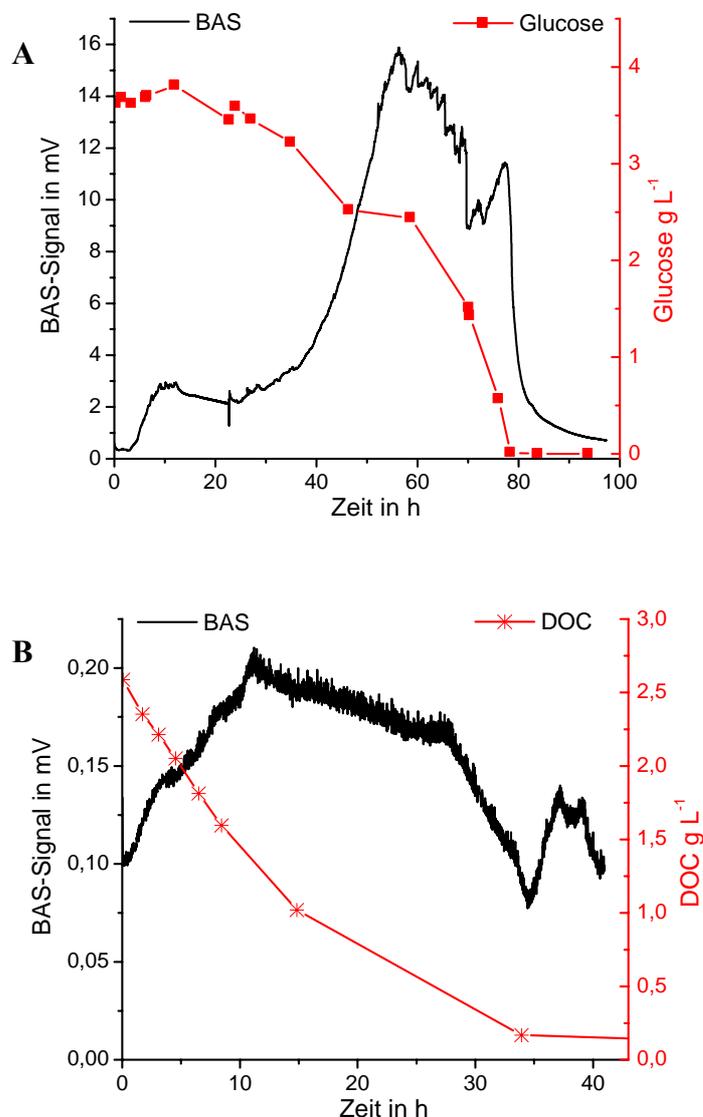


Abbildung 5-11: BAS-Signal und Glucose bei der aeroben Fermentation von *Azotobacter vinelandii* (Versuch A), BAS-Signal und DOC bei der aeroben Fermentation von *Methylobacillus sp.* (Versuch B)

Bei der Kultivierung von *Azotobacter vinelandii* stieg das Signal des BAS nach dem Animpfen auf 2,5 mV an, dieser Anstieg korrelierte nicht mit einem Abbau an Substrat. Auf diesem Niveau blieb das BAS-Signal für ca. 15 h. In dem folgenden Zeitraum blieb das BAS-Signal für ca. 20 h nahezu konstant. Mit dem Beginn des Glucose-Abbaus war auch ein starker Anstieg des BAS-Signals zu erkennen. Das BAS-Signal stieg bis auf 15,8 mV; ab dem Zeitpunkt, an dem das Substrat abgebaut war, fiel das BAS-Signal wieder auf den Ausgangswert ab.

Bei der Fermentation von *Methylobacillus* sp. waren die Änderungen des BAS-Signals weniger ausgeprägt. Die Elimination des Methanols wurde durch die Messung des gelösten organischen Kohlenstoffes bestimmt. Direkt nach dem Animpfen begann der Abbau des Substrates, parallel war auch ein Anstieg des BAS-Signals zu erkennen. Das BAS-Signal stieg von 0,10 mV auf ein maximales Signal von 0,21 mV an. Während dieses Versuches konnten keine repräsentativen Messwerte für die optische Dichte registriert werden, da die Mikroorganismen zu einem erheblichen Anteil als Biofilm an den Reaktorwänden und den Elektroden des BAS aufwuchsen.

In der Abbildung 5-12 sind das BAS-Signal, die optische Dichte und der Verlauf der Glucosekonzentration während einer anaeroben Fermentation von *Lactobacillus pentosus* dargestellt.

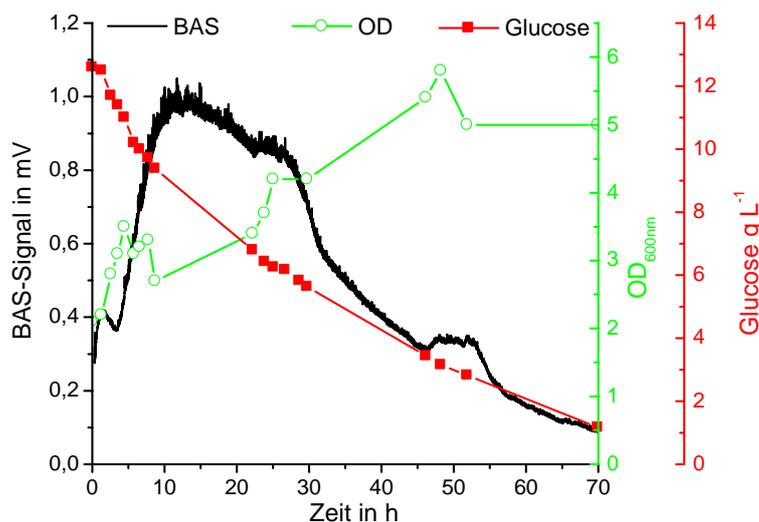


Abbildung 5-12: BAS-Signal, OD und Glucose bei der anaeroben Fermentation von *Lactobacillus pentosus*

Bei der anaeroben Fermentation von *Lactobacillus pentosus* wiesen weder der Substratabbau noch der Anstieg der optischen Dichte ausgeprägte Wachstumsphasen auf. Es wurden 12,6 g L⁻¹ Glucose innerhalb von 70 h abgebaut und die optische Dichte stieg dabei von 2,0

auf ca. 5,5 an. In dem Zeitraum von 3,5 bis 9,5 h fand ein steiler Anstieg des BAS-Signals statt, das Signal stieg von 0,4 mV auf ein maximales Signal von 1,0 mV an. Im weiteren Verlauf fiel das Signal des BAS langsam wieder ab.

Die Signale des BAS in den vorherigen Untersuchungen lassen sich nicht quantitativ vergleichen, da verschiedene Medien mit unterschiedlichen Substraten eingesetzt worden sind. In einer weiteren Versuchsreihe wurden daher verschiedene Mikroorganismen im M1-Medium (4.2.1) unter aeroben Bedingungen kultiviert. Mit diesem Versuch sollte untersucht werden, wie sich die Signale des BAS unter vergleichbaren Bedingungen unterscheiden. Zum Einsatz kamen die folgenden Organismen:

-	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>spizizenii</i>	DSM No. 347
-	<i>Escherichia coli</i>	DSM No. 498
-	<i>Klebsiella terrigena</i>	DSM No. 2687
-	<i>Pseudomonas</i> sp.	DSM No. 50117
-	<i>Flavobacterium gleum</i>	DSM No. 5567
-	<i>Ralstonia eutropha</i>	DSM No. 4058

Die Ergebnisse der Fermentationen sind in der Abbildung 5-13 A dargestellt. Aus den resultierenden Spannungssignalen der BAS-Signale wurden mit dem OHMschen Gesetz die Ströme berechnet und diese Signale anschließend integriert. Die Fläche der Signale entspricht formal der übertragenen Ladung (Formel 5-4), in der Abbildung 5-13 B sind die resultierenden Peakflächen der BAS-Signale der verschiedenen Mikroorganismen dargestellt.

$$dQ = I(t) \cdot dt$$

Formel 5-4: Bestimmung der Ladungsmenge

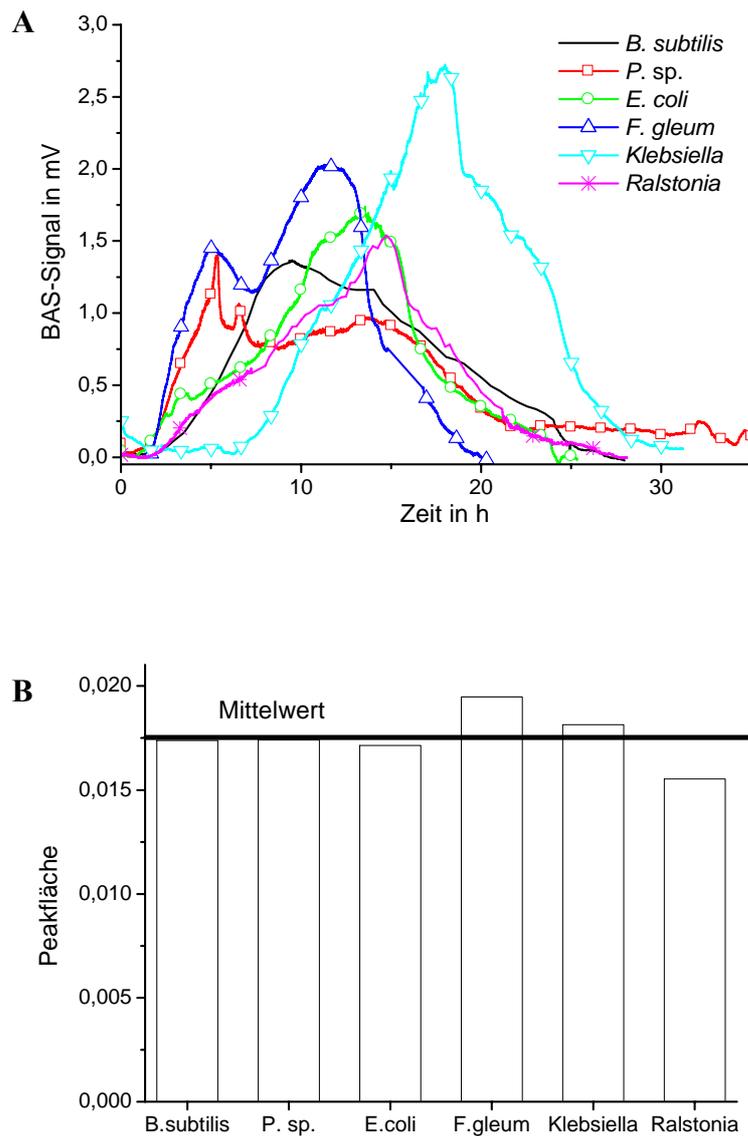


Abbildung 5-13: A – BAS-Signale bei der Kultivierung von verschiedenen Mikroorganismen im M1-Medium, B – Peakflächen der Kultivierungen

Der Verlauf der BAS-Signale weist zwischen den Versuchen deutliche Unterschiede hinsichtlich der lag-Phase, der absoluten Höhe des Signals und der Peakform auf. Die BAS-Signale zeigten während der Fermentationen jeweils deutliche Übereinstimmungen mit dem Verlauf der optischen Dichte (Daten nicht dargestellt).

Dagegen weisen die resultierenden Peakflächen relativ konstante Werte auf. Der Mittelwert der 6 Fermentationen beträgt 0,0175 Flächeneinheiten bei einer Standardabweichung von 0,0013 Flächeneinheiten; dieses entspricht einer Abweichung von 7 % (Abbildung 5-13 B). Aus diesem Ergebnis lässt sich schließen, dass die verschiedenen Mikroorganismen mit ver-

gleichbaren Stoffwechselwegen vergleichbare Signale in dem Bioaktivitätssensor hervorrufen.

5.2.4 BAS-Signal als Funktion der Zellzahl und der Aktivität der Zellen

In der Vergangenheit wurde wiederholt der Einsatz der elektrochemischen Systeme Brennstoffzelle und 3-Elektrodensystem zur Bestimmung von Zellzahlen diskutiert (z.B. MATSUNAGA et al. 1980 und BENNETTO et al. 1987). Diese Anwendung wurde in aeroben Batch-Versuchen mit *E. coli* 498 und dem Bioaktivitätssensor als elektrochemisches System untersucht. Dabei muss das Ergebnis der Aktivitätsbestimmung sowohl als Funktion der Zellzahl als auch der Aktivitätsänderung der einzelnen Mikroorganismenzellen angesehen werden (GUWY et al. 1998).

Die Untersuchungen wurden in 250 mL-Reaktoren (nach 4.3.5) durchgeführt, das AM-Medium (4.2.2) ohne die Kohlenstoffquelle sowie unterschiedliche Konzentrationen an Biomasse wurden in dem Reaktor vorgelegt. Nach 2 h erfolgte die Dosierung des Substrates Glucose, die Abbildung 5-14 zeigt die resultierenden BAS-Signale und den Verlauf der Glucosekonzentrationen.

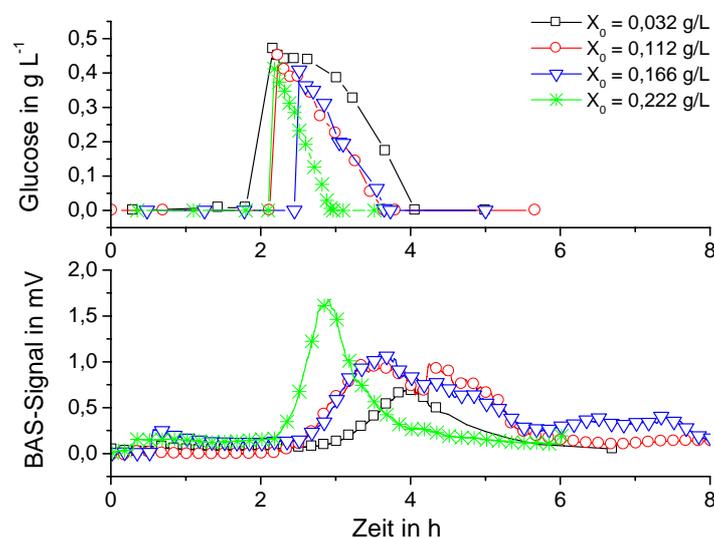


Abbildung 5-14: BAS-Signal und Glucosekonzentration von aeroben *E. coli*-Kulturen im AM-Medium unter Variation der Animpfkonzentration

Je höher die vorgelegte Biomassekonzentration war, um so schneller war der Abbau der zudosierten Glucose und um so steiler der Anstieg des BAS-Signals. Das maximale BAS-Signal fiel dabei jeweils mit dem Zeitpunkt des vollständigen Abbaus der Glucose zusammen.

Es sollte nun geklärt werden, inwieweit der Signalanstieg durch eine Biomassenzunahme zustande kam oder das Resultat der Aktivitätsänderung der Mikroorganismenzellen darstellte. Für diese weitere Auswertung wurde der Anfangsanstieg innerhalb von 30 min nach der Dosierung des Substrates herangezogen (Abbildung 5-15).

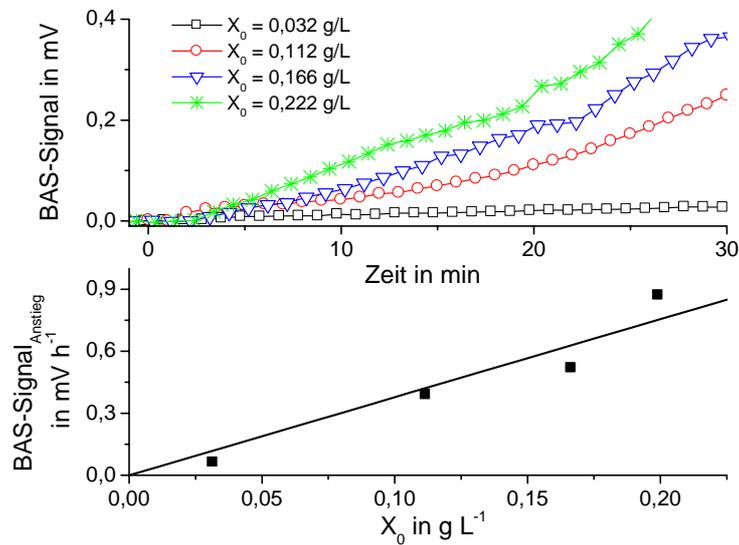


Abbildung 5-15: BAS-Signal nach einer Substratdosierung bei $t = 0$ min und Abhängigkeit des Anstiegs des BAS-Signals von der Zellmasse (Erläuterungen im Text)

Bei einer geringen Animpfkonzentration war nur ein langsamer Anstieg des Signals zu registrieren, je höher die Zahl der Bakterien im Reaktor war, um so schneller war der Anstieg des Signals. Dieser Zusammenhang zeigt, dass es generell möglich ist, mit dem BAS eine Aussage über die vorhandene Zellmasse zu treffen (Formel 5-5).

$$\text{BAS}_{\text{Anstieg}} \left[\frac{\text{mV}}{\text{h}} \right] = 4,48 \left[\frac{\text{mV} \cdot \text{L}}{\text{h} \cdot \text{g}} \right] \cdot X \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] - 0,1 \left[\frac{\text{mV}}{\text{h}} \right]$$

Formel 5-5: Anstieg des BAS-Signals als Funktion der Zellmasse
($R^2 = 0,93$, $SD = 0,11$, die Funktion ist in der Abbildung 5-15 dargestellt)

$\text{BAS}_{\text{Anstieg}}$ Anstieg des BAS-Signals nach der Substratdosierung
X Biomassekonzentration

Daneben zeigte sich auch, dass der Quotient des Anstiegs des BAS-Signals durch die Abbau-geschwindigkeit der Glucose bezogen auf das Reaktorvolumen für die verschiedenen Versuche relativ konstant ist, der so berechnete Quotient hatte einen Wert von $5,76 \pm 0,71 \text{ mV g}^{-1}$. Dies bedeutet, dass in dem oben beschriebenen Versuch pro Mol an umgesetzter

Glucose eine Potentialdifferenz zwischen den Elektroden des Bioaktivitätssensors von $1,03 \pm 0,13$ mV gemessen werden konnte oder, mit Hilfe des OHMschen-Gesetztes umgerechnet, dass pro Mol Glucose ein Strom von $1,03 \pm 0,13$ μ A zwischen den Elektroden geflossen ist.

Zur Unterscheidung, inwieweit die gemessenen BAS-Signale auf die Änderung der Aktivität der einzelnen Zellen oder auf die Zunahme der Zellzahl zurückzuführen sind, wurde die spezifische Aktivität als Quotient des BAS-Signals und der im System befindlichen Biomasse eingeführt (Formel 5-6):

$$\text{BAS}_{\text{spez.}} \left[\frac{\text{mV}}{\text{g}} \right] = \frac{\text{BAS} [\text{mV}]}{X_{\text{ges}} [\text{g}]} = \frac{\text{BAS} [\text{mV}]}{X \left[\frac{\text{g}}{\text{L}} \right] \cdot V [\text{L}]}$$

Formel 5-6: Bestimmung der spezifischen Aktivität

$\text{BAS}_{\text{spez.}}$	Spezifisches BAS-Signal
BAS	gemessenes BAS-Signal
X_{ges}	im System vorhandene Biomasse
X	Biomassekonzentration
V	Reaktorvolumen

Die Abbildung 5-16 zeigt das BAS-Signal, die Biomasse in dem Reaktor und die Änderung der so definierten spezifischen Aktivität während einer Fermentation von *E. coli* bei einer Animpfkonzentration von $X_0 = 0,2$ g L^{-1} , entsprechend einer Gesamtbiomasse von 0,05 g. Der Verlauf der Biomasse wurde über eine Kalibrierkurve aus der mittels einer Durchflussküvette online gemessenen optischen Dichte berechnet.

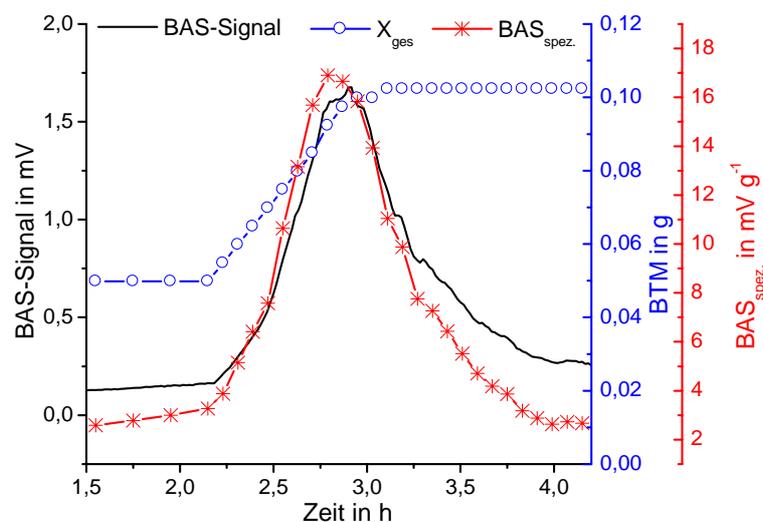


Abbildung 5-16: BAS-Signal, Biotrockenmasse und spezifisches BAS-Signal

Es stellte sich heraus, dass sich die spezifische Aktivität während des Versuchs stark änderte. Vor der Dosierung des Substrats betrug die spezifische Aktivität 3 mV g^{-1} Biomasse, während des Glucoseabbaus stieg dieser Wert auf 17 mV g^{-1} an. Am Ende des Versuchs war die spezifische Aktivität wieder auf ca. $2,5 \text{ mV g}^{-1}$ gesunken. Während weiterer Versuche konnten bis zu zehnfache Steigerungen der spezifischen Aktivität beobachtet werden. Das BAS-Signal ist daher nur unter sehr spezifischen Randbedingungen zur Zellzahlbestimmung geeignet. Weitere Untersuchungen zur Deutung des BAS-Signals als Funktion der Zellzahl und der Aktivität der Mikroorganismenzellen sind unter 5.3.1.5 beschrieben.

5.2.5 Wirkung von stoffwechselaktiven Substanzen auf die Signalentstehung

Durch den Einsatz von Hemmstoffen, welche an bekannten Stellen im Stoffwechsel der Mikroorganismen angreifen, sollte versucht werden, weitere Hinweise auf die Entstehung des BAS-Signals zu erhalten. Die Versuche wurden mit den Organismen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Parallel wurden jeweils der Substratabbau und die Bildung von Biomasse verfolgt. Die Auswahl der Hemmstoffe erfolgte nach Literaturangaben mit dem Ziel, den Stoffwechsel der Mikroorganismen an den verschiedensten Stellen zu hemmen.

5.2.5.1 Hemmwirkungen auf *Escherichia coli*

Für die aeroben Versuche mit *Escherichia coli* 498 wurden 220 mL des AM-Mediums (4.2.2) im Reaktor vorgelegt. Nach Einstellung eines stabilen BAS-Signals wurden 30 mL einer Vorkultur in den Reaktor dosiert. Nach 2 h Kultivierung wurden 500 μL einer Glucoselösung mit 200 g L^{-1} zudosiert. Wenn die Glucose-Konzentration bis auf ca. $0,2 \text{ g L}^{-1}$ abgebaut war, wurden die inhibierenden Stoffe zudosiert. Parallel wurden die optische Dichte bei 600 nm und die Glucosekonzentration bestimmt. In der Abbildung 5-17 sind beispielhaft die Wirkungen von Chloramphenicol, Fluoracetat und Natriumazid auf das BAS-Signal, die Bildung von Biomasse und den Abbau von Glucose dargestellt.

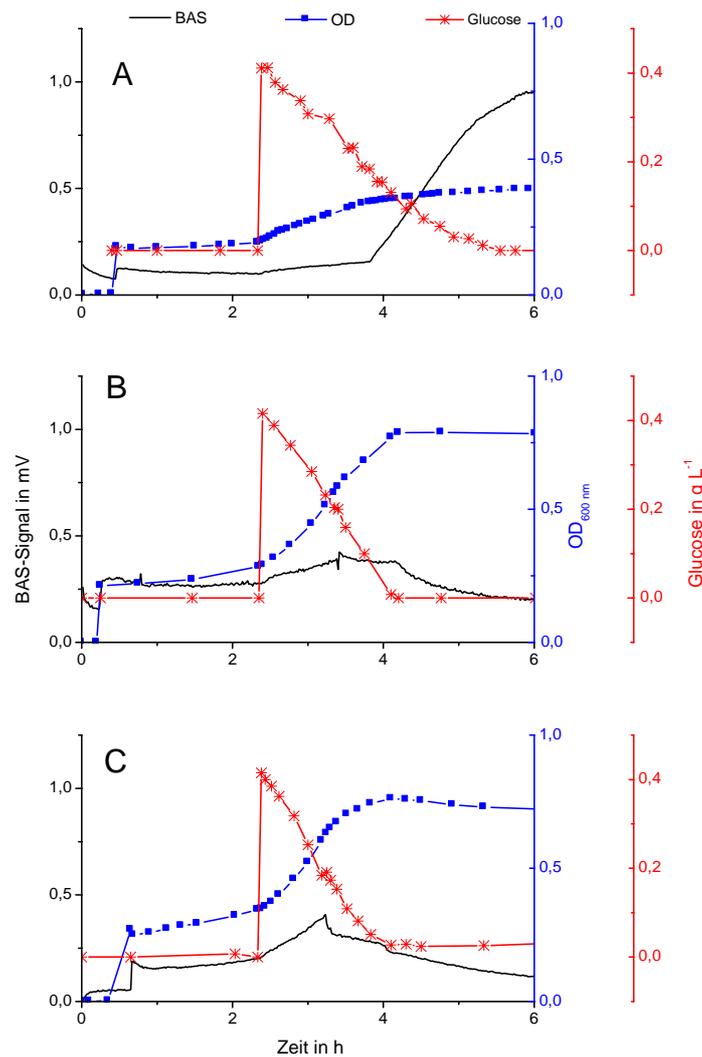


Abbildung 5-17: Wirkung von stoffwechselaktiven Substanzen auf aerob wachsende *E. coli*-Zellen (A - Dosierung von 1086 mg L⁻¹ Chloramphenicol bei t = 3,8 h, B – Dosierung von 4347 mg L⁻¹ Fluoracetat bei t = 3,4 h und C - Dosierung von 1000 mg L⁻¹ Natriumazid bei t = 3,2 h)

In der Abbildung 5-17 A ist ein Versuch dargestellt, in dem Chloramphenicol in den Reaktor zudosiert wurde. Das Chloramphenicol blockiert die Knüpfung der Peptidbindung bei der Proteinsynthese der prokaryotischen Mikroorganismen und weist eine bakteriostatische, konzentrationsabhängige Wirkung auf, ohne dass eine Beeinträchtigung anderer Stoffwechselfvorgänge auftritt (SCHLEGEL 1992). Die Glucosedosierung erfolgte nach 2,4 h und bewirkte einen Anstieg der Glucosekonzentration auf 0,4 g L⁻¹. Der Abbau des Substrats setzte umgehend ein, parallel war ein Ansteigen der optischen Dichte und des BAS-Signals zu erkennen. Nach 3,8 h hatte der Aktivitätssensor ein Signal von 0,16 mV, die optische Dichte betrug 0,34 und die Glucosekonzentration 0,18 g L⁻¹, nun erfolgte die Dosierung von 1086 mg L⁻¹ Chloramphenicol. Nach dieser Hemmstoffdosierung stieg das Signal des BAS bedeu-

tend schneller an und erreichte zu dem Zeitpunkt ($t = 5,5$ h), an dem die Glucose verstoffwechselt war, einen Wert von 0,92 mV. Der Glucoseabbau wurde von der Dosierung des Chloramphenicols nicht beeinflusst, dagegen ist nur noch eine bedeutend langsamere Zunahme der optischen Dichte zu erkennen.

Die Abbildung 5-17 B zeigt das Ergebnis eines Versuches, bei dem Fluoracetat in den Reaktor dosiert wurde. Das Fluoracetat blockiert den Tricarbonsäurezyklus, indem es zunächst wie Acetat aktiviert und in Citrat eingebaut wird, dann aber als Fluorcitrat das Enzym Aconitase und damit die weitere Umsetzung des Citrats hemmt (SCHLEGEL 1992). Hier erfolgte die Substratdosierung nach 2,4 h, im weiteren Verlauf des Versuches stiegen das BAS-Signal und die optische Dichte, die Substratkonzentration nahm entsprechend ab. Nach 3,4 h betrug die Glucosekonzentration $0,2 \text{ g L}^{-1}$, nun erfolgte die Dosierung von 4347 mg L^{-1} Fluoracetat. Durch die Dosierung des Hemmstoffes erfolgte keine Beeinflussung des Substratabbaus und der Bildung von weiterer Biomasse, dagegen war kein weiterer Anstieg des BAS-Signals festzustellen. Das BAS-Signal betrug zum Zeitpunkt der Hemmstoffdosierung 0,39 mV und bei $t = 4$ h 0,38 mV, zu diesem Zeitpunkt war das Substrat vollständig abgebaut. Im weiteren Versuchsverlauf fiel das BAS-Signal wieder ab.

In der Abbildung 5-17 C ist ein Versuch dargestellt, in dem der Mikroorganismenkultur Natriumazid zugesetzt wurde. Das Natriumazid hemmt den Elektronenfluss in der Atmungskette der Mikroorganismen (STRYER 1990). In dem Versuch wurden nach 3,2 h 1000 mg L^{-1} Natriumazid in den Reaktor dosiert, von dieser Dosierung wurden die Bildung von Biomasse und der Substratabbau nicht beeinflusst. Dagegen war ein sofortiger Abfall des BAS-Signals zu registrieren.

Neben einer Variation der Konzentrationen der verwendeten Substanzen wurden weitere Versuche zur Hemmung der mikrobiellen Aktivität mit dem Entkoppler Dinitrophenol, den in der Atmungskette angreifenden Kaliumcyanid und Antimycin A sowie dem Antibiotikum Ampicillin, welches eine Hemmung der Zellwandsynthese verursacht, durchgeführt (SCHLEGEL 1992). Die Tabelle 5-3 zeigt eine Zusammenstellung der entsprechenden Versuche. Dabei wurde eine qualitative Einteilung der Signalverläufe für die optische Dichte, den Substratabbau und das BAS-Signal nach der Dosierung des Hemmstoffes vorgenommen. Diese Einteilung beschreibt, ob das Signal durch die Hemmstoffdosierung einen Anstieg, eine Verringerung oder keine Änderung zeigte, weiterhin konnten die Signaländerungen durch die Dosierungen verlangsamt werden.

Tabelle 5-3: Versuche zur Bestimmung der Wirkung von Hemmstoffen auf die Stoffwechselaktivität von *E. coli*-Kulturen (↓ Signalabfall, ↑ Signalanstieg, → Signal bleibt konstant, ↘ verlangsamter Signalabfall, ↗ verlangsamter Signalanstieg, □ kein Einfluss auf den Signalverlauf)

Hemmstoff	Konzentration in mg L ⁻¹	Wirkung auf		
		OD _{600 nm}	dS/dt	BAS
Natriumfluoracetat	1896	□	□	↗
	4347	□	□	→
Chloramphenicol	1086	↗	□	↑
	2174	→	↘	↑
	4348	→	→	↑
Dinitrophenol	2000	□	□	↑
	3478	□	↘	↑
Kaliumcyanid	109	→	(*)	↓
Natriumazid	1000	↗	□	↓
Ampicillin	435	□	□	□
Antimycin A **	174	□	□	□
	322	□	□	□

(*) die Bestimmung der Glucose wurde von dem Kaliumcyanid gestört

(**) die Substanz wurde vor der Dosierung in Ethanol gelöst

Das Fluoracetat zeigte bei den getesteten Konzentrationen jeweils keinen Einfluss auf die Bildung von Biomasse und den Substratverbrauch. Bei einer Konzentration von 1896 mg L⁻¹ wurde der Anstieg des BAS-Signals verlangsamt und bei einer Konzentration an Fluoracetat von 4347 mg L⁻¹ blieb das Signal konstant, bis das Substrat abgebaut war.

Die Dosierung von Chloramphenicol zeigte bei Konzentrationen von 1086 – 4348 mg L⁻¹ einen starken Signalanstieg des BAS. Die optische Dichte und die Glucosekonzentration zeigten bei niedrigen Dosierungen des Chloramphenicols lediglich eine geringe Beeinflussung der Signalverläufe, bei der Konzentration von 4348 mg L⁻¹ blieben die Signale nach der Hemmstoffdosierung konstant.

Der Entkoppler Dinitrophenol bewirkte bei Konzentrationen von 2000 – 3478 mg L⁻¹ einen Anstieg des BAS-Signals, der Substratabbau und die Biomassenbildung wurden nicht signifikant von der Hemmstoffdosierung beeinflusst.

Eine Dosierung von 109 mg L^{-1} Kaliumcyanid bewirkte einen sofortigen Abfall des BAS-Signals und die optische Dichte blieb im Weiteren konstant. Die Dosierung von 435 mg L^{-1} Ampicillin und $174 - 322 \text{ mg L}^{-1}$ Antimycin A zu den *E. coli*-Kulturen zeigte keine Auswirkungen auf die Signalverläufe.

5.2.5.2 Hemmwirkungen auf *Saccharomyces cerevisiae*

Zur Beurteilung der akut toxischen Wirkung von verschiedenen Hemmstoffen auf Eukaryonten wurden aerobe Versuche mit *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt. Die Untersuchungen wurden als Batch-Versuche im YPD-Medium (4.2.4) durchgeführt, zu Versuchsbeginn betrug die Glucose-Konzentration ca. 15 g L^{-1} . Die Hemmstoffe wurden zudosiert, wenn das Substrat bis auf 5 g L^{-1} abgebaut war. Parallel zum BAS-Signal wurden jeweils die optische Dichte und die Substratkonzentration im Reaktor bestimmt. Eingesetzt wurden die folgenden Hemmstoffe, angegeben sind jeweils auch die entsprechenden Wirkungsmechanismen, zum Teil wurden hier die Hemmstoffe analog zu den Versuchen mit *E. coli* eingesetzt, daneben kamen auch spezifische Hemmstoffe der Eukaryonten zum Einsatz:

- Rotenon: Verhindert den Elektronentransfer von den Eisen-Schwefel-Zentren zum Ubichinon in der Atmungskette (STRYER 1990)
- Antimycin A: hemmt das Cytochrom c in der Atmungskette (STRYER 1990)
- Natriumazid: Hemmung des Elektronenflusses in der Atmungskette (STRYER 1990)
- Dinitrophenol: Entkoppler, die Kopplung zwischen Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung wird aufgehoben (SCHLEGEL 1992)
- Actinomycin D: Lagert sich an die GC-Basenpaare der DNA an und blockiert dadurch die Transkription durch die RNA-Polymerase (STRYER 1990)
- Nystatin (Antimykotika, Polyen-Antibiotika): wirkt auf die Plasmamembran, die Komplexierung mit Ergosterol bewirkt eine Zunahme der Membranpermeabilität, daneben können die Polyene auch eine oxidative Schädigung der Zellen bewirken (WALKER 1998)
- Natriumfluorid: hemmt kompetitiv die Enolase-Reaktion der Glykolyse (z.B. CURRAN et al. 1994)
- Oligomycin: beeinflusst als ATPase-Inhibitor den Energietransport und die Phosphorylierung (SCHLEE und KLEBER 1991)
- Atractylosid: Inhibierung der Adeninnucleotid-Translokase, der ADP/ATP-Austausch wird gehemmt und damit die ATP-Synthese während der Atmung blockiert (SCHLEE und KLEBER 1991)

- Valinomycin: Ionophor für einwertige Ionen, beschleunigt die Kalium-Fluss-Raten durch die Membran (CYPIONKA 1999).

Die Abbildung 5-18 zeigt den zeitlichen Verlauf des Bioaktivitätssignals, der optischen Dichte und der Glucosekonzentration nach der Dosierung von Natriumfluorid, Natriumazid und Dinitrophenol zu den aerob wachsenden Zellen von *Saccharomyces cerevisiae*.

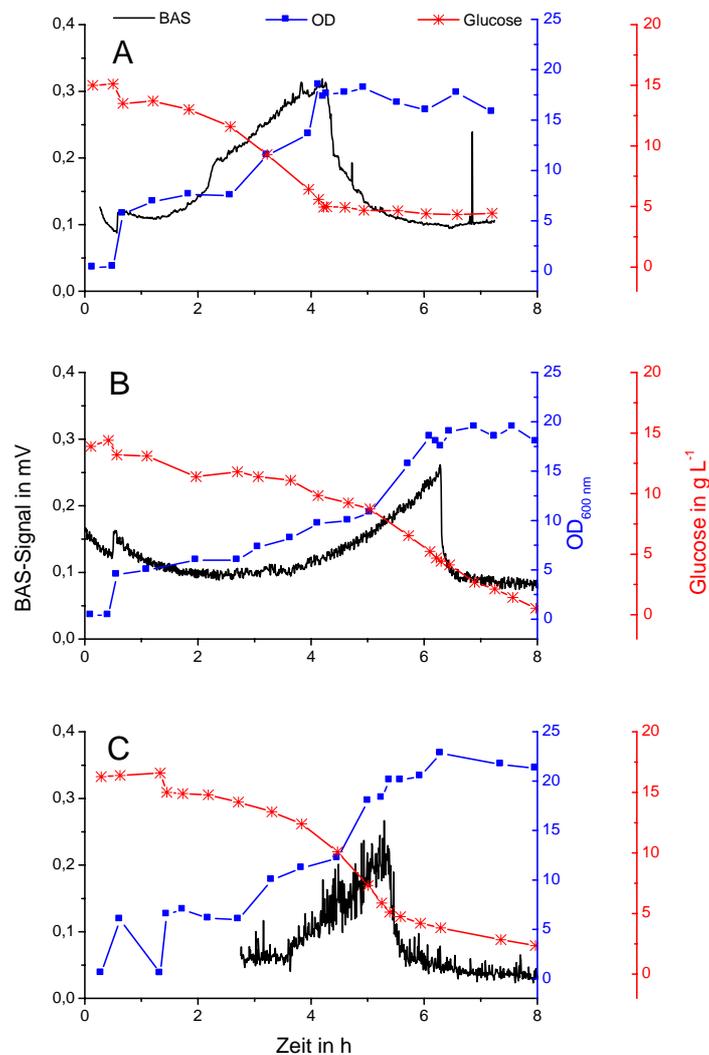


Abbildung 5-18: Wirkung von Hemmstoffen auf aerob wachsende Zellen von *Saccharomyces cerevisiae* (A – Dosierung von 520 mg L⁻¹ Natriumfluorid bei t = 4,2 h, B – Dosierung von 260 mg L⁻¹ Natriumazid bei t = 6,3 h und C – Dosierung von 340 mg L⁻¹ Dinitrophenol bei t = 5,3h)

In der Abbildung A wurden nach 4,2 h 520 mg L⁻¹ Natriumfluorid in den Reaktor dosiert. Durch diese Hemmstoffdosierung fiel das BAS-Signal auf den Ausgangswert, das Substrat wurde nicht weiter abgebaut und die optische Dichte blieb im weiteren Verlauf konstant. Die Abbildung B zeigt das Ergebnis eines Versuchs, bei dem Natriumazid als Hemmstoff ver-

wendet wurde, hier bewirkte die Hemmstoffdosierung einen schnellen Abfall des BAS-Signals.

Nach der Dosierung des Azids wurde keine weitere Biomasse gebildet, aber der Glucoseabbau wurde nicht beeinflusst. Die Wirkung des Dinitrophenols auf *Saccharomyces cerevisiae* zeigt die Abbildung 5-18 C, nach der Dosierung des Entkopplers fiel das Signal des BAS ab. Der Glucoseabbau lief anschließend verlangsamt ab und es war nur noch eine geringe Zunahme der optischen Dichte festzustellen.

Die Tabelle 5-4 zeigt eine Zusammenstellung der durchgeführten Versuche, hier wurde analog zu 5.2.5.1 eine qualitative Beschreibung der Signalverläufe nach der Hemmstoffdosierung durchgeführt.

Tabelle 5-4: Versuche zur Bestimmung der Wirkung von Hemmstoffen auf die Stoffwechselaktivität von *Saccharomyces cerevisiae*-Kulturen (↓ Signalabfall, ↑ Signalanstieg, → Signal bleibt konstant, ↘ verlangsamter Signalabfall, ↗ verlangsamter Signalanstieg, □ kein Einfluss auf den Signalverlauf)

Hemmstoff	Konzentration in mg L ⁻¹	Wirkung auf		
		OD _{600 nm}	dS/dt	BAS
Actinomycin D	45	□	□	→
Antimycin A	9,1	→	→	↓
Dinitrophenol	4450	→	→	↓
	2200	→	→	↓
	340	→	↘	↓
	112	□	□	↓
	18,6	□	□	□
Natriumazid	260	→	□	↓
Natriumfluorid	520	→	→	↓
Nystatin	97,6	→	→	↓
Oligomycin *	6,8	□	□	↗
Rotenon *	45,5	□	□	→
	6,8	□	□	□
Atractylosid *	400	□	□	□
Valinomycin	40	↗	□	□

(*) die Substanzen wurden in Ethanol gelöst und den Kulturen zugegeben

Von den getesteten Substanzen wirkten Rotenon, Antimycin A und Azid auf Komponenten der Atmungskette und bewirkten jeweils einen Signalabfall des BAS. Nach der Dosierung von $9,1 \text{ mg L}^{-1}$ Antimycin A fiel das Signal des BAS ab, es wurde keine weitere Biomasse gebildet und kein Substrat mehr verbraucht. Die Dosierung von 260 mg L^{-1} Natriumazid bewirkte einen Signalabfall des BAS und verhinderte eine weitere Biomassebildung, die Glucoseverwertung wurde nicht beeinflusst. Rotenon wurde in zwei verschiedenen Konzentrationen zudosiert, die Dosierung von $6,8 \text{ mg L}^{-1}$ beeinflusste die Signale nicht. Die Dosierung von $45,5 \text{ mg L}^{-1}$ Rotenon zeigte wiederum keinen Einfluss auf die Bildung von Biomasse und den Substratverbrauch, dagegen stieg das BAS-Signal nicht weiter an.

Für den Entkoppler Dinitrophenol (DNP) konnte eine Dosis-Wirkungs-Beziehung gezeigt werden. Eine Konzentration von $18,6 \text{ mg L}^{-1}$ zeigte weder auf den Substratverbrauch, die Biomassenbildung noch auf das Signal des BAS eine Wirkung. Ab einer Konzentration von 112 mg L^{-1} wurde eine schnelle Abnahme des BAS-Signals festgestellt. Die Bildung von Biomasse wurde ab einer Konzentration von 340 mg L^{-1} unterbunden. Der Substratverbrauch wurde bei dieser Konzentration gehemmt und ab einer Konzentration von 2200 mg L^{-1} wurde nach der Hemmstoffdosierung kein weiterer Substratabbau mehr festgestellt.

Oligomycin und Atractylosid haben jeweils einen Einfluss auf die ATP-Bildung, beide Substanzen zeigten in den durchgeführten Versuchen keine signifikanten Auswirkungen auf die Entstehung des BAS-Signals und die Verläufe der optischen Dichte und der Glucosekonzentration.

Natriumfluorid bewirkte bei einer Konzentration von 520 mg L^{-1} eine Inhibierung des Wachstums und der Substratverwertung, das BAS-Signal fiel nach der Dosierung des Hemmstoffs der Glykolyse schnell ab. Eine vergleichbare Wirkung zeigte das Nystatin. Die Dosierung von $97,6 \text{ mg L}^{-1}$ des Nystatins bewirkte ein schnelles Absinken des BAS-Signals und verhinderte einen weiteren Substratverbrauch sowie die Bildung von Biomasse.

Der Hemmstoff der Transkription Actinomycin D zeigte bei der eingesetzten Konzentration keinen Einfluss auf das Wachstum der Mikroorganismen, das BAS-Signal stieg allerdings nach der Hemmstoffdosierung nicht weiter an. Der Ionophor Valinomycin zeigte auf die gemessenen Parameter nur einen geringen Einfluss, die Biomassenzunahme wurde verlangsamt und das BAS-Signal und die Substrataufnahme wurden nicht beeinflusst.

5.2.6 Untersuchungen zur Charakterisierung des BAS-Signals

Um das BAS-Signal zu charakterisieren, wurden Untersuchungen durchgeführt, bei denen die folgenden Zielstellungen im Mittelpunkt standen:

- Zeitliche Dynamik der Signalentstehung
- Einfluss eines direkten Kontaktes zwischen Mikroorganismen und der Anode
- Wirkung von Huminstoffen als Mediatoren
- Abschätzung der Konzentration der Elektronendonatoren

Diese Untersuchungen wurden vor dem Hintergrund der unter 3.1.3 beschriebenen Elektronenübertragungsmechanismen durchgeführt. Im Laufe der Untersuchungen wurden sowohl der Bioaktivitätssensor als auch das potentiostatisch geregelte 3-Elektrodensystem eingesetzt.

5.2.6.1 Zeitliche Dynamik nach einer Substrat-Dosierung

Um eine Aussage über die Zeitdauer zwischen der Aufnahme eines Substratmoleküls durch die Mikroorganismen und dem Zeitpunkt der Änderung des BAS-Signals treffen zu können, wurde einer *E. coli*-Kultur in der stationären Wachstumsphase Glucose zudosiert (Abbildung 5-19).

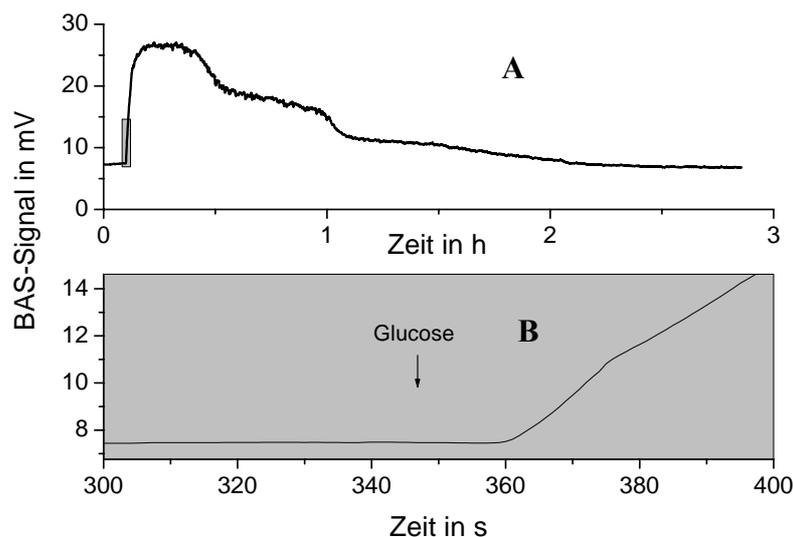


Abbildung 5-19: Versuch zur Bestimmung der zeitlichen Dynamik der Signalentstehung (die Abbildung B zeigt eine Vergrößerung des in der Abbildung A grau markierten Ausschnitts)

Die Abbildung 5-19 A zeigt den kompletten Verlauf des BAS-Signals nach der Dosierung von 1 mL einer 1 molaren Glucoselösung, in der Abbildung B ist der Ausschnitt des relevanten Zeitabschnittes dargestellt.

Die Dosierung erfolgte bei $t = 348$ s, bei der gewählten Durchflussgeschwindigkeit betrug die Dauer, bis ein Flüssigkeitssegment von dem Reaktor in dem externen Kreislauf bis zum Sensor gefördert wurde, 8,5 s. Innerhalb von 12 s nach der Substratdosierung wurde ein Anstieg des BAS-Signals festgestellt. Die Reaktionen sind dementsprechend innerhalb von ca. 3,5 s abgelaufen. In diesem Zeitraum müssen die Aufnahme des Substrates, die biologische Umset-

zung innerhalb der Zelle, das Ausscheiden der elektroaktiven Substanzen und die Umsetzung der reduzierten Stoffwechselintermediate an der Anode abgelaufen sein. Für diese Betrachtungen wurde die Mischzeit in dem Reaktor vernachlässigt.

5.2.6.2 Untersuchungen des Einflusses des direkten Kontakts der Mikroorganismen mit der Anode auf den Elektronentransfer

Um einen Einfluss des direkten Kontaktes zwischen den Mikroorganismen und der Anode zu untersuchen, wurden zwei Bioaktivitätssensoren parallel eingesetzt, die weitere Versuchsdurchführung entsprach 4.3.4.1.

Die Anode in dem ersten Sensor wurde mit einer Dialysemembran gegenüber dem Medium abgeschirmt, während die Anode des zweiten Sensors einen direkten Kontakt zu den Mikroorganismen ermöglichte. Es wurde eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgrenze von 1000 Dalton verwendet, dies stellte sicher, dass zwar niedermolekulare Substanzen die Membran passieren konnten, aber kein Kontakt zwischen den Mikroorganismen und der Elektrode möglich war. Die Versuche wurden mit *E. coli* 498 im AM-Medium durchgeführt.

Nach dem Abbau des vorgelegten Mediums wurden 200 μL einer 1 M Glucose-Lösung in den Reaktor gegeben und die resultierenden Peakflächen ausgewertet. Es zeigte sich, dass die Peakflächen vergleichbar waren. Die Peakfläche des BAS bei dem Sensor mit der Dialysemembran betrug $1,28 \cdot 10^{-4}$ Flächeneinheiten und bei dem Sensor ohne die Membran $1,15 \cdot 10^{-4}$ Flächeneinheiten. Dies entspricht einer Abweichung von 10 %, wobei der Sensor mit der Membran einen höheren Wert aufwies. Anschließend wurde die Membran von der Anode des Sensors entfernt und eine erneute Glucosedosierung durchgeführt, hier betragen die Abweichungen zwischen den Peakflächen ebenfalls 10 %.

5.2.6.3 Huminstoffe als Mediatoren

In der Literatur wurde die Wirkung von Huminstoffen als Mediatoren für den Elektronentransfer zwischen Mikroorganismen und elektrochemischen Systemen diskutiert (siehe 3.1.3). In dieser Versuchsreihe sollten daher die Wirkungen von Huminsäure und Anthrachinon-2,6-disulfonat (AQDS), als Strukturanalogon zu den Huminstoffen, mit dem Mediator HNQ verglichen werden.

Als Organismus für diese Untersuchungen wurde *E. coli* 498 verwendet, die Anzucht der Kultur erfolgte in 100 mL M1-Medium bei 30 °C und 180 rpm für 24 h auf einem Schüttelinkubator. Die Biomasse wurde bei 10000 x g für 10 min abzentrifugiert und zweimal mit je

100 mL sterilem H₂O gewaschen. Anschließend wurde das Pellet in 10 mL sterilem Wasser resuspendiert.

Die Aktivitätsbestimmung erfolgte in dem potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystem (nach 4.3.4.2) bei einem Potential von 300 mV gegen Silber/Silberchlorid. In dem Reaktor wurde der Sörensen-Puffer mit den zu testenden Substanzen vorgelegt. Anschließend wurde die Messung gestartet und nach ca. 20 min 2 mL der Mikroorganismensuspension zudosiert, in der Abbildung 5-20 ist das Ergebnis des entsprechenden Versuches dargestellt.

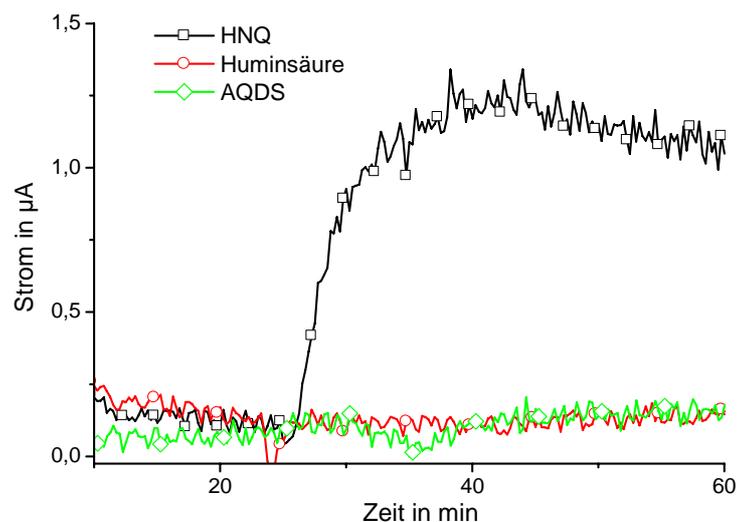


Abbildung 5-20: Nutzung von Huminstoffen als Mediatoren (vorgelegt wurden 0,2 mM HNQ, 0,2 g L⁻¹ Huminsäure und 5 mM AQDS)

Nach der Dosierung der Mikroorganismen änderte sich das Stromsignal bei der Huminsäure und dem AQDS nicht, im Gegensatz dazu kam es nach der Dosierung des HNQ zu einem Anstieg des Stromflusses. Während das HNQ von dem Stoffwechsel der Mikroorganismen als artifizierender Elektronenakzeptor genutzt wurde, zeigten die Huminsäure und das AQDS keinen Einfluss auf den Elektronentransfer zwischen den Mikroorganismen und den Elektroden des elektrochemischen Systems.

5.2.6.4 Abschätzung der Konzentration der Elektronendonatoren – Untersuchungen im Chemostaten mit *E. coli*

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte einerseits eine Abhängigkeit des BAS-Signals von der Durchflussrate im Chemostaten untersucht werden und andererseits durch Substratdosierungen eine Quantifizierung der auf die Elektrode des Bioaktivitätssensors übertragenen Elektronen durchgeführt werden.

Verwendet wurden für diese Untersuchungen der *E. coli*-Stamm TG 1 (DSM 6056) und das Mineralmedium nach 4.2.3, mit diesem Stamm und Medium wurden bereits von anderen Arbeitsgruppen umfangreiche Untersuchungen zum aeroben Stoffwechsel durchgeführt, welche als Vergleichsdaten für die vorliegenden Untersuchungen dienen sollten (KAYSER 1999). Der Versuch wurde wie unter 4.3.6 zu Beginn als Batch-Versuch durchgeführt, nach dem Abbau des vorgelegten Substrates wurde das Feeding gestartet. Sobald sich ein Fließgleichgewicht eingestellt hatte, wurde die Durchflussrate verändert. Die Abbildung 5-21 zeigt die resultierenden Signale für das BAS-Signal, die Biomasse und das Substrat.

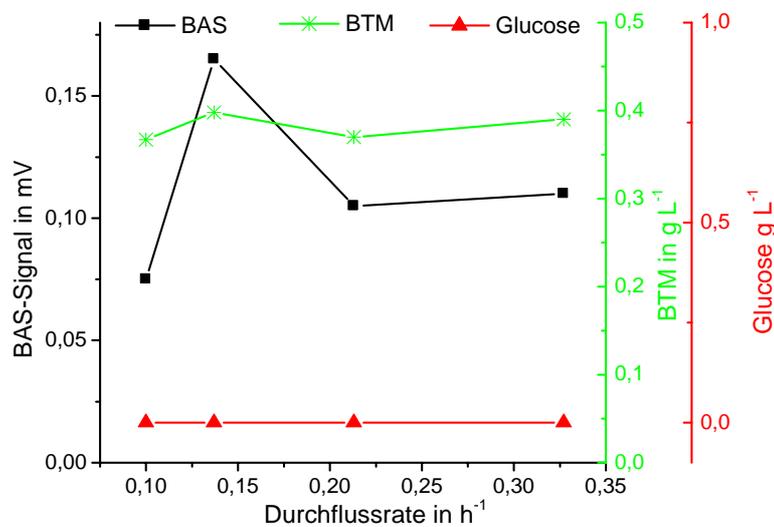


Abbildung 5-21: BAS-Signal, Biotrockenmasse und Glucose als Funktion der Verdünnungsrate

Wie zu erwarten zeigten sich für die eingestellten Verdünnungsrate relativ konstante Werte für die betrachteten Signale. Das Substrat wurde komplett abgebaut, die Konzentration an Biomasse betrug ca. 0,4 g L⁻¹. Das BAS-Signal zeigte keine funktionelle Abhängigkeit von der Durchflussrate. Bei $D = 0,10 \text{ h}^{-1}$ betrug das BAS-Signal 0,075 mV, dieser Wert stieg auf 0,165 mV bei $D = 0,14 \text{ h}^{-1}$. Bei höheren Verdünnungsraten sank das BAS-Signal wieder auf ca. 0,107 mV ab. Der Mittelwert für das BAS-Signal betrug $0,11 \pm 0,04 \text{ mV}$. Zur Bestimmung des Verhältnisses der gemessenen zu den theoretischen Strömen (COULOMB'schen-Ausbeuten) wurden bei verschiedenen Verdünnungsstufen Substrat-Pulse in den Reaktor dosiert. Die Abbildung 5-22 A zeigt das Ergebnis eines Versuches bei einer Verdünnungsrate von $0,21 \text{ h}^{-1}$ und der Dosierung von 5 – 120 μL eines Glucosekonzentrates mit 500 g L^{-1} als Substratpulse.

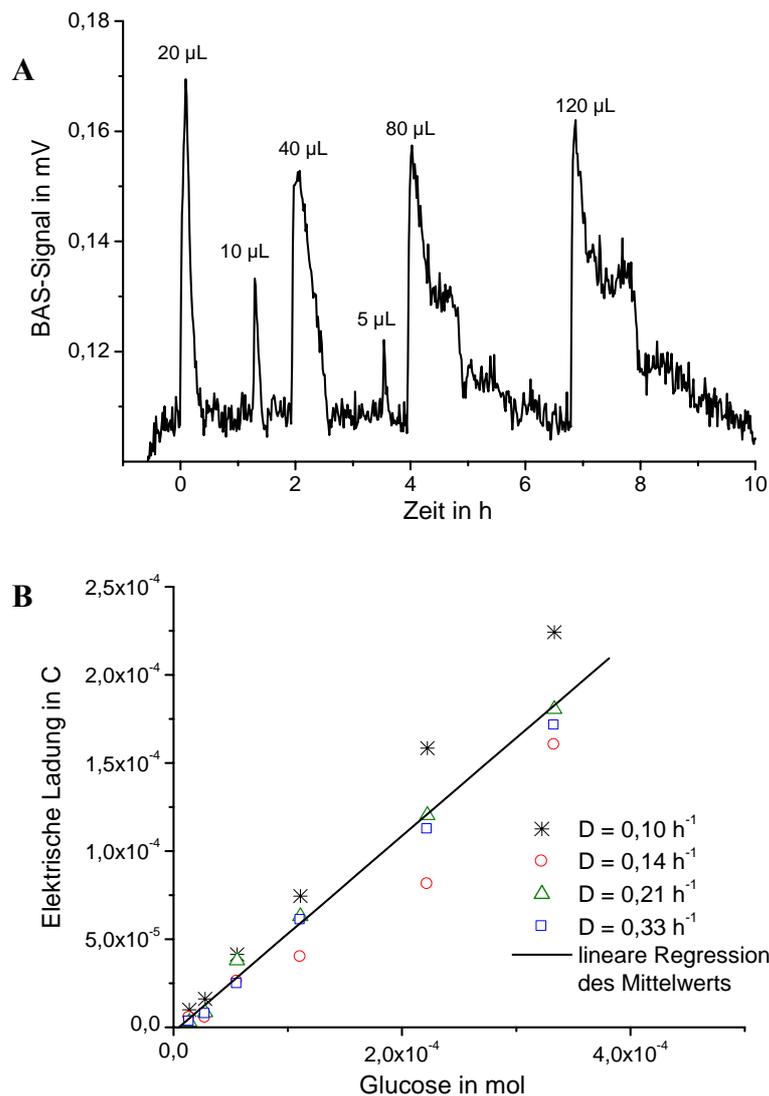


Abbildung 5-22: A - Zugabe eines Glucosekonzentrates während einer kontinuierlichen Fermentation von *Escherichia coli* mit einer Durchflussrate von $0,21 \text{ h}^{-1}$, B - Bestimmung der mit dem BAS gemessenen elektrischen Ladungen nach der Dosierung von Glucose in einen Chemostaten bei verschiedenen Durchflussraten (die Geradengleichung wird im Text angegeben)

Nach den Dosierungen stieg das BAS-Signal jeweils umgehend an, bei den Dosierungen von 5 - 20 µL war ein Anstieg der Peakhöhe mit steigender Substratkonzentration zu erkennen. Bei den höheren Dosierungen stieg das maximale BAS-Signal nicht weiter an und hatte einen maximalen Wert von ca. 0,16 mV, bei den höheren Dosierungen war eine Schulter bei ca. 0,13 mV im Signalabfall zu erkennen. Die Peakfläche stieg mit einer steigenden Substratdosierung an. In der Abbildung 5-22 B sind die Peakflächen bei den verschiedenen Durchflussraten nach den Dosierungen gegen die zudosierte Glucosemenge aufgetragen. Die

Peakflächen entsprechen nach Formel 5-4 der übertragenen Ladung. Die resultierende Gerade folgt der Gleichung:

$$\text{Elektrische Ladung [C]} = 0,56 \left[\frac{\text{C}}{\text{mol}} \right] \cdot \text{Glucosekonzentration [mol]} - 2,63 \cdot 10^{-6} [\text{C}].$$

Formel 5-7: Ladungsmenge des BAS als Funktion des Glucoseumsatzes
($R^2 = 0,998$, Standardabweichung $3,15 \cdot 10^{-6}$)

Laut Reaktionsgleichung 3-4 werden bei der Oxidation von 1 mol Glucose 2870 kJ an Energie umgesetzt, womit sich eine Ladungsmenge von 0,19 mC pro kJ im Stoffwechsel umgesetzter Energie ergibt.

Um die Fragestellung zu klären, welcher Anteil der während der Substratoxidation umgesetzten Elektronen an den Elektroden des Bioaktivitätssensors oxidiert wurde, wurden zunächst die theoretisch übertragbaren Elektronen berechnet. Laut der Reaktionsgleichung 9-1 werden bei der Oxidation von 1 mol Glucose 24 mol Elektronen umgesetzt, die Anzahl der theoretisch übertragbaren Elektronen pro mol Glucose lässt sich mit der Formel 5-8 berechnen.

$$\left(\frac{Q}{n} \right)_{\text{theo}} = F \cdot N_{\text{Elektronen/Substrat}} = 96.487 \frac{\text{C}}{\text{mol}} \cdot 24 = 2.315.688 \frac{\text{C}}{\text{mol}}$$

Formel 5-8: Bestimmung der theoretisch übertragbaren Elektronen

Das Verhältnis von den übertragenen Elektronen zu den theoretisch übertragbaren Elektronen wird als Elektronenausbeute w in Prozent angegeben und entspricht der COULOMB'schen Ausbeute (Formel 5-9).

$$w = \frac{\left(\frac{Q}{n} \right)_{\text{gemessen}}}{\left(\frac{Q}{n} \right)_{\text{theo}}} \cdot 100 = 2,3 \cdot 10^{-5} \%$$

Formel 5-9: Anteil der übertragenen Elektronen

Es wurde in dem Bioaktivitätssensor bei der aeroben Kultivierung von *E. coli*-Zellen lediglich ein Anteil von $2,3 \cdot 10^{-5} \%$ der theoretisch aus der Oxidation von Glucose möglichen Elektronen an der Anode umgesetzt.

5.3 Untersuchungen zur Detektion der mikrobiellen Aktivität in Laborkläranlagen

In den bisher beschriebenen Untersuchungen mit den Modellorganismen konnte gezeigt werden, dass eine Erfassung der mikrobiellen Aktivität mit dem Bioaktivitätssensor und dem

potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystem möglich ist. In den folgenden Versuchen wurde die Anwendung der elektrochemischen Methoden zur Bestimmung der Aktivität in der biologischen Abwasserbehandlung untersucht.

Zur Beurteilung der Abbauleistung der Mikroorganismen in den Laborkläranlagen wurden die Substrate nach 4.2.11 auf ihre Zusammensetzung hinsichtlich der Kohlenstoff- und Stickstoffkomponenten untersucht (Tabelle 5-5).

Tabelle 5-5: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers

Parameter	Konzentration in mg L ⁻¹	
	Abwasser nach DIN	modifiziertes Abwasser
TOC	129	128
DOC	127	118
CSB	320	330
N _{Gesamt}	49	66
NH ₄ -N	1	32
NO ₃ -N	8	3
NO ₂ -N	0	0

Der Mittelwert für die CSB-Konzentration für kommunales Abwasser liegt laut Hartmann bei Oxidation mit Kaliumdichromat bei 300 mg L⁻¹ und für den DOC zwischen 50 - 150 mg L⁻¹ (HARTMANN 1983). Die gemessenen Werte von 320 bzw. 330 mg L⁻¹ für die CSB-Konzentration und für den DOC von 127 bzw. 118 mg L⁻¹ stimmen mit den von Hartmann angegebenen Werten überein. Oxidierter Stickstoff in Form von Nitrat und Nitrit befindet sich laut Bever meist nicht im häuslichen Abwasser (BEVER et al. 1993). In dem synthetischen Abwasser wurden nur geringe Mengen an Nitrat-Stickstoff und kein Nitrit-Stickstoff nachgewiesen. Hinsichtlich dieser Größen stellen die verwendeten Substrate damit geeignete Modellsubstrate dar.

Der wesentliche Unterschied zwischen den eingesetzten Substraten besteht in der Konzentration an Ammonium, in dem Abwasser nach DIN waren nur geringe Konzentrationen an NH₄N nachzuweisen. Von Moser wurden charakteristische Werte von 55 mg Gesamtstickstoff und 32 mg NH₄N pro Liter für kommunales Abwasser angegeben (MOSER 2000). Die Umsetzung des Harnstoffes zu Ammonium, welche in der Praxis in der Kanalisation abläuft, fand in dem Vorratstank in einem nicht ausreichenden Umfang statt. In dem modifizierten

Abwasser wurde dagegen eine Konzentration von $32 \text{ mg NH}_4\text{N L}^{-1}$ gemessen, dies entspricht dem charakteristischen Wert für das kommunale Abwasser.

Damit stellt das modifizierte Abwasser hinsichtlich des Gehaltes an Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen eine geeignete Modellschubstanz dar. In den weiteren Untersuchungen wurden je nach Zielstellung beide Substrate eingesetzt.

5.3.1 Detektion der Aktivität der aeroben, heterotrophen Biomasse

5.3.1.1 Startphase eines kontinuierlichen Versuches

Die Startphase eines Versuches in der Laborkläranlage nach 4.3.7 zeigt die Abbildung 5-23. Dargestellt sind das BAS-Signal, der CSB im Reaktor (die Proben wurden durch einen Filter mit $0,45 \text{ }\mu\text{m}$ Durchmesser filtriert), die Biotrockenmasse, die Sauerstoffzehrung, das Redoxpotential und der pH-Wert. Es wurden die aerobe Stufe der Modellkläranlage II ohne die vorgeschaltete Denitrifikationsstufe und das Abwasser nach DIN eingesetzt.

Die Anlage wurde kontinuierlich mit 10 L d^{-1} beschickt und der Sauerstoffgehalt auf Konzentrationen zwischen $2,0 - 2,3 \text{ mg L}^{-1}$ geregelt. Das Inokulum stammte aus der Kläranlage Frankfurt-Niederrad. Eingesetzt wurden $1,5 \text{ Liter}$ Belebtschlamm und der Reaktor anschließend mit dem Substrat aufgefüllt.

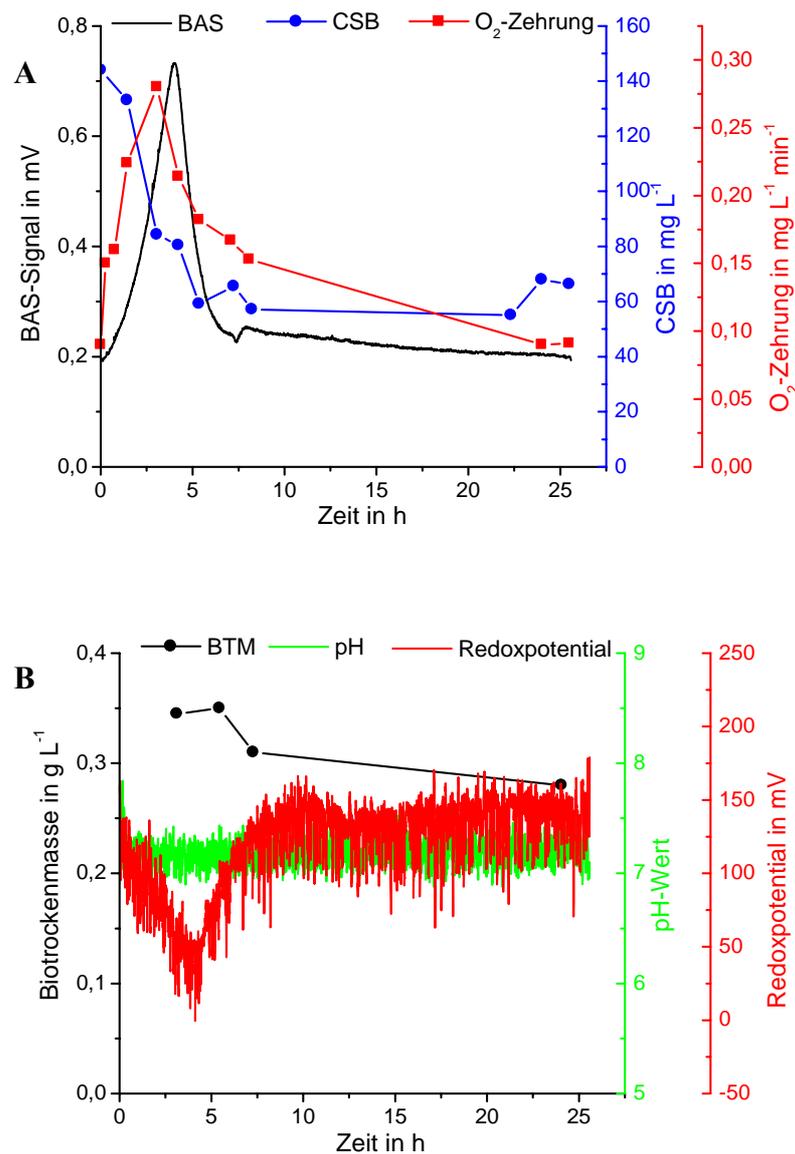


Abbildung 5-23: Darstellung einer Startphase in der Laborkläranlage II

Das Signal des BAS begann direkt nach dem Animpfen des Versuches bei $t = 0$ h zu steigen, gleichzeitig waren auch ein Anstieg der Sauerstoffzehrung und ein Abbau an CSB zu erkennen. Der schnelle Abbau an Substrat deutete darauf hin, dass der Belebtschlamm aus der kommunalen Kläranlage keine Adaptionszeit an das Substrat benötigte. Das Maximum des BAS-Signals war nach 4 h erreicht, dagegen war die maximale Sauerstoffzehrung bei 3,1 h zu erkennen. Nach ca. 5 h war der CSB bis auf ca. 60 mg L^{-1} abgebaut, die Sauerstoffzehrung betrug ca. $0,1 \text{ mg L}^{-1} \text{ min}^{-1}$ und das BAS-Signal $0,2 \text{ mV}$. Im weiteren Verlauf des Versuches blieben die Signale konstant, die Laborkläranlage befand sich in einem Fließgleichgewicht. Die Signale des BAS und die Sauerstoffzehrung zeigten während des Versuches vergleichbare Verläufe, wobei die Sauerstoffzehrung zu einem früheren Zeitpunkt den maximalen Wert

erreichte. Die Biotrockenmasse änderte sich während des Versuches nur geringfügig und betrug ca. $0,3 \text{ g L}^{-1}$. Der pH-Wert blieb ebenfalls angenähert konstant, dagegen sank wie erwartet das Redoxpotential während der Startphase des Versuches deutlich ab.

Sobald sich die Modellkläranlagen in einem Fließgleichgewicht hinsichtlich des Substratabbaus und des BAS-Signals befanden, konnten Änderungen im Zulauf der Anlage durch Puls- und Sprungexperimente durchgeführt werden und damit die entsprechenden Änderungen der mikrobiellen Aktivität des Belebtschlammes mit dem Bioaktivitätssensor untersucht werden.

5.3.1.2 Sprungsignale

Zur Charakterisierung des Einflusses der Aufenthaltszeit des zufließenden Abwassers in der Kläranlage wurden in der aeroben Stufe verschiedene Verweilzeiten eingestellt und die resultierenden BAS-Signale aufgezeichnet. Die Untersuchungen wurden in der Laboranlage II ohne Denitrifikationsstufe durchgeführt. Der Sauerstoffgehalt wurde auf $2,0 - 2,3 \text{ mg L}^{-1}$ geregelt. Wenn sich die Anlage in einem Fließgleichgewicht befand, wurde eine neue Verweilzeit eingestellt. Neben dem BAS-Signal wurde das Redoxpotential und der pH-Wert online erfasst, offline wurden die Sauerstoffzehrung und die Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff im Belebungsbecken gemessen. Die Abbildung 5-24 und Abbildung 5-25 zeigen einen Versuch, bei dem der Abwasserzulauf von 8 L d^{-1} auf $24,8 \text{ L d}^{-1}$ erhöht worden ist.

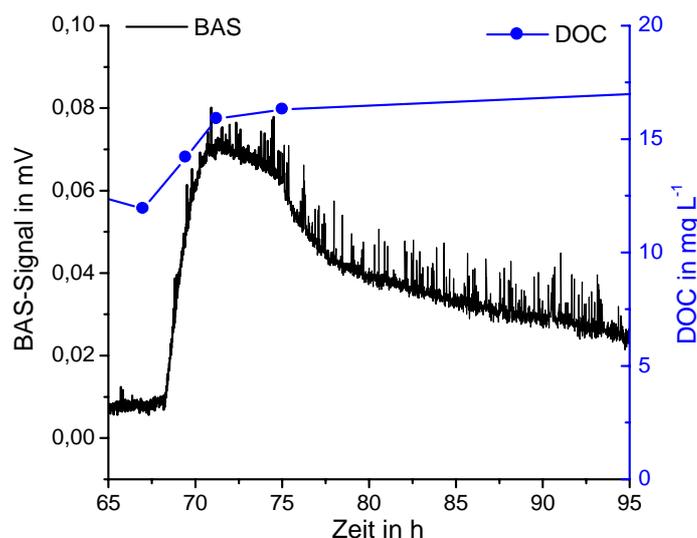


Abbildung 5-24: BAS-Signal und DOC bei Übergang von $\tau = 0,62 \text{ d}$ nach $\tau = 0,2 \text{ d}$ bei $t = 68,1 \text{ h}$

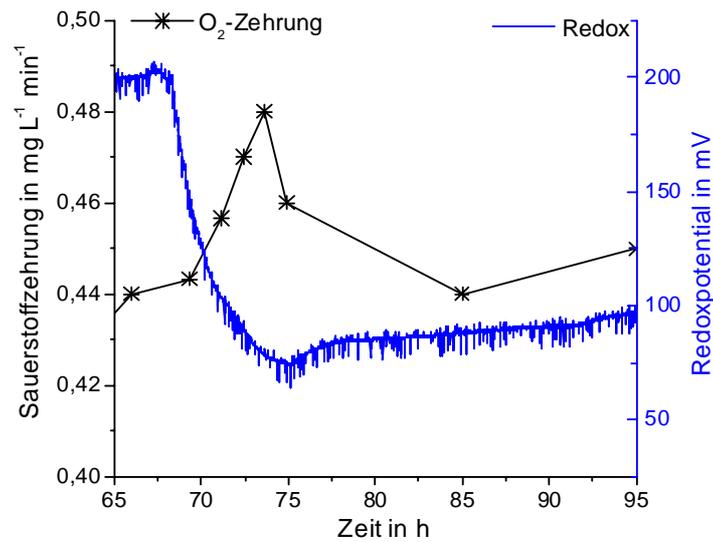


Abbildung 5-25: Sauerstoffzehrung und Redoxpotential bei Übergang von $\tau = 0,62$ d nach $\tau = 0,2$ d bei $t = 68,1$ h

Nach der Erhöhung des Zulaufs von 8 L d^{-1} auf $24,8 \text{ L d}^{-1}$ stieg das Signal des BAS von $8 \mu\text{V}$ stark an und erreichte einen maximalen Wert von $70 \mu\text{V}$. Im weiteren Verlauf fiel das Signal wieder ab und es stellte sich ein neuer Fließgleichgewichtszustand bei $22 \mu\text{V}$ ein. Die Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff stieg in dem Reaktor von 12 auf 16 mg L^{-1} geringfügig an. Es zeigte sich, dass die Biomasse in der Lage war, die erhöhte Substratzufuhr nahezu komplett umzusetzen. Die Sauerstoffzehrung stieg in diesem Versuch ebenfalls an und zeigte einen nahezu parallelen Verlauf zu den Signalen des BAS. Nach der Änderung der Zulaufbedingungen fiel das Redoxpotential von 200 mV auf 75 mV ab und stieg im Weiteren wieder auf 90 mV an.

In der Abbildung 5-26 sind die Werte für das BAS-Signal, die Sauerstoffzehrung, die Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff und das Redoxpotential im Fließgleichgewicht als Funktion der Verweilzeit dargestellt.

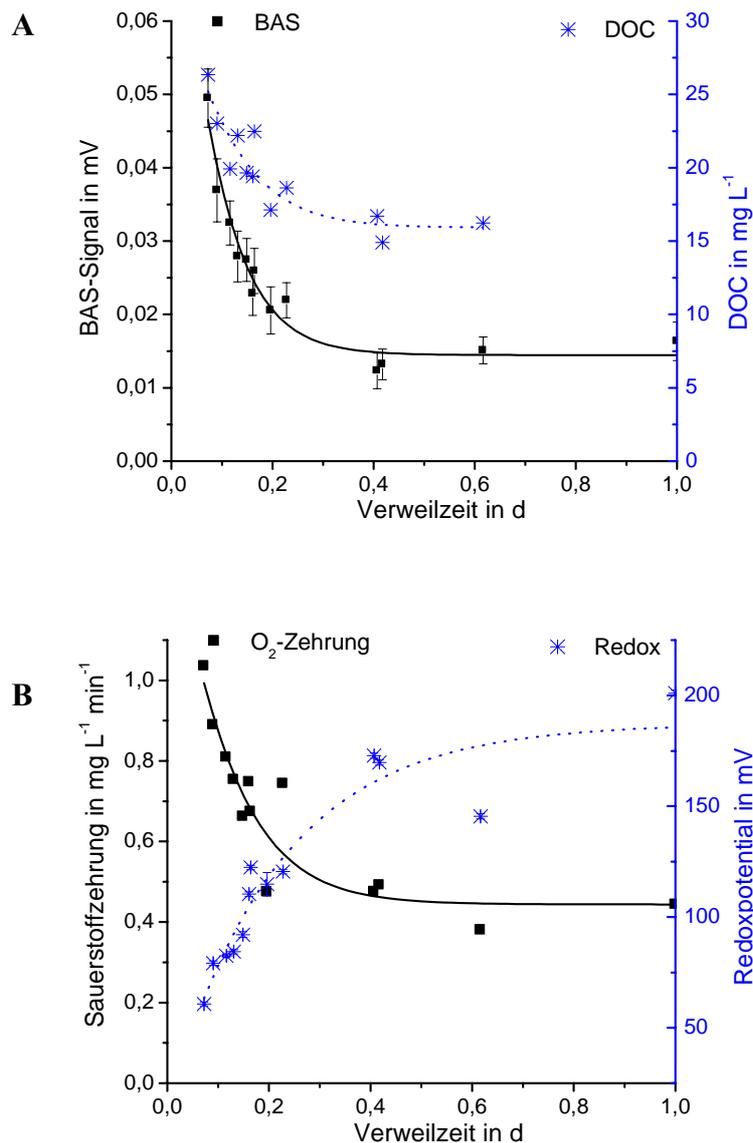


Abbildung 5-26: BAS-Signal, Sauerstoffzehrung, DOC und Redoxpotential als Funktion der Verweilzeit

Es zeigte sich für die Signale ein vergleichbarer Kurvenverlauf, bei hohen Aufenthaltszeiten in dem Reaktor waren die Signale unabhängig von der Verweilzeit und bei kurzen Verweilzeiten waren die Signale linear abhängig von dem Substrat-Feeding und damit der Verweilzeit in der Laborkläranlage. Für das Signal des BAS betrug der konstante Bereich $\tau = 0,4 - 1,0$ d und änderte sich ab einer Verweilzeit von 0,2 d linear mit dem Abwasserzulauf.

5.3.1.3 Pulssignale

Durch Stoßdosierungen sollte der Einfluss eines zusätzlichen Substrates auf die mikrobielle Aktivität untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden in der kontinuierlich betriebenen Laborkläranlage I mit dem Abwasser nach DIN durchgeführt. Nachdem sich ein Fließgleich-

gewichtszustand ausgebildet hatte, wurde das 200fache Abwasserkonzentrat als zusätzliches Substrat zudosiert. Die Tabelle 5-6 zeigt die Zeitpunkte der Dosierungen, die Volumina an zudosierter Substratlösung sowie die entsprechenden zusätzlichen CSB-Belastungen in dem Belebungsbecken. In der Abbildung 5-27 A sind die Dosierungen der verschiedenen Substratvolumina in das Belebungsbecken der Laborkläranlage dargestellt, gemessen wurde neben dem BAS-Signal die Konzentration an gelösten Kohlenstoffverbindungen in dem Reaktor.

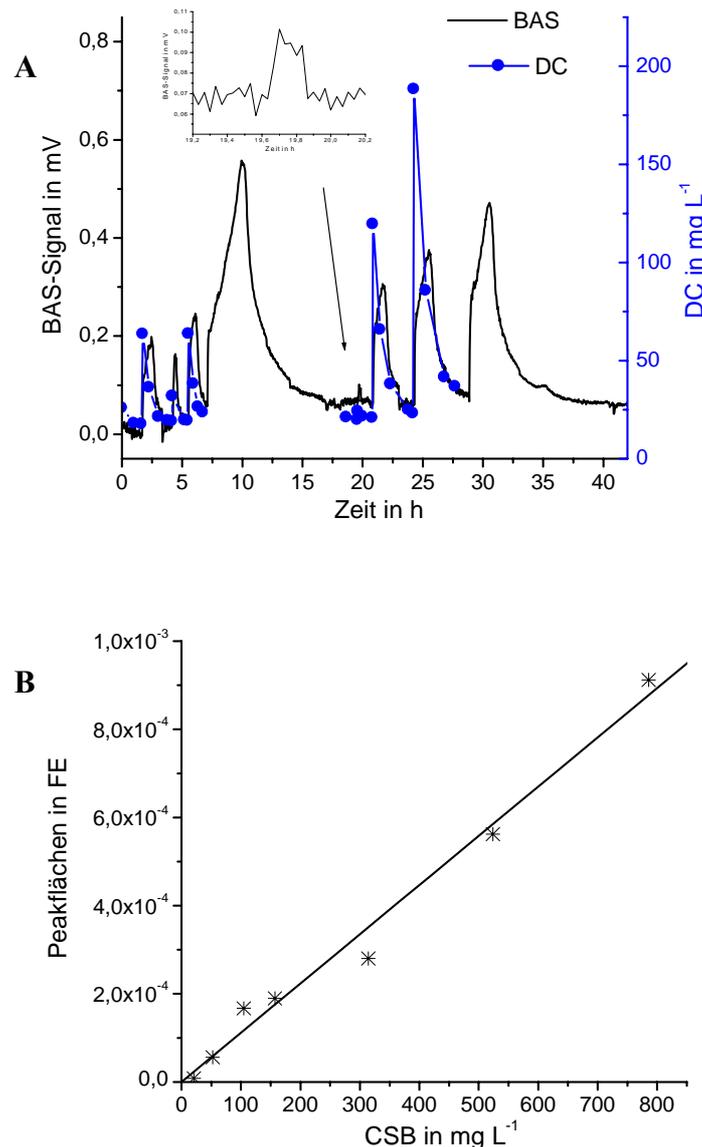


Abbildung 5-27: A - Verlauf des BAS-Signals und der Konzentration an gelösten Kohlenstoffverbindungen nach der Stoßdosierung verschiedener Volumina eines Abwasserkonzentrates (der Ausschnitt zeigt die Dosierung von 2 mL des Abwasserkonzentrates), B - Zusammenhang zwischen dem CSB des zudosierten Substrats und der Peakfläche (Geradengleichung; Peakfläche [FE] = $1,12 \cdot 10^{-6} \cdot \text{CSB} [\text{mg L}^{-1}]$, mit $R^2 = 0,99$ und einer Standardabweichung von $4,0 \cdot 10^{-6}$)

Tabelle 5-6: Zeitpunkt und Volumen der Dosierung des Abwasserkonzentrates sowie CSB im Reaktor nach der Dosierung

Zeitpunkt der Dosierung in h	Volumen des Abwasser-Konzentrates in mL	CSB der Dosierung in mg L ⁻¹
1,6	15	155
4,2	5	52
5,5	10	103
7,1	100	1032
19,6	2	21
20,8	30	310
24,2	50	516
28,8	75	774

Nach den Substratdosierungen stieg das BAS-Signal in Folge der erhöhten mikrobiellen Aktivität stark an. Zu dem Zeitpunkt, an dem die Substratkonzentration wieder den Startwert erreichte, fiel das BAS-Signal jeweils wieder auf annähernd das Ausgangssignal ab. Die Änderungen des BAS-Signals korrelierten dabei hinsichtlich der Peakhöhe, der Zeitdauer, bis das Signal wieder seinen Startwert erreichte, und der Peakfläche mit der zudosierten CSB-Konzentration. In der Abbildung 5-27 B sind die integrierten Peakflächen gegen die Konzentration an zudosiertem CSB aufgetragen. Es zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen diesen Größen; die Steigung der Geraden betrug $1,12 \cdot 10^{-6}$ Flächeneinheiten pro mg CSB L⁻¹. Das bedeutet, dass die Änderungen des BAS-Signals proportional zum angebotenen Substrat und damit auch zum Substratabbau pro Zeiteinheit waren. Mit diesen Versuchen konnte auch eine Aussage über die Nachweisgrenze zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität unter Berücksichtigung der Ergebnisse zur elektronischen Charakterisierung des BAS (5.1.1) getroffen werden, eine Dosierung von 2 mL des 200fachen Abwasserkonzentrates konnte eindeutig nachgewiesen werden (siehe Vergrößerung in der Abbildung 5-27 A), diese Dosierung entspricht einer Belastung von lediglich 21 mg O₂ L⁻¹.

5.3.1.4 Vergleich des Abbaus verschiedener Substrate

Durch die Dosierung von unterschiedlich gut abbaubaren Substraten in das Belebungsbecken der Laborkläranlage I sollten die Auswirkungen auf die mikrobielle Aktivität und damit auf die Signale des Bioaktivitätssensors untersucht werden. Die Laborkläranlage I wurde dazu kontinuierlich mit 10 L d⁻¹ an Abwasser nach DIN beschickt. Sobald sich die Anlage in einem

Fließgleichgewicht befand, wurden die Substrate Glucose, Methanol, Ethylenglycol und iso-Propanol zudosiert. Um vergleichbare Ausgangsbedingungen zu gewährleisten, wurden die eingesetzten Mengen an Substrat nach Formel 5-10 bzw. Formel 5-11 berechnet, dabei wurde ausgenutzt, dass bei reinen Stoffen der CSB berechnet werden kann. Für einen Stoff mit der Summenformel $C_cH_hCl_{cl}N_nNa_{na}O_oP_pS_s$ und dem Molekulargewicht M gilt die folgende Formel (BAUMANN 1994):

$$CSB_{\text{theo.}} = \frac{16(2c + \frac{1}{2}(h - cl - 3n) + 3s + \frac{5}{2}p + \frac{1}{2}na - o)}{M}$$

Formel 5-10: Berechnung des CSB

Für Substanzen, die lediglich Kohlen-, Wasser- und Sauerstoff enthalten, vereinfacht sich die Formel zu:

$$CSB_{\text{theo.}} = \frac{16(2c + \frac{1}{2}h - o)}{M}$$

Formel 5-11: Vereinfachte Formel zur Berechnung des CSB

Es sollten jeweils 20 g CSB in den Reaktor dosiert werden, dies entspricht einer CSB-Konzentration von 3220 mg L^{-1} . Die Tabelle 5-7 gibt für die ausgewählten Substanzen die entsprechenden Werte wieder und die Abbildung 5-28 A zeigt das Ergebnis der entsprechenden Dosierungen.

Tabelle 5-7: Berechnung des theoretischen CSB für Glucose, Methanol, Ethylenglycol und iso-Propanol

	Glucose	Methanol	Ethylenglycol	iso-Propanol
Summenformel	$C_6H_{12}O_6$	CH_3OH	$C_2H_6O_2$	C_3H_7OH
c	6	1	2	3
h	12	4	6	8
O	6	1	2	1
M in g mol^{-1}	180	32	62	60,1
CSB in $\text{g Sauerstoff g Testsubstanz}^{-1}$	1,07	1,5	1,29	2,4
m in g	18,8	13,3	15,5	8,3
Dichte in g mL^{-1}		0,79	1,113	0,78
V in mL		16,8	13,9	10,64

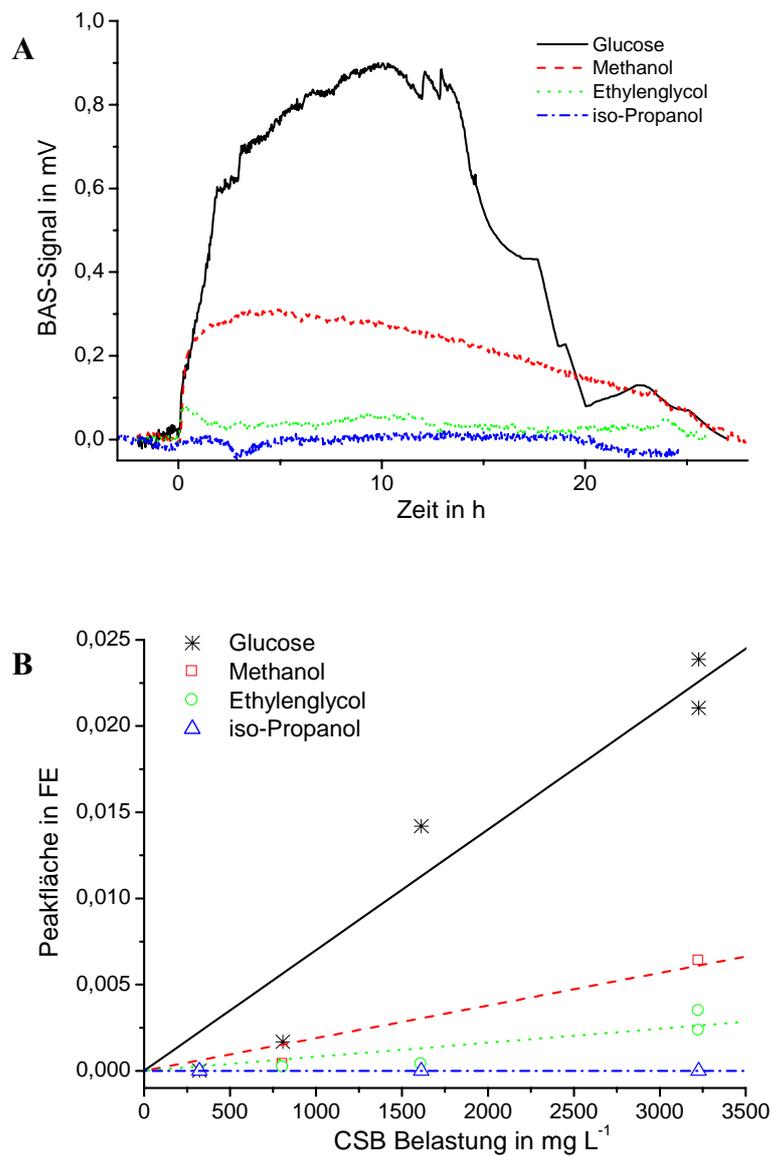


Abbildung 5-28: A - BAS-Signale nach Dosierung von 20 g CSB_{theo.} der Substrate, B - Zusammenhang zwischen dem CSB und den resultierenden Peakflächen (die entsprechenden Gleichungen der Regressionsgeraden sind in der Tabelle 5-8 angegeben, R² war jeweils > 0,93)

Es zeigten sich nach der Dosierung der Substrate unterschiedliche Auswirkungen auf die Signale des BAS. Glucose und Methanol bewirkten eine deutliche Änderung, Ethylenglycol zeigte eine vergleichsweise geringe Wirkung und nach der Dosierung des Propanols war keine signifikante Änderung des BAS-Signals zu registrieren (HOLTMANN und SELL 2002). Durch die Dosierung von verschiedenen CSB-Belastungen konnte für die untersuchten, abbaubaren Substanzen jeweils ein Zusammenhang zwischen den Peakflächen des BAS und der zudosierten CSB-Belastung dargestellt werden (Abbildung 5-28 B). In der Tabelle 5-8 sind die resultierenden Geradengleichungen und die Nachweisgrenzen für die Änderun-

gen der mikrobiellen Aktivität dargestellt. Bei der Bestimmung der Nachweisgrenze wurde von einer minimal nachweisbaren Peakfläche von $5 \cdot 10^{-5}$ Flächeneinheiten (FE) ausgegangen, diese Peakfläche wurde in der Abbildung 5-27 eindeutig nachgewiesen.

Tabelle 5-8: Vergleich des Abbaus verschiedener Substrate

Substanz	Geradengleichung	Nachweisgrenze	
		in mg CSB L ⁻¹	in mg Substanz L ⁻¹
Glucose	Peakfläche = $7 \cdot 10^{-6} \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	7,1	6,6
Methanol	Peakfläche = $1,9 \cdot 10^{-6} \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	26,3	17,5
Ethylenglycol	Peakfläche = $8,1 \cdot 10^{-7} \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	61,7	47,8
2-Propanol	Peakfläche = $0 \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	-	-

5.3.1.5 BAS-Signal als Funktion der Zellzahl

Wie bereits bei dem Modellorganismus *E. coli* erläutert (siehe 5.2.4), ist das Signal für die mikrobielle Aktivität ein Summenparameter, der einerseits von der Anzahl der Mikroorganismen und andererseits von der Aktivität der einzelnen Zellen abhängt. Diese Feststellung gilt analog für vergleichbare Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität. Guwy stellt zum Beispiel für die Sauerstoffaufnahme fest, dass diese eine Funktion der Zellzahl und der spezifischen Atmungsaktivität sei (GUWY et al. 1998).

Die Untersuchungen zum Einfluss der Zellmasse bzw. -zahl auf die Signale des BAS wurden in der aeroben Stufe der Laborkläranlage II im kontinuierlichen Betrieb bei einer Feedingrate von 10 L DIN-Abwasser pro Tag durchgeführt. In dem Belebungsbecken wurden verschiedene Biomassekonzentrationen durch den Abzug von Belebtschlamm aus der Laborkläranlage oder Zudosierung von Belebtschlamm aus der Abwasserreinigungsanlage Frankfurt-Niederrad eingestellt. Nachdem sich ein Fließgleichgewicht eingestellt hatte, wurden drei Dosierungen des 200fachen Abwasserkonzentrates (500 µL, 1 mL und 2 mL) in das Belebungsbecken durchgeführt. Die Abbildung 5-29 zeigt die Signalverläufe des BAS nach der Dosierung von jeweils 2 mL Substrat bei $t = 0$ h in das Belebungsbecken bei Biomassekonzentrationen von 0,68 bis 2,50 g L⁻¹.

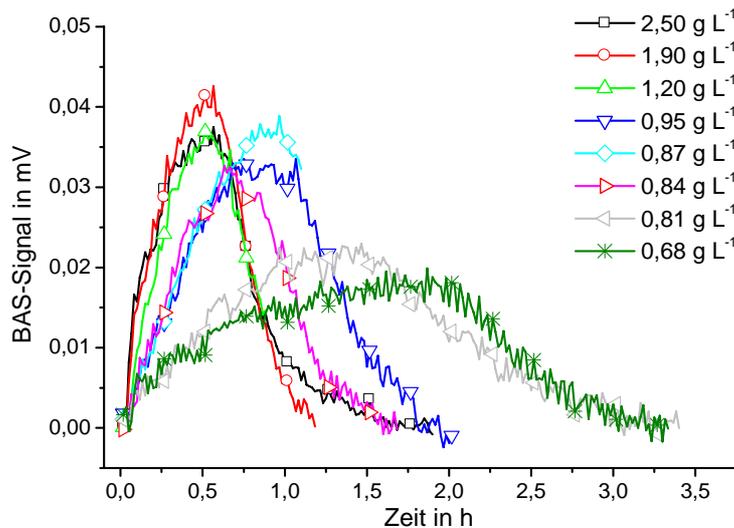


Abbildung 5-29: Signale nach der Dosierung von 2 mL Substrat in das Belebungsbecken in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration

Die Peakform änderte sich in Abhängigkeit von den Biomassekonzentrationen im Belebungsbecken. Je geringer die Konzentration an Biomasse war, um so flacher war der Peakverlauf. Dies wurde besonders deutlich bei den geringen Biomassekonzentrationen, so betrug bei $X = 2,50 \text{ g L}^{-1}$ die Peak-Halbwertsbreite 0,7 h und bei $X = 0,68 \text{ g L}^{-1}$ 1,9 h. Gleichzeitig war zu beobachten, dass bei hohen Biomassekonzentrationen das maximale Signal des BAS höher war als bei niedrigeren Konzentrationen an Biomasse.

Während der Versuche wurde mit einer online Sonde (Photometer 662, Fa. Metrohm, Filderstadt) die Änderung der Trübung als Parameter der Biomassekonzentration gemessen. Es zeigte sich, dass die Biomassekonzentration während der Substratdosierungen konstant blieb. Dies bedeutet, dass die Änderungen des BAS-Signals während dieser Untersuchungen auf eine Änderung der Aktivität der vorhandenen Biomasse zurückzuführen waren und nicht auf eine Zunahme der Zellzahl bzw. -masse. Diese Aussage ist auch unter Berücksichtigung einer maximalen Wachstumsrate der heterotrophen Biomasse von $\mu_{\max} = 4 \text{ d}^{-1}$ bzw. $\mu_{\max} = 0,17 \text{ h}^{-1}$ (nach Tabelle 3-3) und einer entsprechenden Generationszeit von 6 h zu erklären, da in einem Testzeitraum von ca. 3 h selbst unter optimalen Bedingungen keine signifikante Zunahme der Biomasse zu erwarten war. Die Abbildung 5-30 zeigt die Halbwertsbreiten der Peaks und die Peakflächen nach der Substratdosierung in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration.

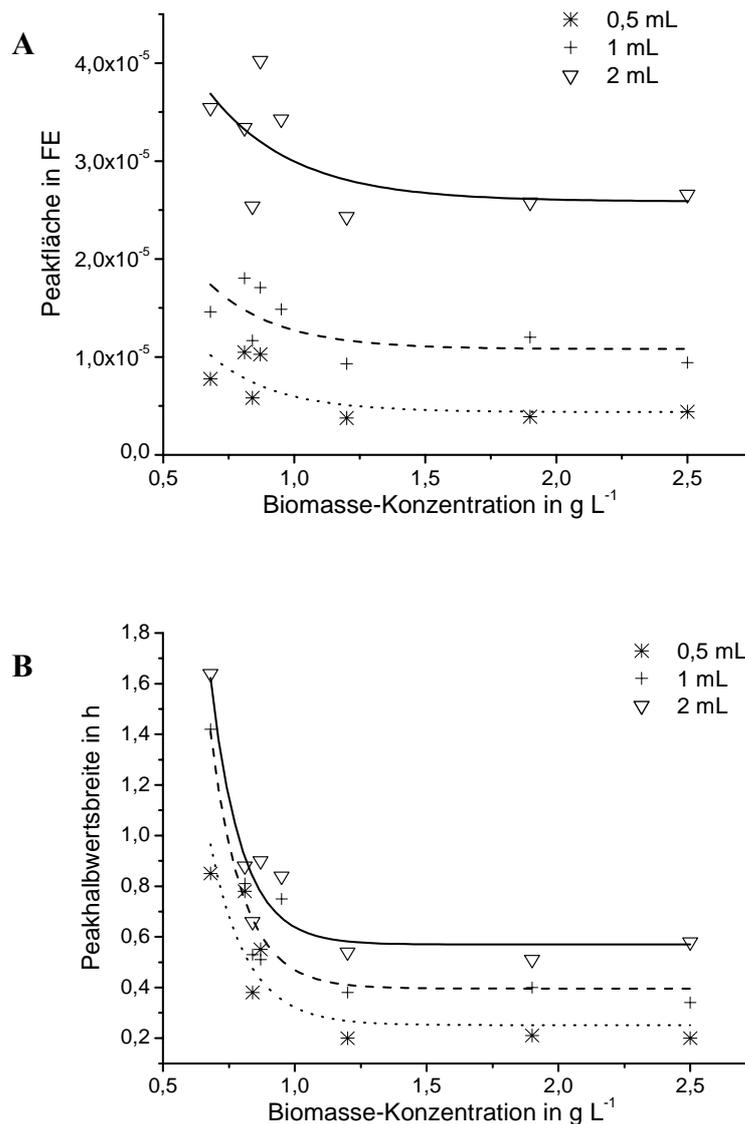


Abbildung 5-30: Peakfläche und Peakhalbwertsbreite nach der Dosierung von Substraten als Funktion der Biomassekonzentration im Belebungsbecken (für die grafische Darstellung erfolgte eine Anpassung an eine exponentielle Abnahme 1. Ordnung)

Es zeigte sich bei Biomassekonzentrationen von 2,5 bis $1,0 g L^{-1}$ eine nahezu konstante Peakfläche bei den entsprechenden Substratdosierungen. Bei geringeren Biomassekonzentrationen war dagegen ein Anstieg der Peakflächen zu erkennen. Für die Peakhalbwertsbreiten ergab sich eine vergleichbare Aussage, bis zu einer Biomassekonzentration von $1 g L^{-1}$ waren die Halbwertsbreiten nahezu konstant und stiegen dann bei niedrigeren Biomassekonzentrationen an. Aus den dargestellten Ergebnissen lassen sich auch Aussagen bezüglich einer Korrelation zwischen dem BAS-Signal und der Biomassekonzentration treffen. Die Abbildung 5-31 zeigt den Anstieg des BAS-Signals innerhalb von 10 min nach der Substratdosierung als Funktion der Biomasse.

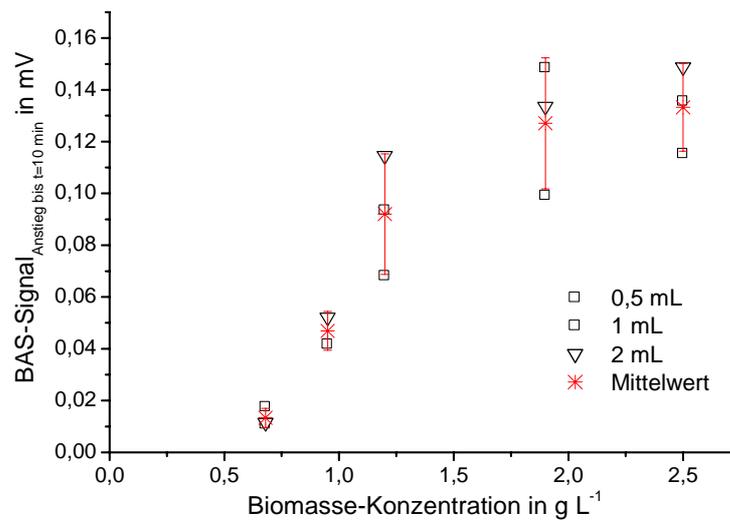


Abbildung 5-31: Anfangsanstieg des BAS 10 min nach Substratdosierungen als Funktion der Biomasse

Hier zeigte sich, dass der Anfangsanstieg des BAS von der Biomassekonzentration abhängig war, mit steigendem Gehalt an Biomasse stieg auch die Geschwindigkeit, mit der das Signal des BAS zunahm. Bei höheren Biomassekonzentrationen blieb diese Geschwindigkeit dagegen konstant, hier war ein maximaler Anstieg des BAS-Signals erreicht.

5.3.1.6 Vergleich zwischen dem BAS-Signal und der Sauerstoffzehrung sowie der Dehydrogenaseaktivität

Zur Darstellung des Vergleichs zwischen der Aktivitätsbestimmung mit dem Bioaktivitätssensor und der Sauerstoffzehrung wurden Untersuchungen in der kontinuierlich betriebenen Laborkläranlage I durchgeführt, die Feedingrate an DIN-Abwasser betrug 10 L d^{-1} . Die Bestimmung der Sauerstoffzehrung erfolgte offline nach 4.3.3.9. Sobald sich die Anlage in einem Fließgleichgewicht befand, wurden verschiedene Volumina des Abwasserkonzentrats zudosiert und die Änderungen der Aktivitätsparameter verfolgt (Abbildung 5-32).

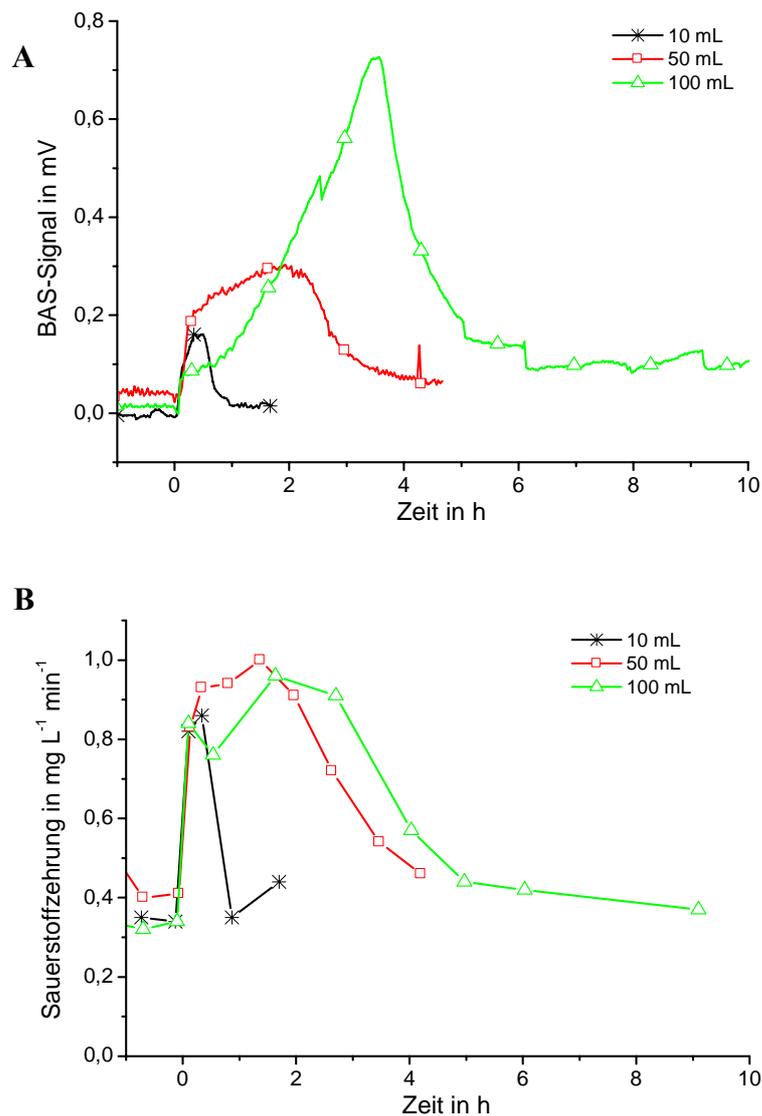


Abbildung 5-32: Vergleich zwischen dem BAS-Signal und der Sauerstoffzehrung nach Substratdosierung

Die Aktivitätsparameter wiesen qualitativ vergleichbare Verläufe auf, nach der Dosierung des Substrates stiegen die Signale jeweils an und erreichten zu einem vergleichbaren Zeitpunkt angenähert wieder das Ausgangsniveau. Dagegen waren zwischen den Aktivitätssignalen deutliche Unterschiede in dem quantitativen Verlauf zu erkennen. Die BAS-Signale stiegen ab einer Dosierung von 50 mL Substratlösung während der Versuche weiter an, die Sauerstoffzehrung blieb dagegen nach einem ersten Anstieg auf einem nahezu konstanten Wert. Dies bedeutet, dass die Mikroorganismen während des Versuchs den Sauerstoff mit einer konstanten Geschwindigkeit verbrauchten, aber der Umsatz an reduzierten Stoffwechselintermediaten an der Anode des BAS zunahm. Das Signalmaximum des BAS erhöhte sich mit der Substratdosierung, dagegen war das Maximum der Sauerstoffzehrung bei den drei Versuchen bei ca. $0,9 \text{ mg L}^{-1} \text{min}^{-1}$ vergleichbar. Zwischen den Aktivitätsparametern ergab sich

damit in dieser Untersuchung keine direkte Umrechnung zwischen den Werten, obwohl beide Parameter eine Aussage über den Substratabbau erlaubten.

Die Korrelation zwischen der Dehydrogenaseaktivität und dem BAS-Signal wurde mittels Puls- und Shift-Tests untersucht. Die Abbildung 5-33 A zeigt das BAS-Signal und die Aktivität der Dehydrogenasen nach der Dosierung von 50 mL Abwasserkonzentrat in das Belebungsbecken der Laborkläranlage I während des kontinuierlichen Betriebs.

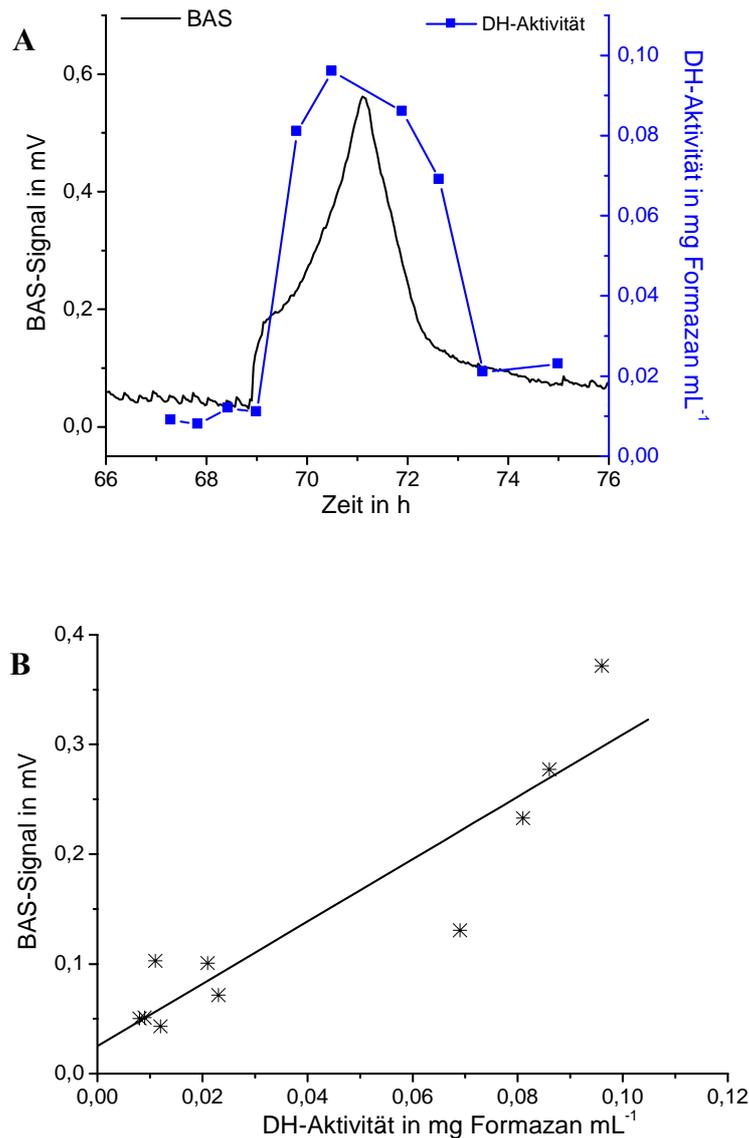


Abbildung 5-33: A - Darstellung des BAS-Signals und der Dehydrogenaseaktivität nach der Substratdosierung bei $t = 68,8$ h, B - BAS-Signal als Funktion der Dehydrogenaseaktivität

Nach der Substratdosierung stieg sowohl das BAS-Signal als auch die Aktivität der Dehydrogenasen an. Die Signale blieben für ca. 4 h auf einem erhöhten Niveau. Im weiteren Verlauf erreichten sie wieder den Ausgangswert. In der Abbildung 5-33 B ist das BAS-Signal als

Funktion der Dehydrogenaseaktivität dargestellt, es ergab sich ein linearer Zusammenhang (Bestimmtheitsmaß $R^2 = 0,85$ und eine Standardabweichung von $4,6 \cdot 10^{-5}$) zwischen diesen Größen, wobei nach der linearen Regression noch ein BAS-Signal gemessen werden kann, wenn die Dehydrogenaseaktivität den Wert Null erreicht.

Zur weiteren Untersuchung der Beziehung zwischen der Aktivität der Dehydrogenasen und dem Signal des Bioaktivitätssensors wurde die Laborkläranlage I kontinuierlich betrieben und verschiedene Verweilzeiten des Abwassers eingestellt und die Aktivitätssignale im Fließgleichgewicht bestimmt. Die Untersuchungen wurden in dem Verweilzeitbereich von 0,28 – 0,56 d durchgeführt. Mit kürzeren Verweilzeiten des Abwassers und damit einem höheren Substratangebot stiegen die Aktivitätsparameter erwartungsgemäß an. Die Änderungen der Aktivitätsparameter lassen sich in dem untersuchten Bereich mit den folgenden Geradengleichungen als Funktion der Verweilzeit beschreiben (Formel 5-12).

$$\text{BAS-Signal [mV]} = -0,34 \left[\frac{\text{mV}}{\text{d}} \right] \cdot \tau[\text{d}] + 0,29 [\text{mV}]$$

$$\text{DH-Aktivität} \left[\frac{\text{mg}_{\text{Formazan}}}{\text{mL}} \right] = -0,44 \left[\frac{\text{mg}_{\text{Formazan}}}{\text{mL} \cdot \text{d}} \right] \cdot \tau[\text{d}] + 0,33 \left[\frac{\text{mg}_{\text{Formazan}}}{\text{mL}} \right]$$

Formel 5-12: BAS-Signal und Dehydrogenaseaktivität als Funktion der Verweilzeit

5.3.1.7 Einfluss des Sauerstoffes auf das Signal des Bioaktivitätssensors

Im Rahmen dieser Untersuchung sollte der Einfluss des Parameters Sauerstoff auf das BAS-Signal untersucht werden. Zur Bestimmung eines Einflusses des gelösten Sauerstoffes wurde bei konstanten Zulaufbedingungen die Konzentration an Sauerstoff im Belebungsbecken zwischen $0,0 - 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ geregelt. Diese Untersuchungen wurden in der aeroben Stufe der Laborkläranlage II bei einem Durchfluss von 10 L DIN-Medium pro Tag durchgeführt. Der Reaktor wurde mit 1 L Belebtschlamm aus der ARA (Abwasserreinigungsanlage) Frankfurt-Sindlingen angeimpft. Eine Änderung der Sauerstoffkonzentration erfolgte jeweils, nachdem sich ein Fließgleichgewichtszustand eingestellt hatte. In der Abbildung 5-34 ist der Verlauf des BAS-Signals und des Redoxpotentials als Funktion der Sauerstoffkonzentration dargestellt.

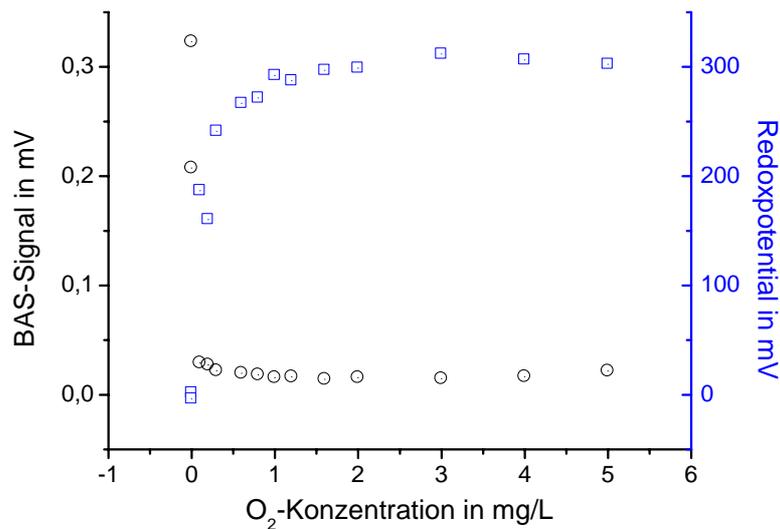


Abbildung 5-34: BAS-Signal und Redoxpotential in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration

Es zeigte sich, dass das BAS-Signal bei einer Sauerstoffkonzentration von $0,5 - 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ konstant bei $15 \text{ } \mu\text{V}$ war. Wenn die Konzentration an Sauerstoff weiter verringert wurde, stieg das Signal langsam an. Wenn allerdings in dem Reaktor anaerobe Bedingungen herrschten, stieg das BAS-Signal stark an und erreichte Werte von $330 \text{ } \mu\text{V}$. Da hier allerdings kein vollständiger Kohlenstoffabbau mehr stattfand, wurde nicht die Einstellung eines neuen Fließgleichgewichtes abgewartet, es kann davon ausgegangen werden, dass das BAS-Signal weiter gestiegen wäre.

Das Redoxpotential zeigte einen entsprechenden reziproken Verlauf. Bei Sauerstoffkonzentrationen von $1,0 - 5,0 \text{ mg L}^{-1}$ betrug das Redoxpotential nahezu konstant 300 mV gegen Ag/AgCl . Bei Konzentrationen kleiner als $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ begann das Potential stark zu fallen und hatte unter anaeroben Bedingungen einen minimalen Wert von $E_{\text{H}} = 0 \text{ mV}$. Das Redoxpotential hätte in einem Fließgleichgewichtszustand einen niedrigeren Wert angenommen, es gelten hier die oben getroffenen Ausführungen.

5.3.2 Bestimmung der Aktivität der Nitrifikanten

Als weitere mikrobielle Aktivität, die bei der Abwasserreinigung wichtig ist, wurde die Nitrifikation untersucht. In den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit sich auch die Aktivität der autotrophen Nitrifikanten mit dem Bioaktivitätssensor detektiert lässt.

Für diese Untersuchungen wurde die Laborkläranlage I mit einem Medium nach 4.2.12 und einem Inokulum aus der zweiten Stufe der ARA Frankfurt-Niederrad betrieben. Die Labor-

kläranlage wurde mit einem Feeding von 5 L Nitrifikationsmedium pro Tag kontinuierlich beschickt. Da die Nitrifikanten stark pH-Wert empfindlich sind, wurde der pH-Wert bei diesen Versuchen auf 8,3 geregelt. Nachdem sich die Anlage in einem Fließgleichgewicht befand, wurden die Auswirkungen von Substratdosierungen auf die Aktivität der nitrifizierenden Organismen untersucht. Abbildung 5-35 A zeigt den Verlauf des BAS-Signals und die Konzentrationen an Ammonium sowie Nitrit nach einer Dosierung von 210 mg Ammonium-Stickstoff und die Abbildung 5-35 B die entsprechenden Signale nach der Dosierung von 185 mg Nitrit-Stickstoff.

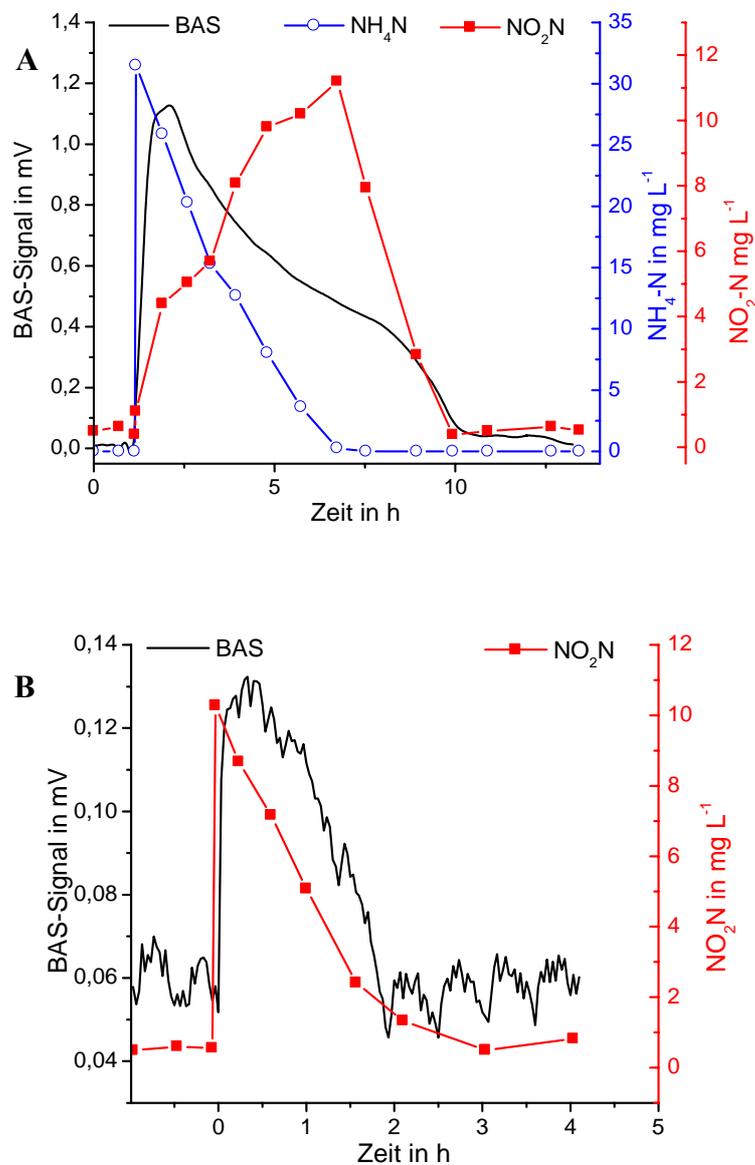


Abbildung 5-35: A - BAS-Signal und Konzentration an Ammonium- und Nitrit-Stickstoff nach der Dosierung von Ammonium, B - BAS-Signal und Nitrit-Stickstoff-Konzentration nach der von Nitrit

Zu Versuchsbeginn war kein Ammonium im Reaktor nachzuweisen. Dies bedeutet, dass die mit dem Feeding eingetragene Fracht an Ammonium vollständig abgebaut wurde. Es waren daneben nur geringe Konzentrationen von Nitrit nachzuweisen.

Nach der Dosierung von 210 mg Ammonium-Stickstoff bei $t = 1,15$ h stieg die Konzentration auf 31 mg NH_4N pro Liter an, dieses zusätzliche Substrat bewirkte einen schnellen Anstieg des BAS-Signals, der auf die Aktivitätssteigerung der Ammonium-oxidierenden Organismen zurückzuführen war. Das maximale BAS-Signal wurde nach 1,86 h erreicht und betrug 1,21 mV. Durch die Stoffwechselleistung der Ammonium-oxidierenden Mikroorganismen entstand Nitrit, welches dann durch den Stoffwechsel der Nitrit-oxidierenden Mikroorganismen weiter zu Nitrat umgesetzt wurde. Nach 6,7 h war das Ammonium komplett abgebaut, zu diesem Zeitpunkt wurde auch die maximale Konzentration an Nitrit von 11,2 mg NO_2N gemessen. Das weiterhin gemessene BAS-Signal ist auf die Stoffwechselleistung der Nitrit-Oxidierer zurückzuführen. Die gemessene Aktivität erreichte zeitgleich mit dem vollständigen Abbau des Nitrits wieder den Ausgangswert. Die periodischen Schwankungen im BAS-Signal sind auf die pH-Regelung zurückzuführen.

Ein Vergleich des gemessenen Verlaufs der Ammoniumkonzentration mit einer aus dem idealen Verweilzeitverhalten berechneten Eliminationskurve gemäß der Formel 5-13 zeigte deutlich den Einfluss der biologischen Elimination. Nach 6,7 h war kein Ammonium in dem Belebungsbecken mehr nachweisbar; hätte lediglich eine Elimination durch das Auswaschen aus dem Reaktor stattgefunden, wäre noch eine Konzentration von 28,7 mg $\text{NH}_4\text{N L}^{-1}$ zu erwarten gewesen.

$$c = c_{\text{ein},t=0} \cdot e^{-\frac{t}{\tau}}$$

Formel 5-13: Berechnung einer theoretischen Eliminationskurve

c	Konzentration zum Zeitpunkt t
$c_{\text{ein},t=0}$	Konzentration nach der Dosierung
τ	Verweilzeit

Die Dosierung von 185 mg Nitrit-Stickstoff erfolgte bei $t = 1$ h, die Konzentration an NO_2N stieg auf 10,3 mg L^{-1} (Abbildung 5-35 B). Durch das zusätzliche Substrat kam es zu einem sofortigen Anstieg der mikrobiellen Aktivität und damit des BAS-Signals, dieses erreichte nach 1,3 h ein maximales Signal von 0,13 mV. Nach 3,1 h war das Substrat weitestgehend abgebaut und das Signal des Aktivitätssensors erreichte wieder das Ausgangssignal.

Zur Untersuchung des Zusammenhangs zwischen der Substratkonzentration und dem BAS-Signal wurden verschiedene Mengen an Ammonium in das Belebungsbecken dosiert und jeweils die entsprechenden Signale des BAS aufgezeichnet (Abbildung 5-36 A).

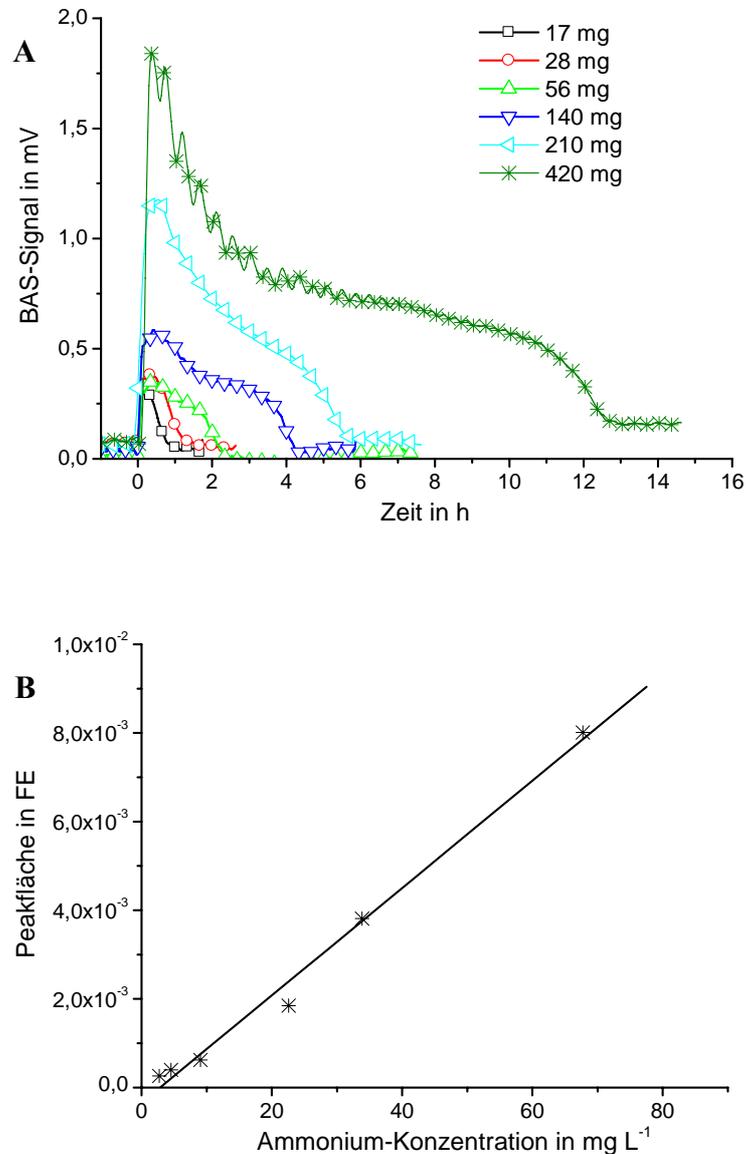


Abbildung 5-36: A – BAS-Signale nach der Dosierung von Ammonium-Stickstoff, B – Peakfläche der BAS-Signale als Funktion der NH₄N-Konzentration (Peakfläche = $1,21 \cdot 10^{-4} \cdot c_{\text{Ammonium}} - 3,42 \cdot 10^{-4}$, R₂ = 0,99, Standardabweichung $3,3 \cdot 10^{-4}$)

Es zeigte sich jeweils ein sofortiger Anstieg der Aktivität nach den Dosierungen. Die Peakhöhe und die Peakfläche waren abhängig von der zudosierten Konzentration an Ammonium-Stickstoff. Durch die Integration der Peakflächen des BAS-Signals konnte ein linearer Zusammenhang zwischen der zudosierten Ammonium-Konzentration und den Signalen des BAS gezeigt werden (Abbildung 5-36 B). Mit der Formel 5-10 wurde die Konzentration an Am-

monium in eine CSB-Konzentration umgerechnet, die aus dieser Umrechnung resultierende Geradengleichung wies eine Steigung von $2,6 \cdot 10^{-4}$ Flächeneinheiten pro mg CSB L^{-1} auf. Daneben konnte aus diesen Untersuchungen auch eine Aussage über die Nachweisgrenze der Aktivitätsänderung nach der Dosierung von Ammonium unter Berücksichtigung der Ergebnisse unter 5.1.1 getroffen werden. Eine Dosierung von $2,7 \text{ mg } L^{-1} \text{ NH}_4\text{N}$ bewirkte am Aktivitätssensor eine eindeutige Signaländerung und konnte damit in diesem Versuch bei Einsatz einer ausgezehrten, nitrifizierenden Kultur nachgewiesen werden.

Zur weiteren Untersuchung der Detektion der Nitrifikanten wurden Versuche mit dem spezifischen Hemmstoff Allylthioharnstoff durchgeführt. Allylthioharnstoff (ATH) ist ein sehr wirksamer, selektiver und reversibler Nitrifikationsinhibitor (EN ISO 9509 1995 und BAUMEISTER et al. 2002), der die Oxidation des Ammoniaks inhibiert. Die Abbildung 5-37 zeigt die BAS-Signale nach einer wiederholten Dosierung von Ammonium sowie ATH.

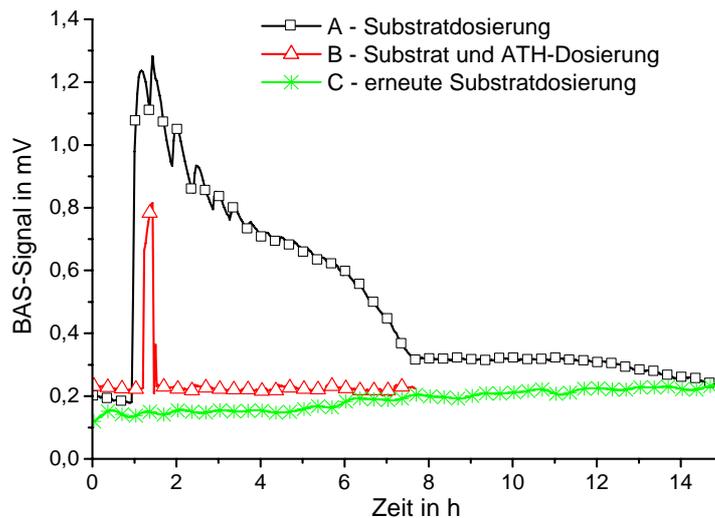


Abbildung 5-37: Vergleich der BAS-Signale nach einer Ammonium-Dosierung mit und ohne ATH

Der Versuch A zeigt den Verlauf des BAS-Signals aus der Abbildung 5-35, bei dem 210 mg Ammonium-Stickstoff als Substrat der Nitrifikanten in das Belebungsbecken gegeben wurden. Bei dem Versuch B wurden zunächst wiederum 210 mg Ammonium in den Reaktor gegeben, das BAS-Signal stieg entsprechend an. Nach 18 min betrug das BAS-Signal 0,81 mV, zu diesem Zeitpunkt wurden 116 mg ATH zudosiert. Durch diese Dosierung des Hemmstoffes fiel das Signal schnell auf das Grundniveau ab, 9 min nach der Hemmstoffdosierung betrug es 0,23 mV und blieb im weiteren Verlauf auf diesem Niveau. Nach der Dosierung des ATH fand keine Oxidation des Ammoniaks mehr statt. Eine anschließende erneute Substrat-

dosierung in dem Versuch C rief keine Änderung des BAS-Signals hervor, da keine stoffwechselaktiven Nitrifikanten in dem Belebungsbecken vorhanden waren (HOLTMANN und SELL 2002).

5.3.3 Bestimmung der Aktivität der Denitrifikanten

Untersuchungen zur Detektion der Stoffwechselaktivitäten von anoxischen Denitrifikanten als dritter wichtiger Organismengruppe in der biologischen Abwasserreinigung wurden in Batch- und kontinuierlichen Versuchen durchgeführt.

5.3.3.1 Diskontinuierliche Versuchsführung

In der Abbildung 5-38 sind drei Versuche zur Bestimmung der Aktivität der denitrifizierenden Mikroorganismen dargestellt, die Abbildung zeigt die Verläufe des BAS-Signals sowie der Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff und Nitrat-Stickstoff. Die Batch-Versuche wurden in 250 mL Glasreaktoren mit 150 mL Medium nach 4.2.13 und 50 mL Belebtschlamm aus der ersten Stufe der ARA Frankfurt-Niederrad durchgeführt. Um anoxische Verhältnisse sicherzustellen, wurden die Reaktoren mit 40 L Stickstoff h^{-1} gespült. Der Testlauf A zeigt den Standard-Signalverlauf, der Testlauf B das Signal nach der Dosierung eines Hemmstoffes und der Versuch C die entsprechende Sterilkontrolle.

In dem Versuch A wurde bei $t = 1,37$ h der Belebtschlamm zudosiert. Es kam zu einem sofortigen Anstieg des BAS-Signals. Vor der Substratdosierung betrug das Signal 0,1 mV, nach 4,9 h wurde ein maximales Signal von 0,24 mV gemessen. Parallel konnte ein Abbau an Kohlenstoff und Nitrat nachgewiesen werden. Zu Versuchsbeginn betrug die Konzentration an Nitrat-Stickstoff $98,4 \text{ mg L}^{-1}$ und an gelöstem organischem Kohlenstoff $113,2 \text{ mg L}^{-1}$. Nach 6,5 h war der Kohlenstoffgehalt auf 17 mg L^{-1} gefallen und die Konzentration an NO_3N betrug $27,8 \text{ mg L}^{-1}$. Nachdem das Substrat abgebaut war, fiel das BAS-Signal wieder auf den Startwert ab.

Der Versuch B wurde unter vergleichbaren Bedingungen durchgeführt, bei $t = 2,1$ h wurde der Belebtschlamm in den Reaktor dosiert, es war wiederum ein Anstieg des BAS-Signals und eine Abnahme der Substratkonzentrationen zu erkennen. Nach 4 h wurden 5 mL Glutaraldehyd in den Reaktor dosiert. Durch diese Hemmstoffdosierung wurde der Stoffwechsel der Mikroorganismen unterbunden und das BAS-Signal fiel auf einen Wert von 0 mV ab, dementsprechend wurde von diesem Zeitpunkt an keine weitere Substrat-Elimination mehr nachgewiesen.

Der Testlauf C zeigt die entsprechende Sterilkontrolle, hier wurde das Substrat vorgelegt und keine Organismen zudosiert. Das Signal des BAS blieb auf einem Wert nahe Null und es trat kein Substratabbau auf.

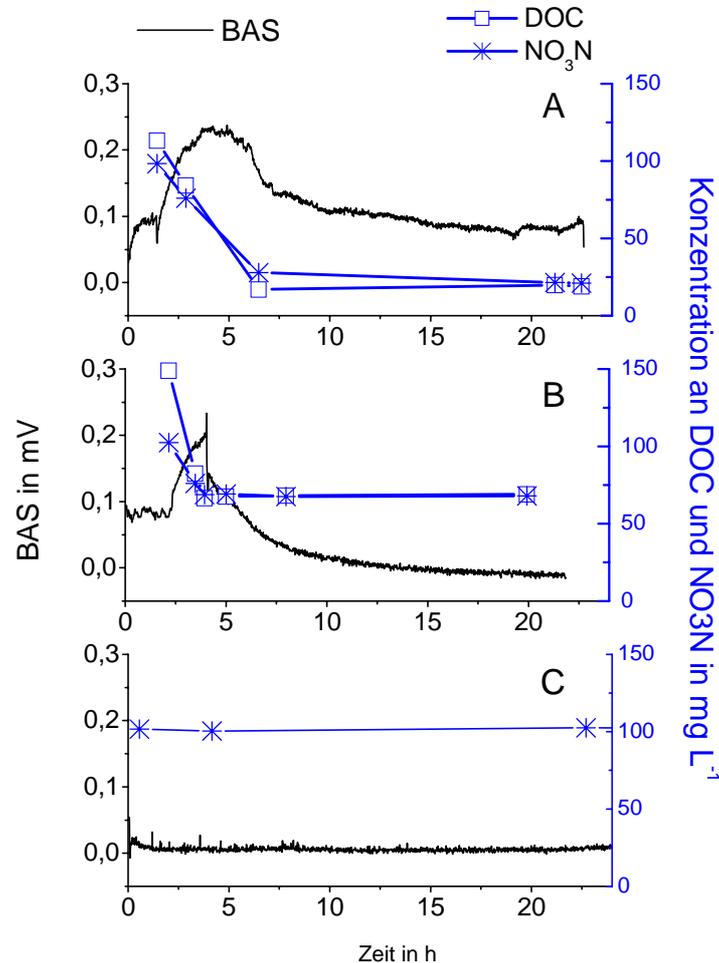


Abbildung 5-38: BAS-Signal im anoxischen Denitrifikationsbecken

5.3.3.2 Kontinuierliche Versuchsdurchführung

Die kontinuierlichen Untersuchungen wurden in der Laborkläranlage I mit dem Medium nach 4.2.13, einem Feeding von 10 L d⁻¹ und einem Inokulum aus der Kläranlage Frankfurt-Niederrad durchgeführt. In diesen Versuchen wurde der pH-Wert zwischen 6,8 und 7,2 geregelt. Das Medium war so ausgelegt, dass die Kohlenstoffquelle der wachstumslimitierende Faktor war. Wenn sich die Laborkläranlage in einem Fließgleichgewichtszustand befand, wurde eine zusätzliche Kohlenstoffquelle in Form von festem Natriumacetat in das anoxische Becken dosiert. Die Abbildung 5-39 A zeigt die Dosierung von 3 g Natriumacetat in den

Reaktor und die Abbildung 5-39 B die Integration der aus den Dosierungen resultierenden Peakflächen des Bioaktivitätssensors.

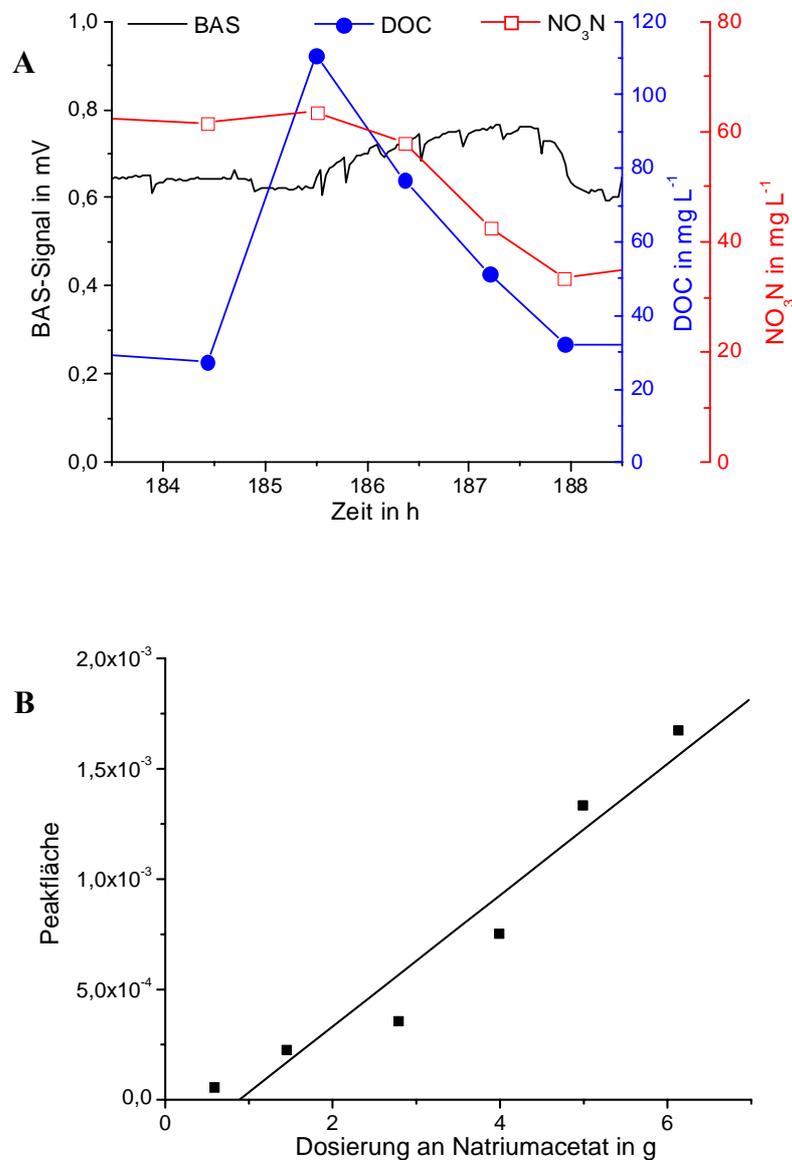


Abbildung 5-39: A - Dosierung von 3 g Natriumacetat bei $t = 185,4$ h in das anoxische Denitrifikationsbecken, B - Peakfläche des BAS-Signals nach Dosierung von Natriumacetat (Gleichung der Regressionsgeraden: $\text{Peakfläche} = 2,97 \cdot 10^{-4} \cdot c_{\text{Natriumacetat}} - 2,63 \cdot 10^{-4}$, $R^2 = 0,94$, Standardabweichung $1,75 \cdot 10^{-4}$)

Durch die Dosierung des Natriumacetats stieg die Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff von $27,2 \text{ mg L}^{-1}$ auf 111 mg L^{-1} . Im weiteren Verlauf des Versuches war eine Abnahme der DOC- und NO_3N -Konzentration zu beobachten. Durch das zusätzliche Substrat liefen die Stoffwechselfvorgänge der Denitrifikation verstärkt ab, dadurch stieg das Signal des BAS an. Vor der Substratdosierung betrug das BAS-Signal ca. $0,62 \text{ mV}$ und stieg auf einen maximalen Wert von $0,76 \text{ mV}$ nach $187,3 \text{ h}$. Wenn die zusätzliche Kohlenstoffquelle

verstoffwechselt war, fiel das Signal des BAS wieder auf das Ausgangsniveau und die Konzentration an Nitrat stieg wieder an (in der Abbildung 5-39 nicht dargestellt).

Die Integration der Peakflächen zeigte einen linearen Zusammenhang zwischen dem zudosierten Substrat und den resultierenden Peakflächen. Mit der Formel 5-10 wurde die Konzentration an Natriumacetat in eine CSB-Konzentration umgerechnet, die aus dieser Umrechnung resultierende Geradengleichung wies eine Steigung von $2 \cdot 10^{-6}$ Flächeneinheiten pro mg CSB L^{-1} auf. Mit einer minimal detektierbaren Peakfläche von $5 \cdot 10^{-5}$ Flächeneinheiten (siehe 5.1.1 und Abbildung 5-27) ergab sich eine Nachweisgrenze von 34 mg Natriumacetat pro Liter, dies entspricht einer Konzentration von 9,3 mg NO_3N pro Liter.

5.3.4 Bestimmung der Aktivität anaerober Stoffwechselfvorgänge

Neben den aeroben und anoxischen heterotrophen sowie den aeroben autotrophen Prozessen haben anaerobe Prozesse einen erheblichen Stellenwert in der biologischen Abwasserreinigung. Mit der hier vorliegenden Untersuchung sollte die Eignung des Bioaktivitätssensors zur Detektion der anaeroben Stoffwechselfvorgänge untersucht werden. Die zweite Stufe der Modellkläranlage II wurde als Batch-Reaktor verwendet, es wurde das Medium nach 4.2.14 eingesetzt. Um anaerobe Verhältnisse sicherzustellen, wurde der Reaktor mit 40 L Stickstoff pro Stunde gespült und lediglich schwach gerührt. Neben dem BAS-Signal wurde das Redoxpotential gemessen. Der Reaktor wurde mit einem Liter Belebtschlamm aus der 1. Stufe der Kläranlage Frankfurt-Sindlingen angeimpft.

Innerhalb eines Zeitraumes von 200 h wurde das vorgelegte Substrat abgebaut, anschließend erfolgten erneute Substrat-Dosierungen. Die Abbildung 5-40 zeigt das Ergebnis zweier Dosierungen in den anaeroben Reaktor, hier wurden jeweils die Medienbestandteile für 5 Liter in 100 mL Wasser gelöst und zudosiert.

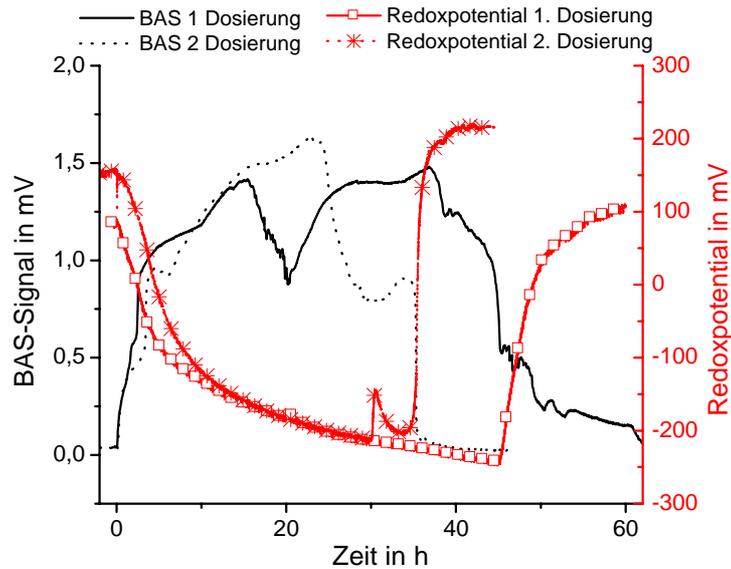


Abbildung 5-40: Dosierung von Substraten jeweils bei $t = 0$ h in einen anaeroben Reaktor

Nach der ersten Substratdosierung stieg das BAS-Signal steil an, gleichzeitig war ein Abfall des Redoxpotentials zu beobachten. Das Potential sank während des Versuches von 100 mV auf -240 mV ab. Das BAS-Signal erreichte einen maximalen Wert von 1,5 mV. Nach 38 h begann das BAS-Signal wieder zu fallen und erreichte nach einer Versuchsdauer von 50 h wieder den Ausgangswert. Das Redoxpotential stieg nach 45 h steil wieder an.

Während der zweiten Dosierung wurde zusätzlich der Abbau an gelöstem organischem Kohlenstoff bestimmt, nach der Substratdosierung stieg der DOC von 41 auf 218 mg L⁻¹ an. Innerhalb der nächsten 6,4 h sank der DOC um 84 mg L⁻¹ auf 134 mg L⁻¹. Im weiteren Verlauf fiel der Substratgehalt bedeutend langsamer ab, um nach 39,7 h wieder den Ausgangswert zu erreichen. Der Substrat-Abbau zeigte damit zeitliche Übereinstimmungen mit den BAS-Signalen. Bei diesem Versuch war wiederum zu erkennen, dass das Signal des BAS bereits anfang zu sinken, während das Redoxpotential noch konstante Werte von ca. -220 mV aufwies und erst zu dem Zeitpunkt zu steigen begann, an dem das BAS-Signal seinen Ausgangswert erreicht hatte.

5.3.5 Parallele Bestimmung der mikrobiellen Aktivitäten

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Aktivitätsänderungen der aeroben und anoxischen heterotrophen sowie der aeroben autotrophen Mikroorganismen in separaten Untersuchungen online mit dem BAS detektiert werden konnten, sollte im Rahmen der folgenden Versuchsreihen untersucht werden, ob die verschiedenen Aktivitäten auch zeitgleich nebeneinander nachgewiesen werden können.

5.3.5.1 Auto- und heterotrophe, aerobe Mikroorganismen

Die Abbildung 5-41 zeigt einen Versuch in der Laborkläranlage II, hier sollten die Aktivitäten der aeroben heterotrophen und autotrophen Mikroorganismen bestimmt werden. Die Anlage wurde mit einem Feeding von 10 L Abwasser pro Tag beschickt, als Substrat kam das modifizierte Abwasser nach 4.2.11 zum Einsatz. Angeimpft wurde die Anlage mit jeweils 1 Liter Belebtschlamm aus der ersten und zweiten Stufe der Abwasserreinigungsanlage Frankfurt-Niederrad. Damit sollte sichergestellt werden, dass ausreichend hetero- und autotrophe Mikroorganismen in dem Reaktor vorhanden waren. Neben dem BAS-Signal wurden die Konzentrationen an gelöstem organischem Kohlenstoff und Ammonium-Stickstoff gemessen.

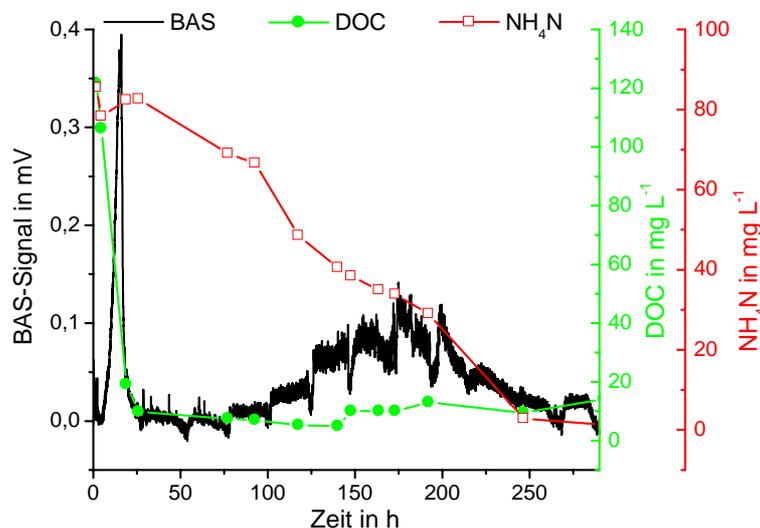


Abbildung 5-41: BAS-Signal, DOC und Ammonium-Stickstoff im Ablauf einer nitrifizierenden Laborkläranlage

In den ersten 24 h war ein starker Anstieg des BAS-Signals zu beobachten; dies korreliert zeitlich mit einer starken DOC-Elimination in diesem Zeitraum. Zu Versuchsbeginn wurde ein DOC von 120 mg L⁻¹ gemessen, nach 24 h waren bereits über 90 % des Substrates abgebaut. Das maximale Signal des Aktivitätssensors von 0,4 mV wurde nach 16 h erreicht. In diesem Zeitraum war die gemessene Aktivität von den heterotrophen Stoffwechselfvorgängen abhängig. Im weiteren Verlauf des Versuches fand kontinuierlich eine über 90%ige Elimination des gelösten organischen Kohlenstoffes statt.

Die Ammonium-Konzentration änderte sich in dieser Versuchsphase nicht wesentlich und betrug ca. 80 mg NH₄N pro Liter. Erst im Laufe des Prozesses kam es zu einer signifikanten Konzentrationsänderung des Substrates der Nitrifikanten. Nach ca. 100 h kam es zu einem zweiten Peak des BAS-Signals, das BAS-Signal stieg auf einen Wert von ca. 0,1 mV an.

Dieser Peak ist auf einen verstärkten Abbau des Ammoniums zurückzuführen. In diesem Zeitabschnitt war damit die gemessene Signaländerung auf einen Anstieg der Aktivität der autotrophen Biomasse zurückzuführen. Im weiteren Verlauf wurden sowohl der mit dem Feeding eingetragene organische Kohlenstoff als auch das Ammonium kontinuierlich umgesetzt (HOLTMANN und SELL 2002).

5.3.5.2 Betrieb der Laborkläranlage II mit gleichzeitiger Denitrifikation, Nitrifikation und Kohlenstoffabbau

In einem weiteren Versuch sollten die drei relevanten Prozesse Denitrifikation, Nitrifikation und Kohlenstoffabbau nebeneinander untersucht werden. Dazu wurde die Modellkläranlage II mit vorgeschaltetem anoxischem Denitrifikationsbecken und aerobem Belebungsbecken eingesetzt, als Medium wurde das modifizierte Abwasser verwendet (4.2.11). Um anoxische Bedingungen in der ersten Stufe der Laborkläranlage zu gewährleisten, wurde das Denitrifikationsbecken mit 40 L Stickstoff pro Stunde gespült. Die Laborkläranlage wurde mit jeweils 1 Liter Belebtschlamm aus der ersten und zweiten Stufe der Abwasserreinigungsanlage Frankfurt-Niederrad beimpft. Damit sollte sichergestellt werden, dass sich ausreichend hetero- und autotrophe Mikroorganismen in dem Reaktor befinden. Die Aktivität der Mikroorganismen wurde jeweils mit einem Bioaktivitätssensor im Bypass des Denitrifikations- und Belebungsbeckens gemessen. In der Abbildung 5-42 sind diese BAS-Signale, der Verlauf des Redoxpotentials sowie die Konzentrationen an gelöstem organischem Kohlenstoff, Ammonium- und Nitrat-Stickstoff im Ablauf der Laborkläranlage dargestellt.

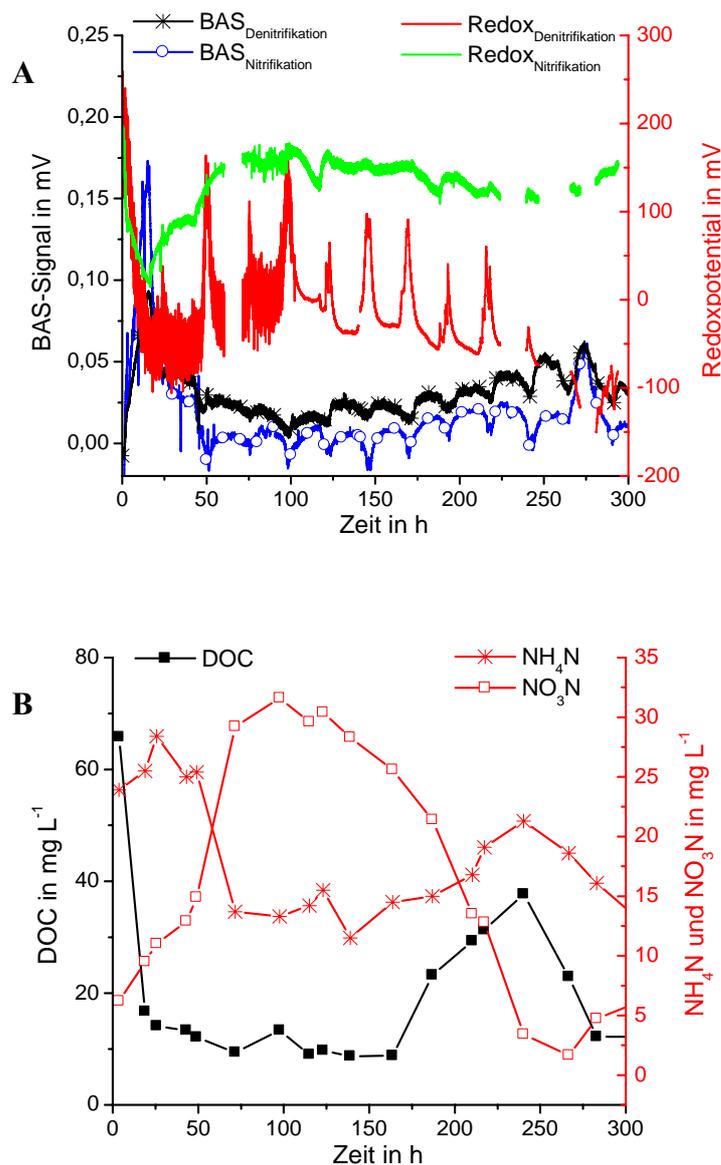


Abbildung 5-42: Elektrochemische Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in der anoxischen und aeroben Stufe der Laborkläranlage sowie der Verlauf des Redoxpotentials, der Konzentration an DOC, Ammonium- und Nitratstickstoff

Zu Beginn des Versuchs war ein starker Anstieg des BAS-Signals in der Nitrifikationsstufe festzustellen, das BAS-Signal stieg von 0 μV zu Versuchsbeginn auf 160 μV nach 15,7 h. Dieser Anstieg ist auf einen Abbau an gelöstem organischem Kohlenstoff zurückzuführen. Nach 18 h war die DOC-Konzentration im Ablauf der Laborkläranlage von 65 mg L^{-1} auf 13 mg L^{-1} gesunken. Parallel zu dem Anstieg des BAS-Signals in der aeroben Stufe war auch ein Anstieg des BAS-Signals in der anoxischen Stufe festzustellen, hier betrug das Signal nach 15,7 h 92 μV . In diesem Zeitraum war auch ein Absinken der Redoxpotentiale in den beiden Stufen der Modellkläranlage festzustellen. Nach dem Abbau des Kohlenstoffes stieg das

Redoxpotential in der aeroben Stufe wieder an, dagegen blieb das Redoxpotential in der anoxischen Stufe auf einem Niveau von ca. 0 mV.

Die Aktivitätssteigerung der Nitrifikanten zeigte sich an der Umsetzung des Ammoniums zu Nitrat, zu Versuchsbeginn betrug die Konzentration an Ammonium-Stickstoff ca. 25 mg L^{-1} und wurde innerhalb von 72 h bis auf 13 mg L^{-1} abgebaut. Eine weitergehende Nitrifikation fand nicht statt, da der pH-Wert unter 6,8 abgesunken war und unter diesen Bedingungen keine vollständige Nitrifikation möglich ist (siehe 3.2.2). Auf diesem Niveau blieb die Ammoniumkonzentration für weitere 100 h. In diesem Zeitraum war nur eine geringe Umsetzung des Nitrat-Stickstoffs zu erkennen, in den ersten 72 h des Versuches stieg die Konzentration an Nitrat-Stickstoff von $6,2 \text{ mg L}^{-1}$ auf $29,2 \text{ mg L}^{-1}$ und betrug bei $t = 164 \text{ h}$ $25,6 \text{ mg L}^{-1}$. Die BAS-Signale in der Denitrifikations- und Nitrifikationsstufe zeigten in dieser Phase des Versuchs einen vergleichbaren Verlauf. Das Redoxpotential in der anoxischen Stufe betrug ca. 25 mV, wies dabei große Schwankungen von + 100 bis – 40 mV auf. In der aeroben Stufe war das Redoxpotential dagegen auf einem Niveau von ca. 150 mV.

Da die Konzentration an Elektronendonatoren der Denitrifikanten bei diesem Versuch nicht ausreichte, wurde ab $t = 165 \text{ h}$ kontinuierlich Methanol in das Denitrifikationsbecken dosiert. Das Feeding der Methanol-Lösung erfolgte mit 2 L d^{-1} und die Konzentration an Methanol in der Lösung betrug 1 mL L^{-1} . Mit dieser zusätzlichen Dosierung eines Elektronendonators sollten ca. 3720 mg Nitrat pro Tag zu Stickstoff umgesetzt werden können und damit eine vollständige Denitrifikation möglich sein.

Nach dem Beginn des Methanol-Feedings war ein starker Anstieg des DOC im Ablauf der Anlage festzustellen, die maximale Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff betrug $37,7 \text{ mg L}^{-1}$ bei $t = 240 \text{ h}$, der Kohlenstoffgehalt sank im Folgenden wieder auf den Wert vor der Dosierung ab. Dies bedeutet, dass der Kohlenstoff vollständig in den anoxischen und aeroben Prozessen abgebaut wurde. Die Dosierung des Elektronendonators bewirkte eine verstärkte Denitrifikation, die Konzentration an Nitrat-Stickstoff sank auf ca. 3 mg L^{-1} nach 240 h ab. Daneben ist auch ein Absinken des Redoxpotentials in der anoxischen Stufe zu erkennen, das Potential betrug bei Versuchsende ca. –100 mV. Durch die gesteigerte Denitrifikationsleistung der Mikroorganismen war auch ein Anstieg des BAS-Signals in der anoxischen Stufe festzustellen, vor dem Methanol-Feeding betrug der Mittelwert ca. 23 μV und nach dem Einstellen des neuen Fließgleichgewichtes ca. 48 μV .

5.3.6 Vergleich der Peakflächen des BAS mit aus der Substratumsetzung berechenbaren Größen

In dieser Versuchsreihe sollten die Signale des Bioaktivitätssensors mit theoretisch bestimm- baren Werten bei der Substratumsetzung verglichen werden. Dazu wurden die Signale des BAS bei der aeroben Verwertung von Glucose, Ammonium und Nitrit sowie dem anoxischen Abbau von Acetat bestimmt. Anschließend wurden die Peakflächen der BAS-Signale und damit formal die übertragenen Ladungen bestimmt (gemäß Formel 5-4). Diese Werte wurden mit dem theoretischen Energiegewinn $E_{\text{theo.}}$ aus der Substratumsetzung und den dabei über- tragbaren Elektronen $N_{\text{Elektronen, theo.}}$ verglichen. Die Tabelle 5-9 zeigt die entsprechenden Daten; die Redoxreaktionen zur Berechnung der frei-werdenden Elektronen und der Energie- ausbeute sind im Anhang unter 9.1 dargestellt.

Als Batch-Reaktor wurde die biologische Stufe der KA I genutzt und die jeweiligen Testme- dien (siehe Tabelle 5-9) vorgelegt. Die Reaktoren wurden mit 1 L Belebtschlamm aus der entsprechenden Stufe der Kläranlage Frankfurt-Niederrad angeimpft. Sobald das vorgelegte Medium abgebaut war und die Signale des BAS konstant waren, wurden die Substrate in die Reaktoren dosiert und die entsprechenden Änderungen des BAS aufgezeichnet.

Tabelle 5-9: Verwendete Substrate, Kulturmedien sowie der theoretische Energiegewinn $E_{\text{theo.}}$ und die übertragbaren Elektronen $N_{\text{Elektronen, theo}}$ zum Vergleich des BAS-Signals mit den theoretischen Werten

Substanz	Medium	Energiegewinn in kJ mol^{-1}	Stoffmenge in mmol	$E_{\text{theo.}}$ in kJ	$N_{\text{Elektronen, theo.}}$ in mmol
Glucose	nach 4.2.11	2870	7,6	21,7	182
Ammonium	nach 4.2.12	305 380 ^(*)	11	3,4 4,2 ^(*)	88 ^(*)
Nitrit	nach 4.2.12	75	14,5	1,1	29
Acetat	nach 4.2.13	834	12,2	10,2	98

^(*) unter Berücksichtigung der nachfolgenden Oxidation des entstandenen Nitrits zu Nitrat

In der Tabelle 5-10 sind die Quotienten der Peakflächen der BAS-Signale zu den theoretisch übertragbaren Elektronen bzw. zu dem theoretischen Energiegewinn bei Umsetzung des entsprechenden Substrates dargestellt. Die gemessenen Ladungen bezogen auf den theoretischen Energiegewinn waren nach der Dosierung des Nitrits am höchsten und nach der Dosierung von Acetat am niedrigsten. Die Werte für die einzelnen Substrate lagen zwischen $8,0 \cdot 10^{-6}$ und $1,3 \cdot 10^{-3} \text{ C kJ}^{-1}$. Bei der Glucose lag der gemessene Wert bei $1,6 \cdot 10^{-5} \text{ C kJ}^{-1}$,

dagegen wurde für *E. coli* im Chemostaten ein Wert von $1,9 \cdot 10^{-4} \text{ C kJ}^{-1}$ gemessen (siehe 5.2.6.4).

Bei dem Quotienten der Ladung zu den theoretisch übertragbaren Elektroden war die Schwankungsbreite geringer, der maximale Wert wurde wiederum beim Nitrit und der niedrigste Wert beim Acetat gemessen.

Tabelle 5-10: Vergleich zwischen den Signalen des BAS und dem theoretischen Energiegewinn sowie den theoretisch übertragbaren Elektronen

Substanz	$\frac{\text{Peak}_{\text{BAS}}}{E_{\text{theo.}}} = \frac{Q}{E_{\text{theo.}}} \text{ in C kJ}^{-1}$	$\frac{\text{Peak}_{\text{BAS}}}{N_{\text{Elektronen,theo.}}} = \frac{Q}{N_{\text{Elektronen,theo.}}} \text{ in C mol}^{-1}$
Glucose	$1,6 \cdot 10^{-5}$	$2,0 \cdot 10^{-3}$
Ammonium	$1,4 \cdot 10^{-4}$	$6,6 \cdot 10^{-3}$
Nitrit	$1,3 \cdot 10^{-3}$	$4,8 \cdot 10^{-2}$
Acetat	$8,0 \cdot 10^{-6}$	$8,3 \cdot 10^{-4}$

5.3.7 Wirkung von Stoffwechselgiften auf die mikrobielle Aktivität

Die Wirkung von Stoffwechselgiften auf die mikrobielle Aktivität wurde in der aeroben Stufe der Laborkläranlage II untersucht. Um deutlichere Änderungen der mikrobiellen Aktivität feststellen zu können, wurde das Abwassermedium nach 4.2.11 in einer vierfachen Konzentration eingesetzt. Der Sauerstoffgehalt in dem Belebungsbecken der Laborkläranlage wurde auf $2,0 - 2,2 \text{ mg L}^{-1}$ geregelt. Sauerstoffgehalt, Redoxpotential, pH-Wert und BAS-Signal wurden online aufgezeichnet, offline wurden die Konzentrationen an gelöstem organischem Kohlenstoff bestimmt. Zur Verifizierung der BAS-Signale wurde parallel die Sauerstoffzehrung direkt im Reaktor bestimmt (nach 4.3.3.9). Als Stoffwechselgift wurde Kaliumcyanid eingesetzt. In dem in der Abbildung 5-43 dargestellten Versuch wurden nach 283,7 Stunden $1,5 \text{ g KCN}$ in das Belebungsbecken gegeben.

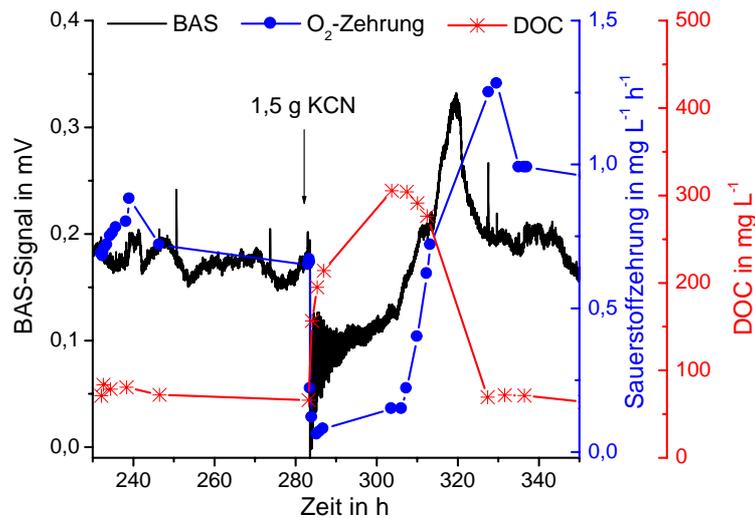


Abbildung 5-43: BAS-Signal, Sauerstoffzehrung und DOC nach einer Dosierung von KCN in das Belebungsbecken (Konzentration des Cyanids im Reaktor $4,8 \text{ mmol L}^{-1}$)

Nach der Dosierung des Hemmstoffes fiel das BAS-Signal ab, parallel kam es auch zu einer Verringerung der Sauerstoffzehrung. Das Signal des BAS betrug vor der Dosierung des Cyanids ca. $0,2 \text{ mV}$ und sank durch die Wirkung des Hemmstoffes auf ca. $0,1 \text{ mV}$ ab. Das Signal blieb für ca. 20 h auf diesem verringerten Wert. Aufgrund dieser Abnahmen der mikrobiellen Aktivität wurde der mit dem Abwasserzufluss eingetragene Kohlenstoff nicht mehr vollständig abgebaut. Der DOC-Abbaugrad (nach Formel 3-9) ging von 86% vor der Dosierung auf 40% bei $t = 304 \text{ h}$ zurück. Mit dem folgenden Anstieg des BAS-Signals korrelierten eine steigende Sauerstoffzehrung und eine verstärkte Elimination des Kohlenstoffs. Die Aktivitätssignale stiegen jeweils über die Werte aus dem Fließgleichgewicht vor der Dosierung des Hemmstoffes, dies war auf das erhöhte Substratangebot zurückzuführen. Nachdem dieses Substrat abgebaut war, sank die gemessene mikrobielle Aktivität wieder ab. Ein neuer Fließgleichgewichtszustand wurde ca. 50 h nach der Hemmstoffdosierung wieder erreicht.

Die Abbildung 5-44 zeigt die BAS-Signale nach der Dosierung von verschiedenen Konzentrationen an Kaliumcyanid, zur besseren Vergleichbarkeit wurden die Zeitpunkte der Dosierungen auf $t = 0 \text{ h}$ normiert.

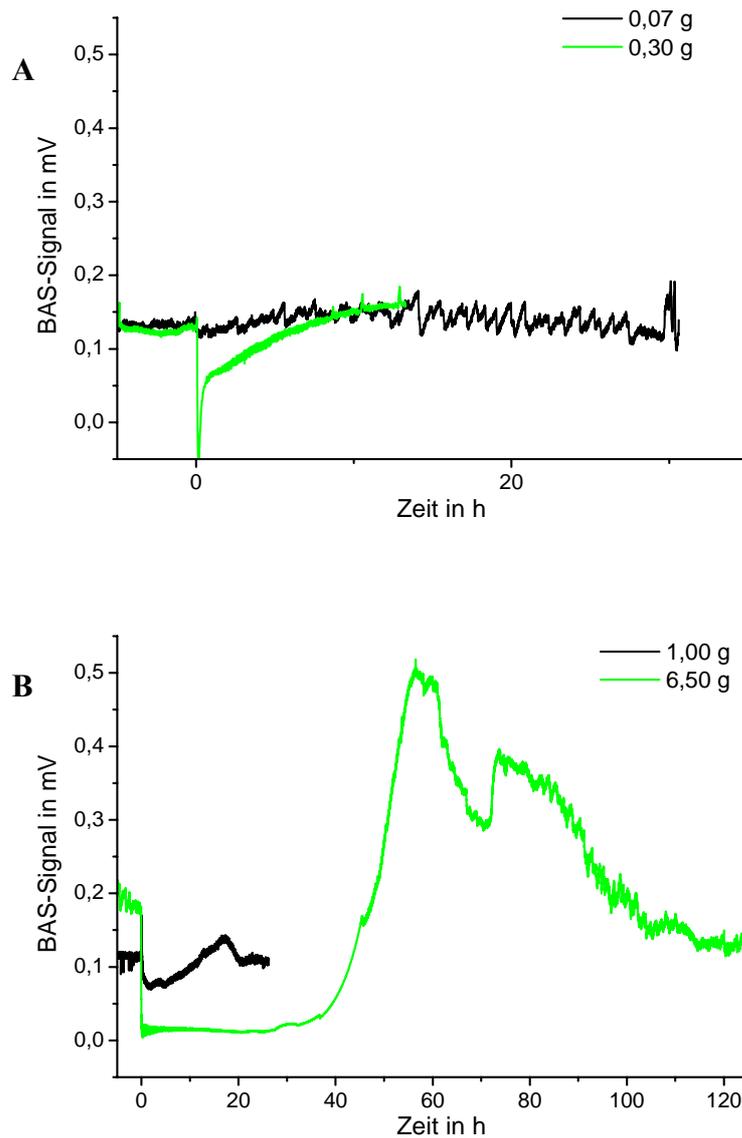


Abbildung 5-44: Vergleich der Dosierung an verschiedenen Kaliumcyanidkonzentrationen (Dosierung bei $t = 0$ h)

Die Dosierung von 70 mg Kaliumcyanid zeigte keine Auswirkung auf das BAS-Signal, bei einer Dosierung von 300 mg war dagegen eine Hemmung der Aktivität zu erkennen. Das Signal des Bioaktivitätssensors sank für ca. 10 h unterhalb des Wertes aus dem Fließgleichgewicht und erreichte dann wieder den Ausgangswert. Der Abbaugrad sank durch diese Dosierung von 86 % auf 70 % ab. Eine Dosierung von 1 g Kaliumcyanid zeigte einen vergleichbaren Verlauf zu der in der Abbildung 5-43 beschriebenen Dosierung von 1,5 g Kaliumcyanid auf. Der Abbau an gelöstem organischem Kohlenstoff ging hier auf 67 % zurück. Nach dem Auswaschen des Cyanids war wieder ein Anstieg des BAS-Signals über den Gleichgewichtswert zu erkennen. Das Signal des BAS hatte vor der Dosierung einen

Wert von ca. 0,1 mV und erreichte nach 17 h einen maximalen Anstieg von 0,14 mV. Nach ca. 20 h erreichte das Signal des BAS wieder den Ausgangswert. Eine Dosierung von 6,5 g Kaliumcyanid bewirkte einen Abfall des BAS-Signals auf einen Wert nahe Null und eine Reduktion des DOC-Abbaus auf ca. 5 %. Das BAS-Signal blieb für ca. 35 h auf diesem niedrigen Wert und begann dann wieder zu steigen. Nach 60 h erreichte der BAS ein maximales Signal von 0,5 mV und fiel dann wieder, bei $t = 120$ h war der Ausgangswert erreicht und das System befand sich wieder in einem Fließgleichgewichtszustand.

5.3.8 Experimentelle Abgrenzung zwischen dem BAS-Signal und dem Redoxpotential

Da bei der Redoxpotential-Messung das Verhältnis zwischen oxidierten und reduzierten Substanzen (nach Formel 3-2) und bei der Aktivitätsbestimmung mit dem BAS die Konzentration an reduzierten Stoffwechselintermediaten gemessen wird, sollten in den folgenden Untersuchungen die Unterschiede zwischen diesen Signalen experimentell aufgezeigt werden. Die Abbildung 5-45 zeigt das Signal des Bioaktivitätssensors und das Redoxpotential nach der Dosierung von Ammoniumsulfat und Allylthioharnstoff als Nitrifikationshemmstoff in das Belebungsbecken der Kläranlage I. Die Laborkläranlage wurde hier als Batch-Reaktor verwendet, in den Reaktor wurde Medium nach 4.2.12 vorgelegt und mit 1 Liter Belebtschlamm aus der Abwasserreinigungsanlage Frankfurt-Sindlingen angeimpft. Nachdem das vorgelegte Substrat abgebaut wurde, erfolgte die Dosierung des Substrates bzw. des Nitrifikationshemmstoffs.

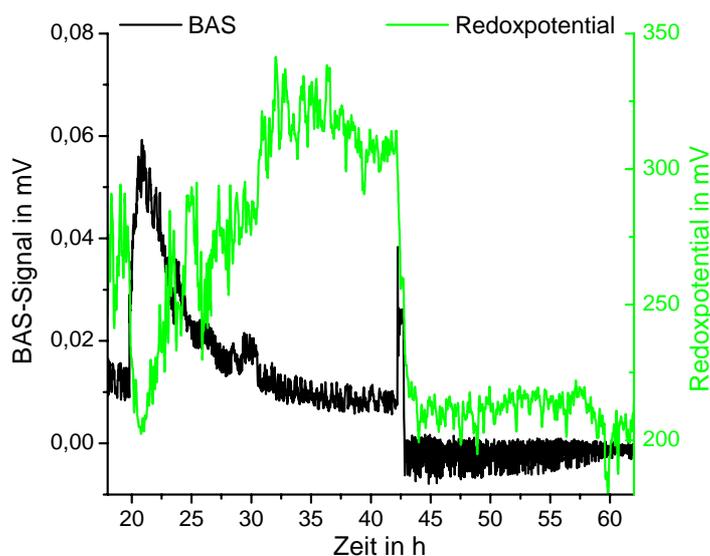


Abbildung 5-45: Abgrenzung von BAS-Signal und Redoxpotential während der Nitrifikation (bei $t = 19,8$ h und $t = 42,2$ h Dosierung von jeweils 1 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sowie bei $t = 42,7$ h Dosierung von 1 g ATH)

Die erste Dosierung von 1 g Ammoniumsulfat nach 19,8 h bewirkte einen Anstieg des BAS-Signals und einen Abfall des Redoxpotentials. Das BAS-Signal vor der Dosierung betrug ca. 10 μV , das maximale Signal von 59 μV wurde nach 21 h erreicht. Das Redoxpotential sank nach der Dosierung des Ammoniums von 270 mV auf einen Wert von 200 mV ab. Beide Signale erreichten nach dem Abbau des zudosierten Substrates nach 32 h wieder die Ausgangswerte. In dieser Versuchsphase zeigten die zeitlichen Verläufe des BAS-Signals und des Redoxpotentials qualitative Ähnlichkeiten auf.

Bei der zweiten Dosierung wurde erneut 1 g Ammoniumsulfat in den Reaktor dosiert, es war wiederum ein Anstieg des BAS-Signals und ein Abfall des Redoxpotentials festzustellen. Bei $t = 42,7$ h erfolgte die Dosierung des Nitrifikationshemmstoffs ATH (Fa. Fluka, Neu-Ulm), zu diesem Zeitpunkt hatte das BAS-Signal einen Wert von 25 μV und das Redoxpotential betrug ca. 250 mV. Nach Hemmung der mikrobiellen Aktivität fiel das Signal des Bioaktivitätssensors schnell auf das Grundniveau ab. Dagegen fiel das Redoxpotential weiter ab und erreichte nach 44 h einen Wert von ca. 200 mV, auf diesem Niveau blieb das Signal während des weiteren Verlaufs des Versuches.

Die Tabelle 5-11 zeigt die qualitativen Änderungen des Redoxpotentials, des BAS-Signals und der Sauerstoffzehrung nach der Dosierung von Kaliumcyanid als Hemmstoff und des Abwasserkonzentrates nach 4.2.11 als Substrat des mikrobiellen Stoffwechsels. Diese Untersuchungen wurden in der aeroben Stufe der Laborkläranlage II durchgeführt, die Anlage wurde kontinuierlich mit 10 L d^{-1} des synthetischen Abwassers nach 4.2.11 durchströmt. Die Dosierungen erfolgten, wenn sich die Laborkläranlage in einem Fließgleichgewichtszustand befand.

Tabelle 5-11: Änderungen von Redoxpotential, BAS-Signal und Sauerstoffzehrung nach der Dosierung eines Hemmstoffes oder Substrates (\downarrow = Signalabfall, \uparrow = Signalanstieg)

Dosierung	Redoxpotential	BAS-Signal	Sauerstoffzehrung
Kaliumcyanid	\downarrow	\downarrow	\downarrow
Abwasserkonzentrat	\downarrow	\uparrow	\uparrow

Nach der Dosierung der Substanzen fiel das Redoxpotential jeweils ab, dagegen bewirkte das Substrat einen Anstieg und der Hemmstoff einen Abfall sowohl des BAS-Signals als auch der Sauerstoffzehrung.

5.4 Potentiostatisch geregeltes 3-Elektrodensystem

Die Arbeiten unter 5.3 haben gezeigt, dass es möglich ist, die Aktivität sowohl der autotrophen als auch der heterotrophen Mikroorganismen elektrochemisch zu bestimmen. In der nachfolgend beschriebenen Versuchsreihe sollte die Eignung der elektrochemischen Messsysteme zur selektiven Bestimmung der nebeneinander ablaufenden aeroben Prozesse untersucht werden. Bei den Untersuchungen unter 5.3 wurde der Bioaktivitätssensor eingesetzt, da dort die online Bestimmung der mikrobiellen Aktivität im Vordergrund stand. Um möglichst kurze Untersuchungszeiten und konstante elektrochemische Bedingungen zu gewährleisten, wurde in dieser Versuchsreihe das potentiostatisch geregelte 3-Elektrodensystem nach 4.3.3.9 eingesetzt, zur Differenzierung der Aktivitäten sollte Allylthioharnstoff als spezifischer Nitrifikationsinhibitor (EN ISO 9509 1995 und BAUMEISTER et al. 2002) verwendet werden. Nach der Hemmstoffdosierung sollte das messbare Aktivitätssignal damit lediglich eine Folge der Aktivität der heterotrophen Mikroorganismen sein. Weiterhin sollte mit dem 3-Elektrodensystem die quantitative Hemmwirkung von Chemikalien auf die Mikroorganismen des Belebtschlammes untersucht werden.

5.4.1 Selektive Erfassung der aeroben hetero- und autotrophen Biomasse

Für Voruntersuchungen wurde Belebtschlamm aus dem Ablauf der 2. Stufe der Abwasserreinigungsanlage Frankfurt-Sindlingen entnommen und nach 4.3.4.2 der Stromfluss bei einem Potential von 300 mV gegen Ag/AgCl für 60 min gemessen. In einer ersten Versuchsreihe wurde direkt der Belebtschlamm eingesetzt, hier konnte kein Stromfluss detektiert werden. Ein weiterer Versuch wurde in Gegenwart des Mediators 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon (HNQ) durchgeführt, hier konnte ebenfalls kein Messsignal detektiert werden. Durch Sedimentation des Belebtschlammes wurde in einer folgenden Versuchsreihe eine Aufkonzentrierung der Mikroorganismen um den Faktor 4 erreicht, dieses Belebtschlamm-Mediator-Gemisch bewirkte einen deutlichen Stromsignalfluss an den Elektroden des 3-Elektrodensystems.

In der Abbildung 5-46 sind neben den Signalen der Proben aus der ARA Frankfurt-Sindlingen die Ergebnisse von weiteren Untersuchungen mit Abwasserproben aus den Abwasserreinigungsanlagen Frankfurt-Niederrad und Kriftel dargestellt. Bei der Probe vom 20.01.03 aus der ARA Frankfurt-Sindlingen wurde nach 22 min $2,5 \text{ g L}^{-1}$ Allylthioharnstoff zudosiert, bei der Probe vom 29.01.03 erfolgte die Hemmstoffdosierung nach 30 min. Zu der Testlösung vom 30.02.03 aus der ARA Frankfurt-Niederrad wurde bei $t = 15 \text{ min}$ und bei der Probelösung vom 24.10.03 aus der ARA Kriftel bei $t = 34 \text{ min}$ der Hemmstoff zudosiert.

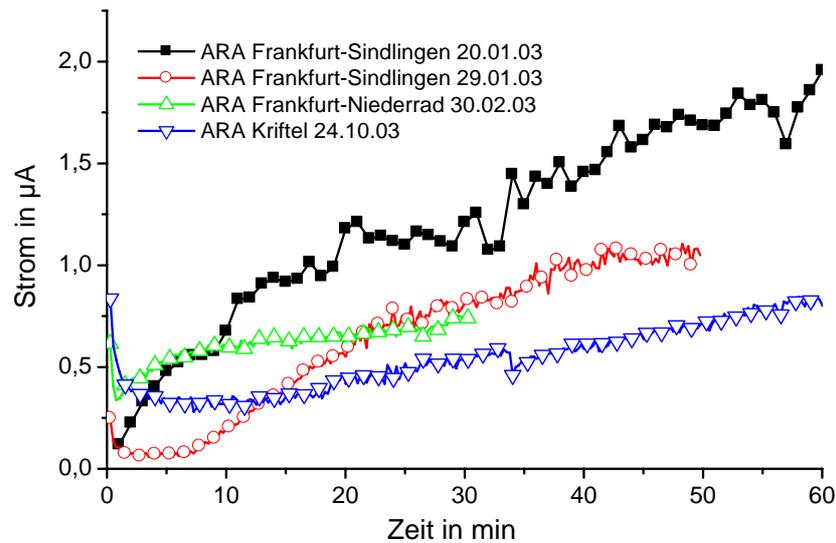


Abbildung 5-46: Selektive Bestimmung der hetero- und autotrophen Aktivität

In den dargestellten Kurvenverläufen war jeweils ein deutlicher Anstieg des Stromsignals zu erkennen, die Dosierung des Allylthioharnstoffs zeigte keinen signifikanten Einfluss auf die Signale. Die mikrobielle Aktivität der Proben aus der ARA Kriffel wurde ebenfalls mittels Sauerstoffzehrungsmessung bestimmt, auch hier konnte durch die Dosierung des ATH keine signifikante Änderung des Messsignals festgestellt werden. Um einen Einfluss von Substratmangel auszuschließen, wurde zu den Proben in einer weiteren Versuchsreihe bei der Probennahme eine Ammonium-Lösung als Substrat zudosiert. Die Ergebnisse zeigten allerdings weiterhin keinen Einfluss des Nitrifikationshemmstoffs.

5.4.2 Quantitative Bestimmung der Hemmwirkung auf Belebtschlamm

Die quantitative Hemmwirkung von Natriumfluorid, Quecksilber(II)-chlorid, Kaliumcyanid und Natriumazid auf die Mikroorganismen des Belebtschlammes wurde mit dem potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystem untersucht. Für diese Untersuchungen wurde Belebtschlamm aus der zweiten Stufe der ARA Frankfurt-Niederrad eingesetzt, dieser wurde durch Sedimentation um den Faktor 4 aufkonzentriert und mit 0,2 mM HNQ vermischt. Die Hemmstoffe wurden ca. 15 min nach dem Versuchsstart in den Reaktor dosiert und der Strom für weitere 15 min aufgezeichnet. Die Abbildung 5-47A zeigt den Stromfluss nach der Dosierung von verschiedenen Konzentrationen an Kaliumcyanid in den Reaktor.

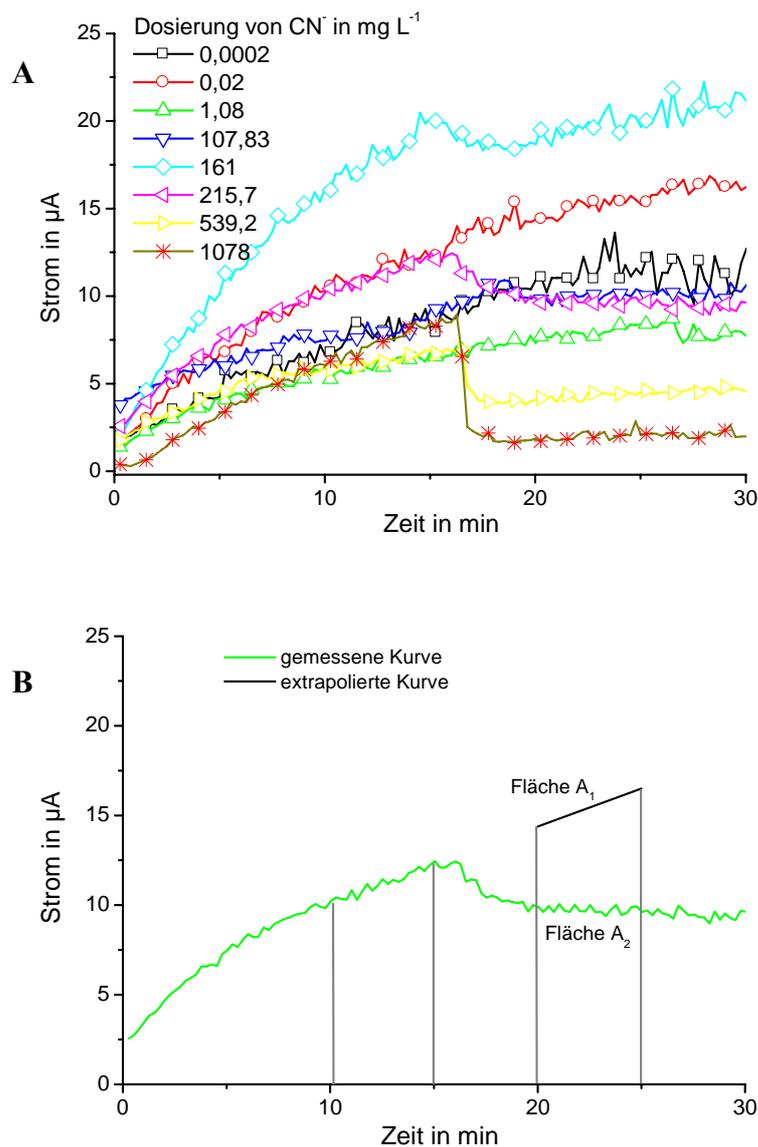


Abbildung 5-47: A - Wirkung von Kaliumcyanid auf die Aktivität von Belebtschlamm bei Untersuchungen im 3-Elektrodensystem, B – Bestimmung der quantitativen Hemmwirkung (Erläuterung im Text)

Durch die Dosierung von geringen Konzentrationen des Cyanids wurde das Stromsignal nicht beeinflusst. Bei höheren Cyanid-Konzentrationen war eine deutliche Verringerung des Stromflusses nach der Hemmstoffdosierung zu erkennen, die Dosierung hoher Konzentrationen bewirkte einen sofortigen Abfall des Stromflusses.

Zur quantitativen Auswertung (Abbildung 5-47 B) der gemessenen Stromsignale wurden die Steigungen vor der Hemmstoffdosierung (10 - 15 min) ermittelt und diese Steigungen in den Bereich zwischen 20 und 25 min extrapoliert; diese Kurve wurde anschließend integriert (Fläche A_1). Die tatsächliche Fläche der Stromkurve in diesem Zeitfenster (A_2) wurde mittels der Formel 5-14 ins Verhältnis zur extrapolierten Fläche A_1 gesetzt. Damit wird eine Normie-

rung auf die Messsignale vor einer Hemmstoffdosierung erreicht und der jeweilige Aktivitätszustand der Mikroorganismen berücksichtigt.

$$\text{Hemmung in \%} = \frac{A_1 - A_2}{A_1} \cdot 100$$

Formel 5-14: Bestimmung der Hemmwirkung auf Belebtschlamm (Erläuterungen im Text)

Die erhaltenen Daten wurden in einer halb-logarithmischen Auftragung gegen die Konzentration des Hemmstoffes dargestellt, zur Ermittlung der quantitativen Hemmwirkung wurden die Signale mittels einer logistischen Gleichung (siehe 9.2) ausgewertet; man erhält für die Dosis-Wirkungsbeziehung den EC_{50} in mg L^{-1} . Der EC_{50} ist die Konzentration, die eine berechnete oder interpolierte Hemmung um 50 % bewirkt. In der Abbildung 5-48 sind die entsprechenden Kurvenverläufe für die Wirkung von Cyanid, Fluorid, Quecksilber und Azid auf Belebtschlamm dargestellt.

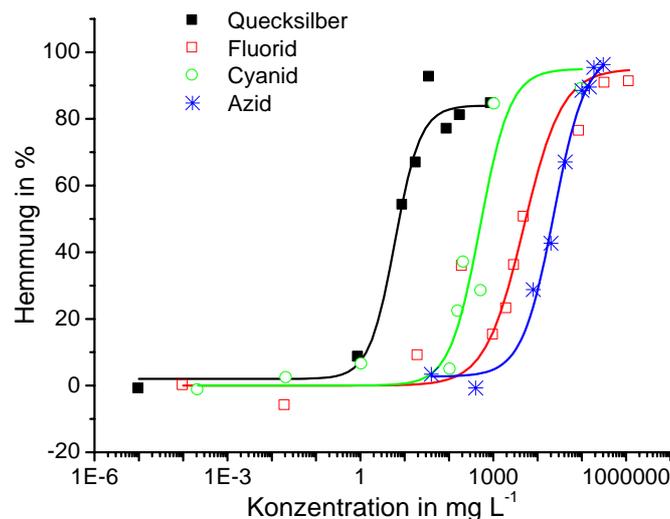


Abbildung 5-48: Quantitative Hemmwirkung von Cyanid, Fluorid, Quecksilber(II) und Azid auf Belebtschlamm

Es ergaben sich für die Dosis-Wirkungskurven sigmoidale Kurvenverläufe, bei niedrigen Hemmstoff-Konzentrationen zeigten die Dosierungen keine Wirkung auf das Aktivitätssignal. Bei mittleren Konzentrationen zeigte sich ein linearer Zusammenhang zwischen der Hemmstoff-Konzentration und der Abnahme der mikrobiellen Aktivität. Wenn eine maximale Hemmung erreicht war, zeigten höhere Konzentrationen keinen weiteren Einfluss auf das Stromsignal. Die Tabelle 5-12 zeigt die ermittelten EC_{50} Werte für die getesteten Substanzen.

Tabelle 5-12: Hemmwirkung von Cyanid, Fluorid, Quecksilber(II) und Azid auf Belebtschlamm

Substanz	EC ₅₀ in mg L ⁻¹
Cyanid	483 ± 106
Fluorid	4870 ± 1400
Quecksilber	6,4 ± 2,4
Azid	23200 ± 1970

In einer weiteren Versuchsreihe wurde die Dosis-Wirkungsbeziehung von Azid auf Zellen von *Pseudomonas fluorescens* untersucht, der EC₅₀ Wert betrug hier 390 ± 45 mg L⁻¹. Damit beträgt der EC₅₀ bei den Pseudomonaden lediglich 1,7 % des Wertes bei Einsatz des Belebtschlammes, obwohl die Pseudomonaden wesentliche Bestandteile der Belebtschlamm-Biozönose sind.

5.5 Praxistest des Prototypen

Nach den erfolgreichen Erprobungen des Bioaktivitätssensors zur Detektion der mikrobiellen Aktivität von Modellorganismen (siehe 5.2) haben die Untersuchungen mit Belebtschlammorganismen im Labormaßstab die Eignung des Sensors auch für diesen Anwendungsbereich gezeigt (siehe 5.3). In einer dritten Stufe der Untersuchungen sollte nun die praktische Anwendung auf kommunalen und industriellen Abwasserreinigungsanlagen getestet werden. Für diesen Einsatz war eine Modifikation des Laboraufbaus notwendig, um das System an die Gegebenheiten auf den Abwasserreinigungsanlagen anzupassen. Die Konstruktion der Prototypen ist unter 4.3.8 beschrieben. Zur Überprüfung der Eignung der Prototypen unter nicht idealisierten Bedingungen und damit zur Untersuchung der Praxistauglichkeit wurden Erprobungen auf kommunalen und industriellen Kläranlagen durchgeführt. Die Auswahl der Abwasserreinigungsanlagen (ARA) erfolgte nach den Gesichtspunkten der Ausbaugröße, der Betriebsweise und der vorhandenen Mess- und Regelungstechnik.

5.5.1 Kommunale Kläranlagen

5.5.1.1 ARA Frankfurt-Niederrad

Die ARA Niederrad reinigt das in den Städten Frankfurt am Main, Offenbach, Neu-Isenburg und Steinbach/Taunus anfallende Abwasser, hinzu kommt das Abwasser der Stadtteile Maintal-Bischofsheim, Kronberg-Oberhöchstadt und Eschborn-Niederhöchstadt. Die Anlage ist für 1.350.000 Einwohnerwerte (EW) ausgelegt, in den biologischen Stufen werden

320.400 m³ d⁻¹ Abwasser gereinigt. Die erste biologische Stufe hat ein Gesamtvolumen von 23.300 m³, betrieben wird die Anlage mit einem Feststoffgehalt von 4 kg m⁻³ bei einer Schlammbelastung von 0,65 kg BSB₅ kg_{TS}⁻¹ d⁻¹. Die Verweilzeit des Abwassers in der ersten Stufe beträgt 1,75 h, hier findet der Abbau an Kohlenstoffverbindungen statt. Die zweite biologische Stufe dient der Nitrifikation, bei einem Gesamtvolumen von 25.360 m³ beträgt die mittlere Verweilzeit 4,3 h. Der Feststoffgehalt in der zweiten Stufe beträgt 6 kg m⁻³ bei einer Schlammbelastung von 0,11 kg BSB₅ kg_{TS}⁻¹ d⁻¹.

Die Messung mit dem BAS erfolgte im Ablauf der zweiten biologischen Stufe, die örtlichen Gegebenheiten auf der ARA ermöglichten einen Aufbau in einem Analysencontainer an einer Druckleitung mit einem Druck von ca. 2 bar, so dass die Durchströmung des BAS ohne den Einsatz der integrierten Pumpe durchgeführt wurde.

In der Abbildung 5-49 ist beispielhaft ein Versuchsergebnis der Messung mit dem Prototypen dargestellt.

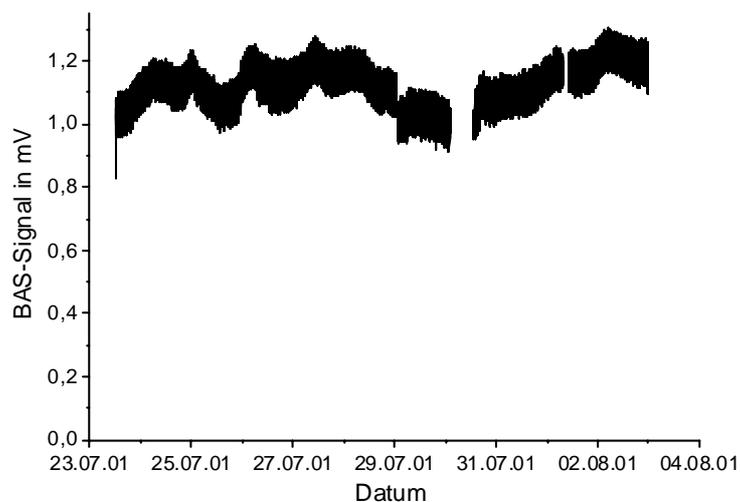


Abbildung 5-49: Signale des BAS im Ablauf der zweiten biologischen Stufe der ARA Frankfurt-Niederrad vom 23.07.01 bis 02.08.01

In dem dargestellten Zeitraum von 11 d kam es nur zu geringen Änderungen des Signals des BAS, die Schwankungen des Signals lagen in einem Bereich von ca. 10 %. Trotz der im Tagesgang einer kommunalen Kläranlage üblichen Schwankungen im Zulauf der Anlage sind in dem BAS-Signal keine periodischen Schwankungen zu erkennen. Der dargestellte Signalverlauf ist typisch für die gemessenen Signale auf der ARA Niederrad, eine statistische Auswertung des 99 d dauernden Testlaufs zeigt die Tabelle 5-13.

In diesem Zeitraum wies das BAS-Signal einen Mittelwert von $0,97 \pm 0,19$ mV auf. Daneben wurden während der Untersuchungen drei relevante Änderungen der mikrobiellen Aktivität mit dem Aktivitätssensor detektiert:

- ein Ausfall der Belüftung (Abbildung 5-50)
- ein andauerndes Regenereignis (Abbildung 5-51)
- ein Regenereignis mit starkem Absinken der Temperatur (Abbildung 5-52).

Tabelle 5-13: Testläufe auf der ARA Frankfurt-Niederrad

Statistische Auswertung	
Messdauer	99 d
Mittelwert	0,97 mV
Standardabweichung	+/- 0,19 mV +/- 19 %
Minimum	0,52 mV
Maximum	1,34 mV

In dem Testlauf vom 18.07.01 bis zum 20.07.01 (Abbildung 5-50) war ein starkes Absinken des BAS-Signals zu erkennen, dieses wurde durch einen Ausfall der Belüftung in der zweiten Stufe hervorgerufen. Durch den fehlenden Lufteintrag kam es schnell zu einer Verarmung an Sauerstoff. Durch den Mangel an Sauerstoff fand keine Umsetzung des Ammoniums mehr statt, es waren folglich auch erhebliche Konzentrationen an Ammonium im Ablauf dieser Stufe nachweisbar. Im weiteren Verlauf kam es weiterhin zu einem Ausfall der Messdatenspeicherung im Leitsystem der ARA, daher liegen keine weiteren Werte für den Verlauf der Ammonium-Konzentrationen vor. Nach der Wiederherstellung der Belüftung stieg das Signal des BAS wieder an und die Oxidation des Ammoniums lief wieder vollständig ab, es war daher kein NH_4N im Ablauf der Anlage mehr nachweisbar.

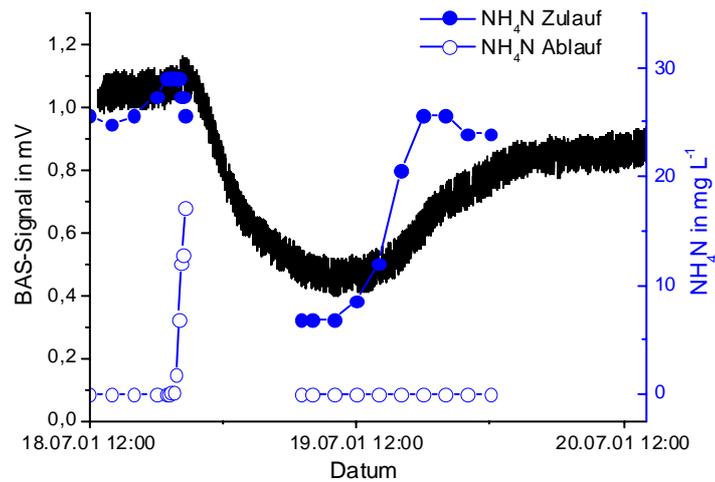


Abbildung 5-50: BAS-Signal sowie Ammonium-Konzentration im Zu- und Ablauf während eines Ausfalles der Belüftung in der zweiten biologischen Stufe der ARA Niederrad

Der Einfluss von extremen Änderungen der Substratkonzentration auf die Aktivität der Mikroorganismen ist in der Abbildung 5-51 dargestellt. Durch ein starkes, andauerndes Regenereignis in dem betrachteten Zeitraum kam es zu einer extremen Verdünnung des Abwassers und damit zu einer verringerten Konzentration an Ammonium im Zulauf der zweiten Stufe der ARA. Durch dieses fehlende Substrat für einen längeren Zeitraum sank die gemessene Aktivität der Nitrifikanten ab. Mit steigenden Konzentrationen im Zulauf stieg auch das Signal des BAS wieder an.

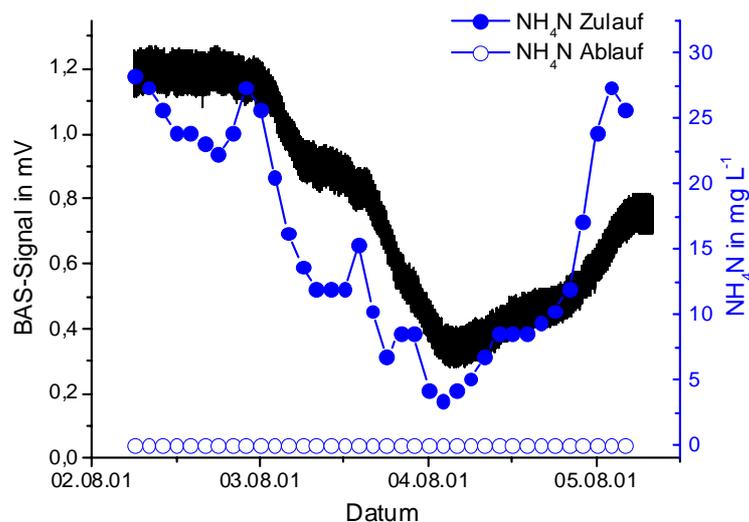


Abbildung 5-51: BAS-Signal sowie Ammonium-Konzentration im Zu- und Ablauf während eines starken dauerhaften Regenfalls in der zweiten biologischen Stufe der ARA Niederrad

In der Abbildung 5-52 sind ein Regenereignis im Winter und die daraus resultierenden Signaländerungen für die mikrobielle Aktivität und die Temperatur sowie die Konzentration des Ammoniums im Zu- und Ablauf der Anlage dargestellt.

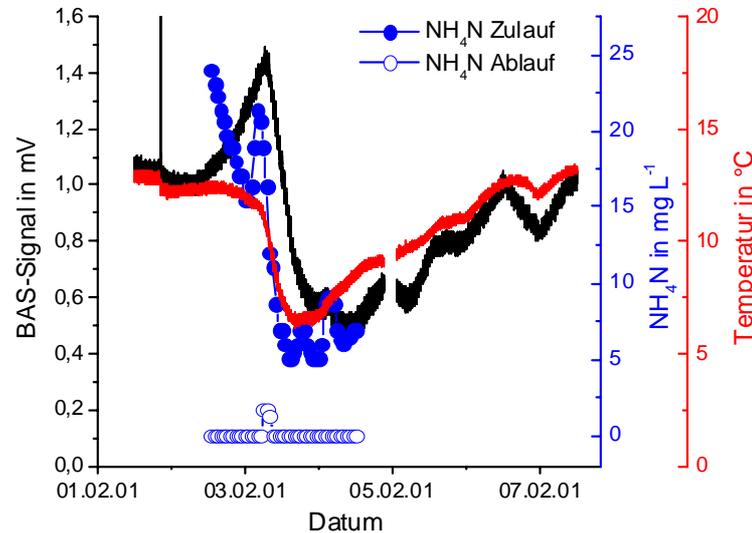


Abbildung 5-52: BAS-Signal, Temperatur sowie Ammonium-Konzentration im Zu- und Ablauf während eines Regenereignisses im Winter in der zweiten biologischen Stufe der ARA Niederrad

In der Zeit vor dem dargestellten Ereignis fand relativ lange kein Regenereignis mehr statt, daher kam es mit dem Beginn zu einem Anstieg der Konzentration an Ammonium, dieses Substrat stammte aus der Resuspendierung von Ablagerungen aus den Abwasserkanälen. Als Folge dieses Substratstoßes wurde ein Anstieg des BAS-Signals registriert. Durch den kalten Abwasserzulauf sank die Temperatur in dem Nitrifikationsbecken unter 10 °C, wird diese Temperatur unterschritten, ist keine vollständige Nitrifikation mehr möglich (siehe 3.2.2). Daher sank das Signal des BAS stark ab und es waren geringe Mengen an Ammonium im Ablauf der Anlage nachweisbar. Gleichzeitig trat mit dem weiter zulaufenden Regenwasser eine starke Verdünnung des vorhandenen Substrates auf, welche ebenfalls zu einem Absinken der mikrobiellen Aktivität beigetragen hat. Mit steigender Temperatur stiegen auch die Aktivität der Nitrifikanten und damit das Signal des BAS wieder an.

5.5.1.2 ARA Frankfurt-Sindlingen

Die ARA Sindlingen hat eine Kapazität von 470.000 Einwohnerwerten. Sie reinigt die Abwässer der Frankfurter Stadtteile Sindlingen, Zeilsheim, Höchst, Unterliederbach, Sossenheim, Nied, des Abwasserverbandes Vordertaunus sowie von Kelsterbach und Flughafen-West.

Die Anlage verfügt über eine zweistufige biologische Reinigung mit einem täglichen Zufluss von 78.700 m^3 Abwasser. Das Gesamtvolumen der ersten Stufe beträgt 5.760 m^3 , betrieben wird die Anlage mit einem Feststoffgehalt von 4 kg m^{-3} bei einer Schlammbelastung von $0,73 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}_{\text{TS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Verweilzeit des Abwassers in der ersten Stufe beträgt $1,75 \text{ h}$, hier findet im Wesentlichen der aerobe Abbau an Kohlenstoffverbindungen statt. Die zweite biologische Stufe dient der Nitrifikation, bei einem Gesamtvolumen von 14.130 m^3 beträgt die mittlere Verweilzeit $4,3 \text{ h}$. Der Feststoffgehalt in der zweiten Stufe beträgt 3 kg m^{-3} bei einer Schlammbelastung von $0,07 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}_{\text{TS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Die Messung mit dem BAS erfolgte im Ablauf der zweiten biologischen Stufe, die örtlichen Gegebenheiten auf der ARA ermöglichten einen Aufbau des Prototypen in einem Analysencontainer direkt an einer Abwasserdruckleitung. Hier wird das Abwasser mit ca. 1 bar Überdruck durch den Sensor geleitet. Die Abbildung 5-53 zeigt ein typisches Ergebnis eines Testlaufes.

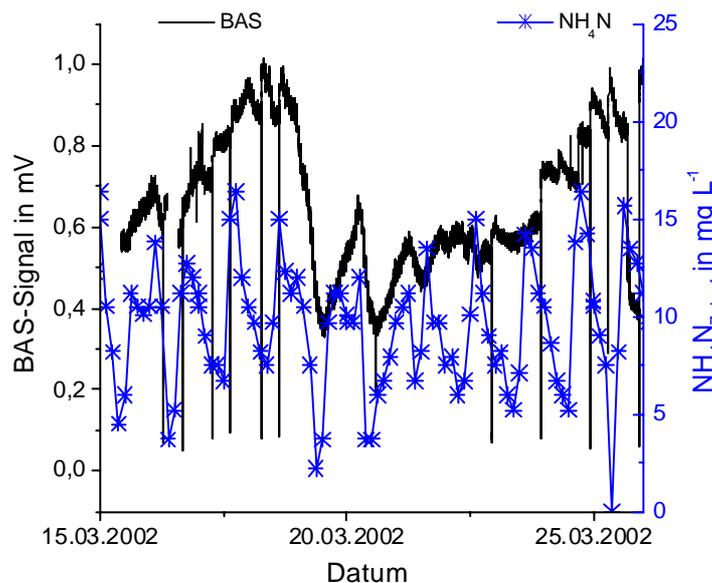


Abbildung 5-53: BAS-Signal und Ammonium-Konzentration im Zulauf der zweiten biologischen Stufe der ARA Sindlingen

Während des betrachteten Zeitraumes kam es zu keiner extremen Änderung in dem Ablauf des biologischen Reinigungsprozesses und dementsprechend auch nicht in der gemessenen mikrobiellen Aktivität. Es zeigten sich allerdings stärkere Schwankungen in dem BAS-Signal als bei den Untersuchungen in der ARA Frankfurt-Niederrad, welche sich nicht direkt mit dem Substratgehalt im Zulauf der Anlage korrelieren ließen. Die Konzentration an Ammonium änderte sich in einem typischen Tagesgang zwischen 4 und 17 mg L^{-1} .

In der Tabelle 5-14 ist eine statistische Zusammenfassung der durchgeführten Untersuchungen dargestellt. In dem Testzeitraum von 32 d betrug der Mittelwert des BAS-Signals 0,81 mV und wies Schwankungen von $\pm 28\%$ auf. Der Mittelwert des BAS-Signals war hier geringer als auf der Anlage in Frankfurt-Niederrad und zeigte größere Schwankungen. Der niedrigere Mittelwert korreliert mit einer niedrigeren Schlammbelastung von $0,07 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}_{\text{TS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in Sindlingen verglichen mit einem Wert von $0,11 \text{ BSB}_5 \text{ kg}_{\text{TS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$ in Niederrad.

Tabelle 5-14: Testläufe auf der ARA Frankfurt-Sindlingen

Statistische Auswertung	
Messdauer	32 d
Mittelwert	0,81 mV
Standardabweichung	+/-0,23 mV +/- 28 %
Minimum	0,37 mV
Maximum	1,32 mV

In der Abbildung 5-54 sind zwei Tagesgänge in der zweiten Stufe der ARA Frankfurt-Sindlingen dargestellt. Hier ist ein häufig auftretender Verlauf des BAS-Signals auf dieser Anlage zu erkennen.

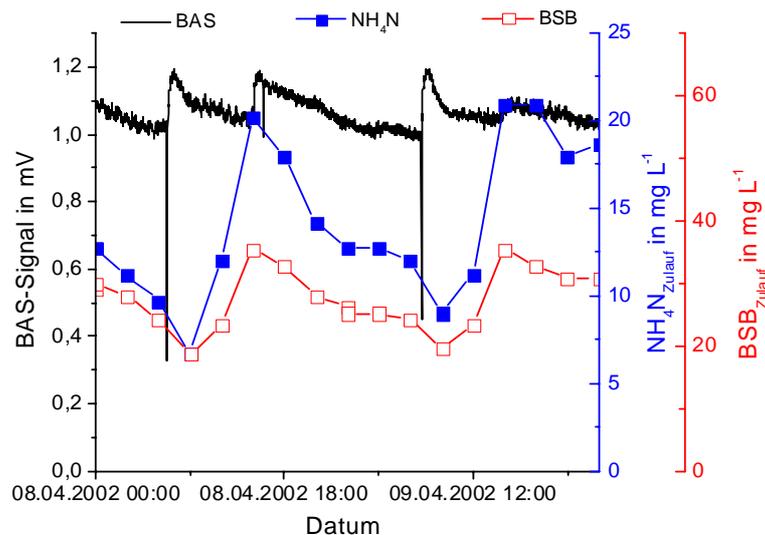


Abbildung 5-54: BAS-Signal sowie Ammonium- und BSB-Konzentration im Zulauf der zweiten biologischen Stufe der ARA Sindlingen am 08.04.02 sowie 09.04.02

Es kam nach einem sehr starken, kurzen Absinken zu einem Anstieg des Signals, im weiteren Verlauf erreichte es nach ca. 3 h wieder den Ausgangswert. In der Abbildung ist dieser Effekt am 08.04.02 um 06:51 und 15:03 sowie am 09.04.02 um 07:09 zu erkennen. Diese Änderungen lassen sich nicht auf Änderungen der Ammonium- und BSB-Konzentration im Zulauf der Anlage zurückführen. Das häufige reproduzierbare Auftreten dieses Effekts weist aber auf einen, zurzeit noch unbekanntem, Einflussfaktor auf die mikrobielle Aktivität hin.

5.5.1.3 ARA Kriftel

In der Abwasserreinigungsanlage der Gemeinde Kriftel werden die Abwässer der Stadt Hofheim und des Stadtteils Marxheim sowie der Gemeinde Kriftel gereinigt, betrieben wird die Anlage vom Schwarzbachverband Main-Taunus. Die ARA ist für 49.000 EW angelegt, es werden bei Trockenwetter täglich 13.500 m³ und bei Regenwetter 25.900 m³ Abwasser gereinigt. Die biologische Reinigung erfolgt in einem zweistrassigen Belebungsbecken mit Nitrifikation und Denitrifikation. Der Zulauf des vorgeklärten Abwassers erfolgt in der Denitrifikationsstufe (2 x 1300 m³), anschließend gelangt das Abwasser in die Nitrifikation (2 x 2300 m³). Der Feststoffgehalt beträgt 3,7 kg m⁻³ bei einer Schlammbelastung von 0,031 kg BSB₅ kg_{TS}⁻¹ d⁻¹.

Die Messung mit dem Prototyp des BAS erfolgte sowohl in der anoxischen als auch in der aeroben Stufe der Reinigungsanlage. Der Aufbau der Sensoren erfolgte im Gegensatz zu den Anlagen in Frankfurt im Freien und direkt an der biologischen Stufe.

Die Abbildung 5-55 A zeigt das BAS-Signal im Zeitraum vom 15.09.03 bis zum 25.10.03 und die Abbildung 5-55 B das Signal des BAS und die Ammonium-Konzentration in dem Zeitraum vom 20.09.03 bis zum 21.09.03.

Die Abbildung 5-55 A zeigt, dass sich die BAS-Signale während des Versuches deutlich geändert haben, wobei der Mittelwert der Messungen deutlich niedriger lag als in den Anlagen in Frankfurt. In der anoxischen Stufe der Abwasserreinigung der ARA Kriftel wurde für 31 d der Bioaktivitätssensor getestet, in diesem Zeitraum betrug der Mittelwert des BAS-Signals 31 µV, bei einem maximalen Wert von 190 µV. Die Änderungen des BAS-Signals sind gemäß der Abbildung 5-55 B auf die entsprechenden Schwankungen im Zulauf der Anlage zurückzuführen. Das Ammonium wird in der anoxischen Stufe nicht abgebaut und gelangt anschließend in die aerobe Stufe. Hier erfolgt die Oxidation zu Nitrat, dieses wird anschließend in das vorgeschaltete Denitrifikationsbecken zurückgeführt. Damit kann das Ammonium indirekt als Substrat der Denitrifikanten angesehen werden. Für die Analyse der Ergebnisse auf der ARA Kriftel wurde dieser Parameter herangezogen, da keine online

Messwerte für Nitrat-Stickstoff vorlagen. Es zeigte sich während der Versuche jeweils nach einer erhöhten Konzentration an Ammonium ein Anstieg des BAS-Signals. Damit kann der Anstieg des BAS-Signals als Folge der Änderungen der Konzentration an zurückgeführtem Nitrat-Stickstoff angesehen werden und das Ergebnis stimmt damit mit den Untersuchungen unter 5.3.3 überein. Im Ablauf des Denitrifikationsbeckens wurde täglich die Nitratkonzentration bestimmt; am 20.09. wurde eine Konzentration von $< 0,23 \text{ mg L}^{-1}$ und am 21.09. von $0,93 \text{ mg L}^{-1}$ an NO_3N gemessen. Der Einsatz des BAS in der nachgeschalteten aeroben Stufe hat ebenfalls geringe Signalthöhen des BAS aufgezeigt, während des 18-tägigen Testlaufs in dieser Stufe betrug der Mittelwert lediglich $16 \mu\text{V}$ und wies nur geringe Schwankungen auf.

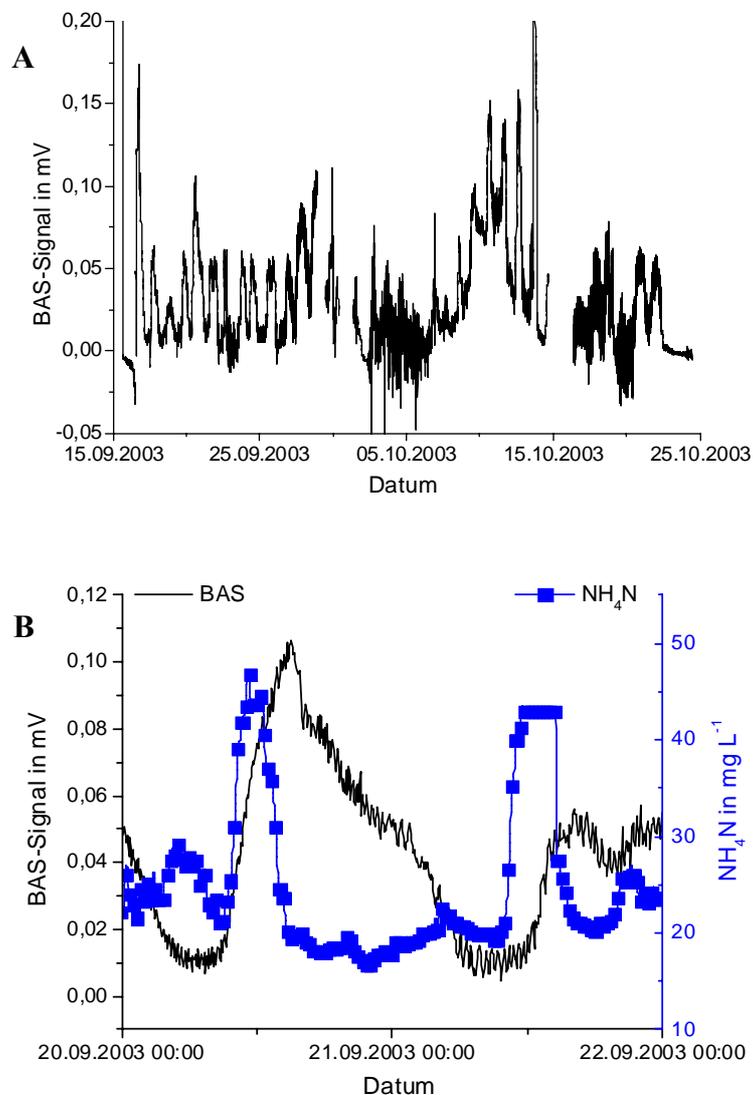


Abbildung 5-55: A - Signale des BAS in der anoxischen Stufe der ARA Kriftel, B - BAS-Signal und Ammoniumkonzentration am 20.09.03 und 21.09.03

Die Erprobung des Sensorsystems auf der ARA Kriftel hat gezeigt, dass bei Abwasserreinigungsanlagen geringerer Ausbaugröße als die Anlagen in Frankfurt-Niederrad und -Sindlingen Tagesganglinien im Signalverlauf zu erkennen sind. Die praktischen Erfahrungen aus dem Betrieb auf der ARA Kriftel haben die Notwendigkeit des Einsatzes eines Grobfilters im Zulauf des Sensors gezeigt, da es ohne einen solchen Filter häufig im Ansaugbereich und in den Schlauchleitungen zu Verblockungen gekommen ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass der Prototyp generell für einen Aufbau im Freien geeignet ist.

5.5.1.4 ARA Kelkheim-Ruppertshain

Die Kläranlage reinigt die Abwässer des Kelkheimer Stadtteils Ruppertshain und wird vom Schwarzbachverband Main-Taunus betrieben. Die Anlage ist für 4.950 EW ausgelegt, derzeit sind 2.800 EW angeschlossen. Der Feststoffgehalt beträgt $6,4 \text{ kg m}^{-3}$ bei einer Schlammbelastung von $0,015 \text{ kg BSB}_5 \text{ kg}_{\text{TS}}^{-1} \text{ d}^{-1}$. Die Anlage arbeitet mit einer simultanen Nitrifikation und Denitrifikation nach dem SymBio-Verfahren der Fa. SHW Hölter Wassertechnik GmbH, Hecklingen. Hierbei wird der Sauerstoffeintrag in Abhängigkeit von der Belebtschlammaktivität und damit von der Belastung geregelt, die Messung der Aktivität erfolgt dabei mit einer NADH-Messsonde. Bei niedrigen Sauerstoffkonzentrationen bildet sich innerhalb der Schlammflocken ein Sauerstoffgefälle aus, so dass im Flockeninneren eine anoxische Zone zur Denitrifikation und im äußeren Bereich eine aerobe Zone zur Nitrifikation entsteht. Die Vorteile des SymBio-Verfahrens liegen laut Herstellerangaben in der hohen Betriebssicherheit und optimalen Kontrolle und Regelung der Nitrifikation und Denitrifikation durch die Messung der Belebtschlammaktivität. Die Prozesssteuerung ermöglicht eine Minimierung des Energieverbrauches für die Belüftung auf das erforderliche Maß bei einer ausreichenden Versorgung der Biozönose mit Sauerstoff. Die Messsonde misst die NADH-Fluoreszenz, die Konzentration an NADH ändert sich in Abhängigkeit von dem metabolischen Zustand der Zellen. Die Messung der NADH-Fluoreszenz zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in der biologischen Abwasserreinigung wurde unter anderem von ISAACS und HENZE (1994) sowie LEE et al. (2002) eingesetzt. Durch parallelen Einsatz der NADH-Messsonde und des BAS sollten mögliche Zusammenhänge zwischen diesen Signalen untersucht und damit auch die Eignung des BAS zur Regelung der Sauerstoffkonzentration analog dem SymBio-Verfahren gezeigt werden. Die Abbildung 5-56 A zeigt die Signale des BAS in dem Zeitraum vom 25.11.03 bis zum 07.12.03 und die Abbildung 5-56 B die Signale des BAS und der NADH-Messsonde vom 30.11. und dem 01.12.03.

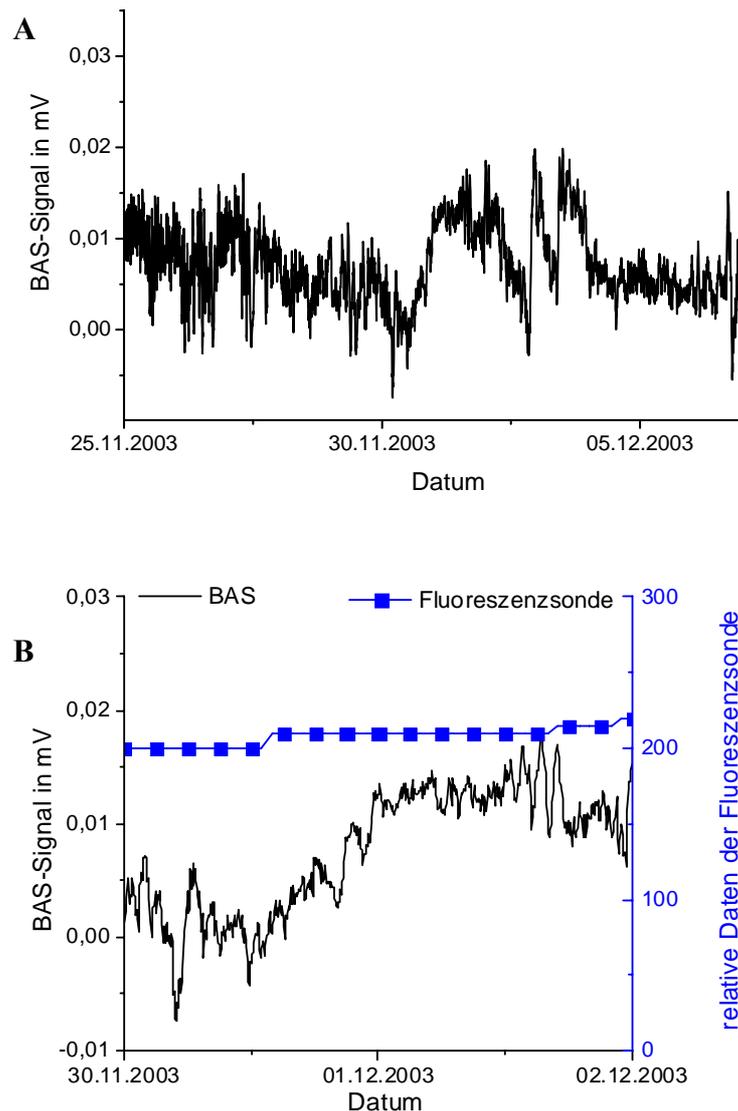


Abbildung 5-56: A - Signale des BAS-Sensors auf der ARA Kelkheim-Ruppertshain in dem Zeitraum vom 25.11.03 bis zum 07.12.03, B – Vergleich der Signale des BAS und der NADH-Messsonde vom 30.11. und dem 01.12.03

Der Bioaktivitätssensor wurde für 14 d auf der ARA Kelkheim-Ruppertshain getestet, in diesem Zeitraum waren nur minimale Änderungen des BAS-Signals festzustellen, der Mittelwert der Messung betrug $8 \mu\text{V}$ und liegt damit unter der Nachweisgrenze des Sensorssystems nach 5.1.1. Daher wurde eine Funktionskontrolle des Sensorsystems mit DIN-Abwasser (4.2.11) und dem vorhandenen Belebtschlamm aus der Abwasserreinigungsanlage durchgeführt. Dazu wurde 1 L Medium mit 100 mL Belebtschlamm angeimpft und dieses Medium über einen Kompressor (Fa. KNF Neuberger, Freiburg) belüftet. Das Abwasser-Belebtschlamm-Gemisch wurde für 24 h im Kreislauf durch den Sensor geführt und vermessen. Die resultierenden Ergebnisse waren mit den unter 5.3.1 gezeigten Untersuchungen

vergleichbar. Dies bedeutet, dass die Funktionsfähigkeit des BAS gegeben war und damit auch dass die gemessenen Signale den Aktivitätszustand der Mikroorganismen der ARA Kelkheim-Ruppertshain aufzeigen. Die Abbildung 5-56 B zeigt, dass das Signal der NADH-Messsonde in dem betrachteten Zeitraum sich ebenfalls nicht geändert hat. Aufgrund der geringen Größe der Abwasserreinigungsanlage Kelkheim-Ruppertshain wären Änderungen der mikrobiellen Aktivität aufgrund der Schwankungen im Zulauf zu erwarten gewesen. Diese Änderungen werden durch die beschriebene Regelung ausgeglichen und die Biomasse in einem Zustand von geringer Aktivität gehalten.

5.5.1.5 Kläranlage Messel

In der Kläranlage der Gemeinde Messel erfolgt die Abwasserreinigung nach dem SBR-Prinzip (sequencing batch reactor). Die Anlage ist für 4.800 EW ausgelegt und besitzt zwei Reaktoren mit jeweils 1588 m³, welche abwechselnd beschickt werden. Die Reinigung erfolgt nicht, wie bei kontinuierlichen Anlagen, entlang einer räumlichen, sondern entlang einer zeitlichen Achse. Die Reinigungsprozesse sowie die Abtrennung des gereinigten Abwassers vom Belebtschlamm finden nacheinander in einem Becken statt. Ein allgemeiner Reinigungszyklus dieses Verfahrens enthält fünf unterschiedliche Phasen, diese Phasen lassen sich wie folgt charakterisieren:

1. Füllen: Es befindet sich bereits sedimentierter Belebtschlamm und nicht abdekantiertes Klarwasser aus dem vorherigen Zyklus im Becken, während frisches Abwasser hinzufließt. Dadurch erhöht sich die Nährstoffkonzentration im Becken.
2. Mischen: Die Mischphase bringt die Belebtschlammorganismen mit dem Abwasser in Kontakt. Es herrschen anaerobe oder anoxische Verhältnisse, je nachdem, ob Nitratsauerstoff zur Verfügung steht. In dieser Phase erfolgt entsprechend ein Anstieg der Aktivität der Denitrifikanten, unter anaeroben Bedingungen kann auch eine biologische Phosphatelimination stattfinden.
3. Belüften: Im aeroben Milieu vollzieht sich zuerst der Kohlenstoffabbau durch die heterotrophen Organismen, anschließend findet die autotrophe Nitrifikation statt.
4. Absetzen: Nun werden Rührwerk und Belüfter ausgeschaltet. In dieser Phase sedimentiert der Belebtschlamm und das gereinigte Abwasser bildet den Überstand.
5. Abzug: Im Anschluss wird dieses Klarwasser aus dem Reaktor abgezogen und ein weiterer Zyklus kann beginnen.

Neben diesem typischen Ablauf des Reinigungsprozesses werden in der Kläranlage Messel auch Pausen-Phasen sowie Kombinationen der Phasen Belüften-Mischen, Füllen-Mischen

und Füllen-Belüften durchgeführt. Der Aufbau des Prototypen erfolgte hier an dem Reaktor 1, direkt an dem Becken wurde in einem spritzwassergeschützten Gehäuse eine externe Pumpe eingesetzt, da die in den Prototypen integrierte Pumpe nicht in der Lage war, das Abwasser aus einer Tiefe von 4 m zu fördern. Über eine ca. 12 m lange Schlauchleitung wurde das Abwasser-Belebtschlamm-Gemisch zu dem Sensor gefördert, der Prototyp war dabei in einem Gebäude aufgestellt. Die Abbildung 5-57 A zeigt den Verlauf des BAS-Signals und der Konzentration an Nitrat-Stickstoff in dem Zeitraum vom 13.12.03 00:00 bis zum 17.12.03 12:00 und die Abbildung 5-57 B einen Ausschnitt aus dem Tagesgang vom 15.12.03 mit dem Verlauf des BAS-Signals sowie den Konzentrationen an Nitrat-Stickstoff und Sauerstoff.

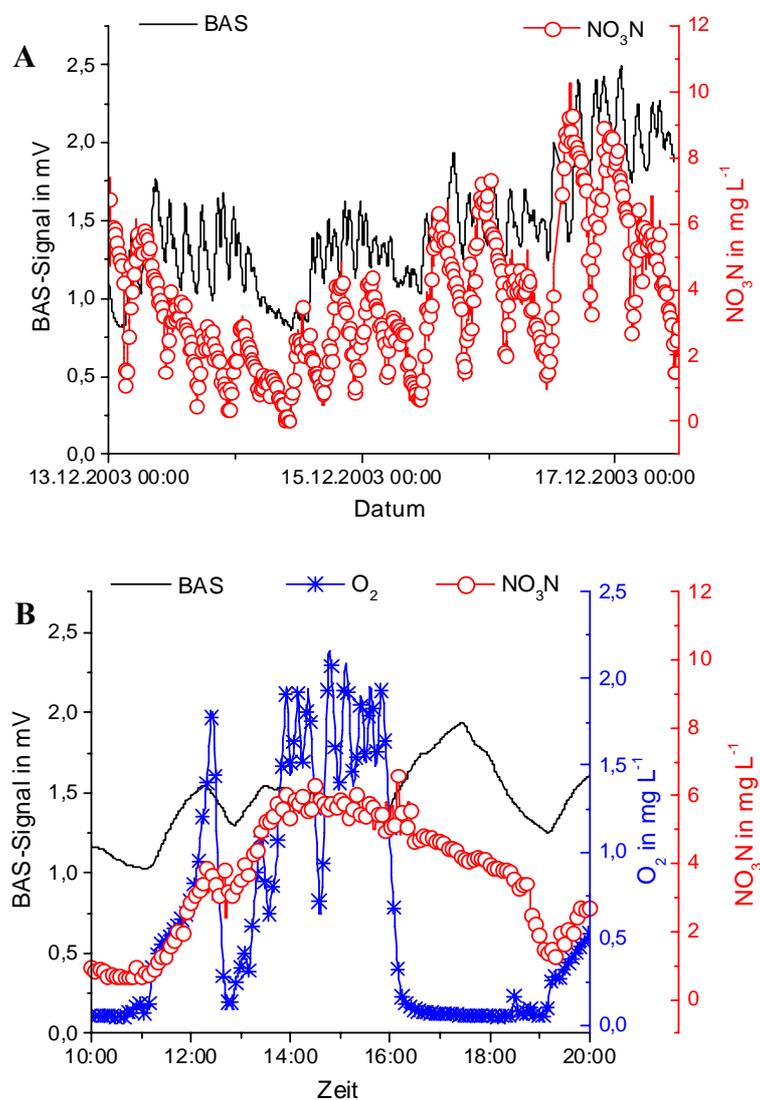


Abbildung 5-57: A - BAS-Signal und Konzentration an Nitrat-Stickstoff in dem Zeitraum vom 13.12.03 00:00 bis zum 17.12.03 12:00 auf der ARA Messel, B – Ausschnitt aus dem Tagesgang vom 15.12.03 mit dem BAS-Signal, der Nitrat-Stickstoff- und Sauerstoff-Konzentration

In der Darstellung A ist zu erkennen, dass der qualitative Verlauf des BAS-Signals mit dem Verlauf der Nitratkonzentration korreliert. Hierbei ist das Nitrat einerseits als Stoffwechselprodukt der Nitrifikanten anzusehen und andererseits als das Substrat der Denitrifikanten. In der Abbildung B ist um 11:10 ein Anstieg der Sauerstoffkonzentration zu erkennen. Durch die Belüftung setzten die Nitrifikationsvorgänge ein und es ist ein Anstieg der Nitratkonzentration zu erkennen; dementsprechend ließ sich auch ein Anstieg des BAS-Signals feststellen. In dieser Phase liefen neben den autotrophen auch die aeroben, heterotrophen Stoffwechselfvorgänge ab. Die aerobe Phase dauerte bis ca. 16:00, die Nitrat-Konzentration erreichte bei $t = 13:50$ einen Wert von 6 mg L^{-1} und blieb während der aeroben Phase auf diesem Niveau, dementsprechend war auch kein weiterer Anstieg des BAS-Signals mehr zu beobachten. Während der anoxischen Phase war ein Anstieg des BAS-Signals zu erkennen, dieser ist auf die Aktivität der Denitrifikanten zurückzuführen. In dieser Phase war weiterhin eine Abnahme der Nitratkonzentration zu erkennen. Um ca. 19:10 begann erneut die Belüftung der Anlage, es stiegen wiederum die Konzentration an Nitrat und das BAS-Signal an. Dieses Ergebnis zeigt, dass, entsprechend der Untersuchungen unter 5.3, das Sensorsystem geeignet ist, um die verschiedenen mikrobiellen Prozesse in einem SBR-Prozess zu messen.

Die praktischen Erfahrungen beim Einsatz des BAS-Prototypen auf der Kläranlage Messel haben gezeigt, dass aufgrund der notwendigen Förderhöhen eine stärkere Pumpe als die in dem Aufbau vorgesehene Pumpe notwendig ist. Ebenfalls zeigte sich, dass es durch die herrschenden Temperaturen zu einem Einfrieren der Schlauchleitungen kommen kann.

5.5.2 Überwachung von Betriebsabwässern in der chemischen Industrie

Als weiterer Einsatzort des Bioaktivitätssensors wurde die Überwachung der Betriebsabwässer des Werkes Ludwigshafen der BASF AG untersucht. In dem Werk Ludwigshafen werden in ca. 250 Produktionsstätten die unterschiedlichsten chemischen Produkte hergestellt und verarbeitet. Aufgrund dieser Vielfalt in den Produktionsprozessen fallen sehr unterschiedliche Abwasserteilströme an, welche die mikrobielle Aktivität in der nachgeschalteten Betriebskläranlage beeinflussen könnten. Zur Überwachung der Toxizität der Abwasserteilströme wird bei der BASF bereits seit 1975 ein Toximeter eingesetzt. In diesem Praxistest des BAS sollten die Ergebnisse der Aktivitätsmessung mit denen des etablierten Toximeters verglichen werden.

Das BASF-Toximeter ist vom Konzept her eine dynamische Modellkläranlage. Ein Teilstrom des neutralisierten Abwassers, das in die Kläranlage fließt, wird mechanisch vorgeklärt und über einen Sandfang in das 200 Liter fassende Belebungsbecken des Toximeters gepumpt.

Das Abwasser hat im aeroben Belebungsbecken eine mittlere Verweilzeit von etwa 16 h. Im anschließenden Nachklärbecken wird der Belebtschlamm durch Sedimentation von geklärtem Abwasser getrennt.

Die Alarmfunktion des Toximeters beruht auf dem Prinzip des Kurzzeitatmungstests. Im Belebungsbecken wird mit einer Elektrode die Sauerstoffkonzentration gemessen. In den Anreicherungsphasen wird Luft eingeblasen, bis ein oberer Grenzwert der Sauerstoffkonzentration von $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht ist. Dann wird die Luftzufuhr durch ein Magnetventil unterbrochen. In den folgenden Zehrungsphasen wird aus der Sauerstoffabnahme die Atmung der Mikroorganismen bestimmt. Wenn die Sauerstoffkonzentration einen unteren Grenzwert von $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ erreicht hat, wird wieder belüftet. Wenn die Atmung der Mikroorganismen durch einen Giftstoff gehemmt wird, gibt das Toximeter Alarm (PAGGA 1985).

Das Toximeter 1 dient zur Überwachung der Wirkung evtl. toxischer Stoffe auf die Betriebskläranlage, in dem Belebungsbecken des Toximeters laufen im Wesentlichen die aeroben, heterotrophen Stoffwechselprozesse ab. Das Toximeter 4 dient zur Kontrolle von Hemmwirkungen auf die Nitrifikanten.

5.5.2.1 Toximeter 1

Die Abbildung 5-58 A zeigt eine Zusammenfassung der mit dem Bioaktivitätssensor erzielten Ergebnisse in dem Toximeter 1. In dem Testzeitraum vom 14.11.2002 bis zum 25.04.2003 wurden an 131 d die Messungen mit dem Sensorsystem durchgeführt. Der Mittelwert der Messungen betrug $4,34 \text{ mV}$. Es wurden ein maximaler Wert von $6,94 \text{ mV}$ und ein minimaler Wert von $1,76 \text{ mV}$ gemessen.

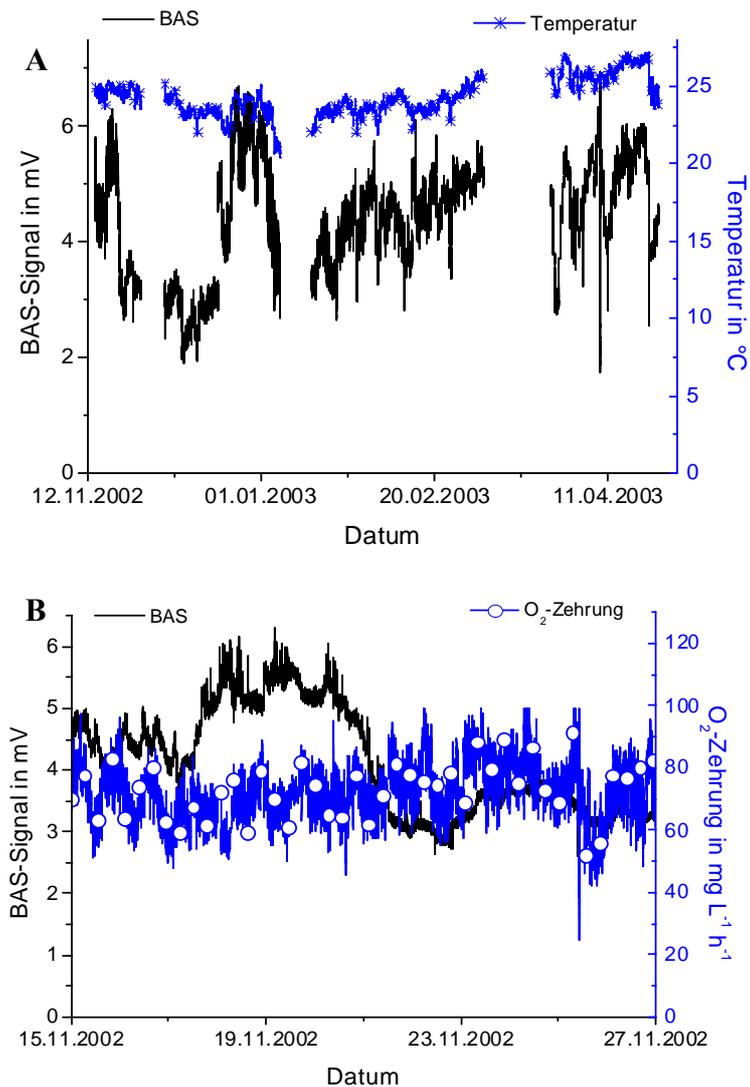


Abbildung 5-58: A - Gesamtdarstellung der Ergebnisse des Prototypen im Toximeter 1 in dem Zeitraum vom 14.11.02 bis 25.04.03, B – Verlauf des BAS-Signals und der Sauerstoffzehrung vom 15.11.02 bis 27.11.02

Die Messung in dem Toximeter 1 zeigte, dass in dem Untersuchungszeitraum keine akuten Störungen der mikrobiellen Aktivität durch inhibierende Substanzen auftraten. Die Signale des Bioaktivitätssensors wiesen dementsprechend keine schnellen Verringerungen auf, welche auf eine Inhibierung der mikrobiellen Aktivität hingewiesen hätten (siehe 5.3.7). Dagegen waren allerdings relativ langsame Änderungen in dem BAS-Signal zu erkennen (Abbildung 5-58 B). Zu Versuchsbeginn betrug das BAS-Signal ca. 4,5 mV, am 17.11. begann das Signal zu steigen und erreichte am 18.11. 02:20 einen Wert von 5,5 mV. Auf diesem Niveau blieb das BAS-Signal für ca. 57 h. Am 20.11. 10:00 begann das BAS-Signal wieder zu sinken und erreichte am 22.11. 00:30 einen Wert von 3,0 mV. Dies bedeutete, dass das BAS-Signal mit einer Geschwindigkeit von $0,062 \text{ mV h}^{-1}$ bzw. $1,15 \% \text{ h}^{-1}$ abgefallen war. Die Sauerstoffzeh-

rung blieb in diesem Zeitraum konstant auf einem Wert von ca. $70 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$. Dieses Ergebnis weist auf Unterschiede zwischen den Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität hin, die unter 6.4 diskutiert werden.

5.5.2.2 Toximeter 4

Die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in dem Toximeter 4 wurde in einem Zeitraum von 13 d durchgeführt. In diesem Zeitraum betrug der Mittelwert des BAS-Signals $1,11 \text{ mV}$, das Signal-Minimum $0,25 \text{ mV}$ und das Maximum $3,88 \text{ mV}$. Die Abbildung 5-59 zeigt den Verlauf des BAS-Signals, der Sauerstoffzehrungsmessung und der Konzentration an Ammonium in dem Zeitraum vom 23.04.02 bis zum 29.04.02.

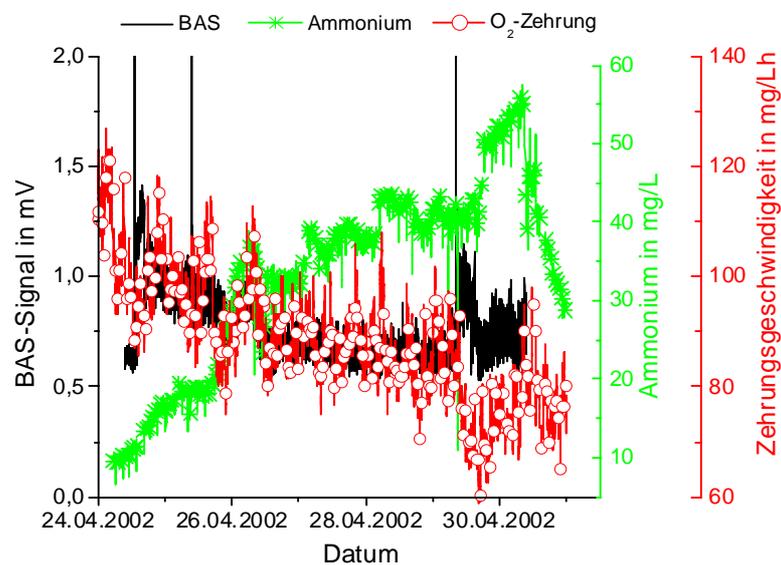


Abbildung 5-59: BAS-Signal, Ammonium-Konzentration und Sauerstoffzehrungsgeschwindigkeit im Toximeter 4

In diesem Zeitraum sind eindeutige Korrelationen zwischen dem BAS-Signal, der Sauerstoffzehrung und der Ammonium-Konzentration zu erkennen. Das BAS-Signal hatte am 23.04. 22:00 einen Wert von ca. $1,5 \text{ mV}$, die Sauerstoffzehrung betrug $115 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ und die Konzentration an Ammonium 10 mg L^{-1} . Im weiteren Verlauf des Versuchs war eine Abnahme sowohl des BAS-Signals als auch der Sauerstoffzehrung zu erkennen.

Am 29.04. 00:00 wies das BAS-Signal noch einen Wert von $0,7 \text{ mV}$ auf und die Sauerstoffzehrung war auf $86 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gefallen. Gleichzeitig war ein Anstieg der Ammoniumkonzentration auf 40 mg L^{-1} festzustellen. Durch eine Inhibierung der Aktivität der Mikroorganismen kam es somit zu einem Anstieg der Substratkonzentration und einem Absinken sowohl der Sauerstoffzehrungsmessung als auch des BAS-Signals.

5.6 Steuerungen und Regelungen auf Basis der mikrobiellen Aktivität

Die Überwachung von Abwasserreinigungsanlagen erfolgt aufgrund gesetzlicher Vorgaben, zur Optimierung des Reinigungsprozesses und zur Aufdeckung von Störungen. An die Prozesse der biologischen Abwasserreinigung werden dabei unter ökologischen, ökonomischen sowie sozialen Gesichtspunkten immer höhere Ansprüche gestellt. Um diesen Anforderungen zu entsprechen, sind auch verbesserte oder neuartige MSR-Konzepte, z.B. für die Verringerung der Belüftungskosten der aeroben Stufen, notwendig. Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Signal des Bioaktivitätssensors mit dem Abbau der Abwasserinhaltsstoffe korreliert und damit die Anforderungen an ein Messsystem zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität erfüllt, stand die Nutzung des Messsignals zur Etablierung entsprechender MSR-Konzepte im Mittelpunkt der Untersuchungen. Im Folgenden werden zwei Regelungen auf Basis der mikrobiellen Aktivität im Labormaßstab vorgestellt: Die Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute hinsichtlich des Substratabbaus und die Bestimmung des Abbaupotentials der Mikroorganismen. Weitere Nutzungspotentiale des BAS-Signals im Sinne von Steuerungen und Regelungen werden unter 6.5 diskutiert.

5.6.1 Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute (RZA)

Unter 5.2.2.1 wurde gezeigt, dass die BAS-Signale mit dem Substratabbau korrelieren, daher sollten die BAS-Signale im Weiteren für die Optimierung des Substratabbaus eingesetzt werden, um damit die Raum-Zeit-Ausbeute zu erhöhen. Hierbei sollte bei einem sinkenden BAS-Signal jeweils eine erneute Substratdosierung erfolgen. Für die Untersuchungen wurden aerobe Batch-Reaktoren eingesetzt, in einem 2 Liter Reaktor wurde 1 L Leitungswasser mit je 50 mL der Lösungen A und B des Abwasserkonzentrates nach 4.2.11 und 300 mL Belebtschlamm aus der 1. Stufe der ARA Frankfurt-Niederrad vermischt. Der Substratabbau wurde durch Messung der Konzentration des gelösten organischen Kohlenstoffs verfolgt.

Nachdem das vorgelegte Substrat abgebaut war und es dementsprechend zu einem Absinken des BAS-Signals kam, erfolgte die Dosierung der zusätzlichen Substrate. Die Abbildung 5-60 A zeigt einen entsprechenden Versuch zur Optimierung des Abbaus am Beispiel des Abwasserkonzentrates nach 4.2.11.

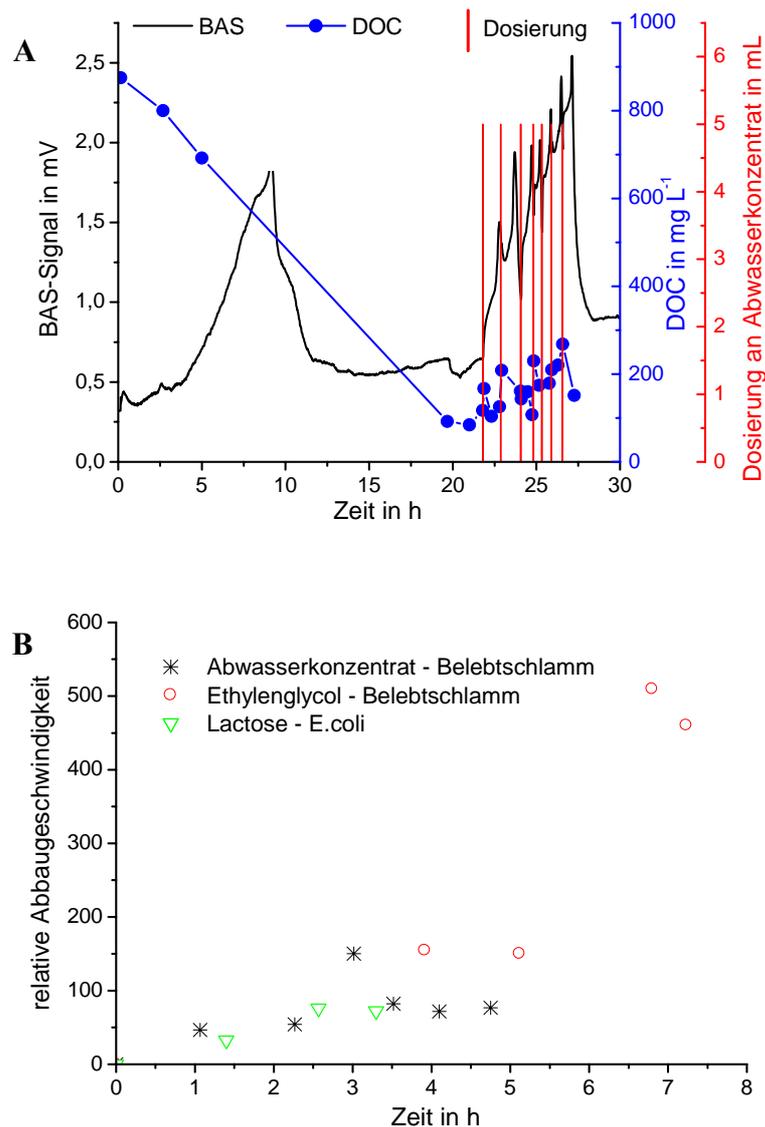


Abbildung 5-60: A - Optimierung der Raum-Zeit-Ausbeute auf Basis der BAS-Signale am Beispiel eines Abwasserkonzentrats, B - Steigerung der Abbaugeschwindigkeiten beim Abbau des Abwasserkonzentrates und Ethylenglycols durch Belebtschlamm sowie der Lactose durch *E. coli*

Der Verlauf der Signale zu Versuchsbeginn beschreibt den Abbau des vorgelegten Substrats. Nachdem dieses abgebaut war, wurden 5 mL zusätzliches Abwasserkonzentrat in den Reaktor dosiert. Für den Abbau des ersten Substratstoßes bei $t = 21,8$ h benötigte die vorhandene Biomasse 60 min, die Abbaugeschwindigkeit betrug $5,3 \text{ mg CSB min}^{-1}$. Zu dem Zeitpunkt, an dem das BAS-Signal wieder zu sinken begann, erfolgte eine erneute Dosierung des Substrats, in der Folge stieg das BAS-Signal wieder an. Nach 6 weiteren Dosierungen betrug die entsprechende Abbauzeit 34 min bei einer Abbaugeschwindigkeit von $9,4 \text{ mg CSB min}^{-1}$. Der Zeitabstand zwischen den einzelnen Dosierungen wurde dabei mit zunehmender Versuchs-

dauer geringer. Das maximale BAS-Signal stieg mit den Dosierungen jeweils an und erreichte nach der sechsten Dosierung einen Wert von 2,5 mV.

In der Abbildung 5-60 B sind die Steigerungen der relativen Abbaugeschwindigkeiten dargestellt, dazu wurde die Abbaugeschwindigkeit nach der ersten Substratdosierung auf 100 Prozent gesetzt. Neben dem Abbau des Abwasserkonzentrates durch den Belebtschlamm wurde der Abbau von Ethylenglycol durch Belebtschlamm und von Lactose durch *E. coli* untersucht. Die Enzyme, die für die Aufnahme und Spaltung der Lactose in Galactose und Glucose erforderlich sind, werden nur gebildet, wenn Lactose in dem Medium vorhanden ist. Durch die notwendige Induktion der Enzyme sind deutliche Steigerungen der Aktivität während des Versuches zu erwarten. Aus der Abbildung 5-60 B ist ersichtlich, dass die relativen Abbaugeschwindigkeiten für das Abwasserkonzentrat durch Belebtschlamm und für die Lactose durch *E. coli* innerhalb von ca. 5 h verdoppelt wurden. Für den Abbau des Ethylenglycols durch Belebtschlamm wurde innerhalb von ca. 8 h eine Verfünffachung der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht.

5.6.2 Bestimmung des Abbaupotentials

Mit dem Bioaktivitätssensor wurde in den oben beschriebenen Anwendungen (5.3 und 5.5) die Aktivität der Biomasse bestimmt, durch die Dosierung eines zusätzlichen leicht-abbaubaren Substrates sollte daneben auch eine Aussage über das Abbaupotential der Mikroorganismen möglich sein. Für diese Untersuchungen wurde die Laborkläranlage I mit 10 L modifiziertem Abwasser nach 4.2.11 pro Tag beschickt und zur Untersuchung des Abbaupotentials 2 – 3 mal täglich 1 mL des Abwasserkonzentrates in das Belebungsbecken dosiert. Die Abbildung 5-61 zeigt den Verlauf des BAS-Signals und des DOC, in diesem Versuch wurde bei $t = 66,5$ h ein Stoffwechsel-Inhibitor zudosiert.

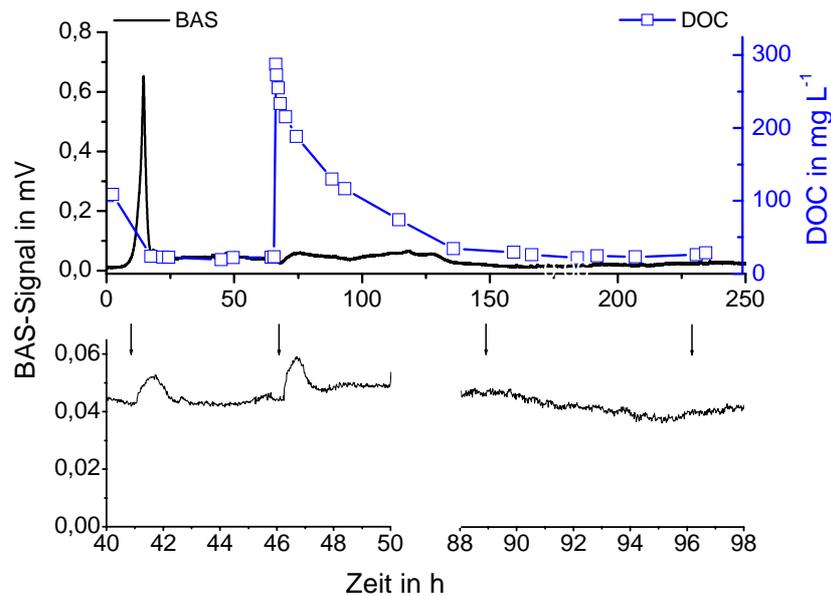


Abbildung 5-61: Untersuchungen zum Abbaupotential der Mikroorganismen (bei $t = 66,5$ h wurden 5 mL Glutardialdehyd in das Belebungsbecken gegeben); die obere Darstellung zeigt den Verlauf des BAS-Signals und des DOC und die unteren Abbildungen das Ergebnis von Substratdosierungen (Pfeil) vor und nach der Dosierung von 5 mL Glutardialdehyd in den Reaktor.

Zu Versuchsbeginn war ein steiler Anstieg des BAS-Signals mit einem Maximum von 0,67 mV zu erkennen, dieser Anstieg korrelierte mit dem Abbau des vorgelegten Substrats. Nach ca. 40 h erreichte das BAS-Signal ein konstantes Signal von 40 μ V. Nach der Dosierung von 5 mL Glutardialdehyd sank das BAS-Signal auf ca. 20 μ V ab und der DOC stieg stark an. Der Anstieg der Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff ist einerseits auf die Hemmung der Substratelimination und andererseits auf den Eintrag an Kohlenstoff durch die Inhibitor-Dosierung zurückzuführen. Nach ca. 6 h begann das BAS-Signal wieder zu steigen. Substratdosierungen vor der Hemmstoffdosierung bewirkten einen Anstieg des BAS-Signals, nach dem Giftstoß wurden dagegen durch das zusätzliche Substrat keine Signaländerungen verursacht. Als Maß für das Abbaupotential wurde der Anstieg des BAS-Signals nach der Substratdosierung eingesetzt, die Abbildung 5-62 zeigt eine Darstellung des BAS-Signals und des so ermittelten Abbaupotentials.

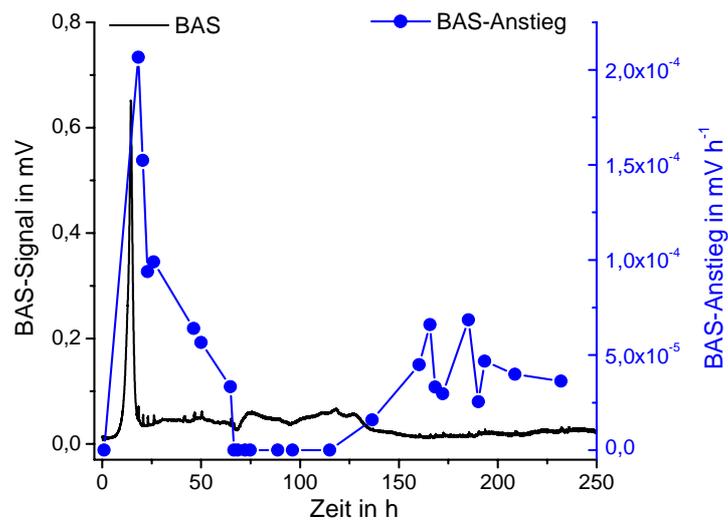


Abbildung 5-62: Abbaupotential der Mikroorganismen als Anstieg des BAS nach einer Substratdosierung

Das Abbaupotential war zu Versuchsbeginn gering, hier hatten sich die Mikroorganismen noch nicht ausreichend an das Substrat adaptiert und waren nicht in der Lage, das vorhandene Substrat vollständig abzubauen. Das Abbaupotential stieg im weiteren Verlauf stark an. Nachdem das vorgelegte Substrat abgebaut war, wiesen die Mikroorganismen erwartungsgemäß weiterhin ein hohes Potential zum Abbau von weiterem Substrat auf. Im Folgenden nahm dieses Potential zunehmend ab, hierbei blieb das BAS-Signal konstant und das kontinuierlich zufließende Abwasser wurde zu 95 % abgebaut. Nach der Dosierung des Glutardialdehyds fielen sowohl das BAS-Signal als auch das Abbaupotential ab. Nach ca. 8 h begann das BAS-Signal wieder zu steigen. Während dieser wiederbeginnenden Substratelimination wurde kein Abbaupotential gemessen, da die Dosierung eines Substrates keine Aktivitätssteigerung bewirkte. Hier sind die Mikroorganismen nicht in der Lage, zusätzliches Substrat abzubauen. Das BAS-Signal stieg dabei über den Ausgangswert, da in dem Reaktor ein erhöhtes Substratangebot vorlag. Erst 50 h nach der Inhibitor-Dosierung war wieder ein Potential der Mikroorganismen zu einem weiteren Substratabbau zu erkennen, parallel zu diesem Anstieg des Abbaupotentials war ein Absinken des BAS-Signals auf einen Wert wie vor der Hemmstoffdosierung zu erkennen. Im weiteren Verlauf des Versuches wies der Anstieg des BAS-Signals nach der Substratdosierung einen Wert von ca. $5 \cdot 10^{-5} \text{ mV h}^{-1}$ auf.

5.7 Modellierung und Simulation der Modellkläranlage und der mikrobiellen Aktivitäten

Im Rahmen dieser Untersuchungen sollte die Laborkläranlage II modelliert werden und diese Modellanlage hinsichtlich der Ablaufwerte mit den gemessenen Werten nach 5.3 verglichen werden. Weiterhin sollten die simulierten Änderungen der Parameter aktive heterotrophe Biomasse XBH und aktive autotrophe Biomasse XAH nach Veränderungen der Zulaufbedingungen auf Zusammenhänge mit den gemessenen Daten des BAS untersucht werden.

Die Simulation der Laborkläranlage II ohne die vorgeschaltete Denitrifikation (entsprechend der Abbildung 4-3 und den Betriebsdaten gemäß der Tabelle 4-3) wurde mit dem Programm SIMBA[®] 4.2 der Fa. ifak system GmbH, Magdeburg, durchgeführt. SIMBA[®] ist eine Software, mit der Kläranlagen modelliert und simuliert werden können. Das für die Simulation gewählte Modell basiert auf dem ASM 1 (siehe 3.4), dieses Modell bietet mit angemessener Detailgenauigkeit eine allgemein akzeptierte Grundlage für verfahrenstechnische und regelungstechnische Untersuchungen biologischer Kläranlagen. SIMBA[®] stellt für die wesentlichen Anlagenkomponenten einer Belebtschlammkläranlage Modell-Blöcke zur Verfügung. Eine Nachbildung der Kläranlagen als Simulationsmodell erfolgt vollgrafisch, die Modell-Blöcke werden mit der Maus in ein Bildschirmfenster gezogen und durch Linien verbunden. Diese Verbindungen beschreiben die Abwasser- und Schlammströme der Kläranlage sowie regelungstechnische Mess- und Steuergrößen. Die Blöcke der Modellbibliothek sind unter anderem gruppiert in: Modelle zur Dateneingabe (z. B. Tagesgang, konstanter Zulauf), Abwasser- und Schlammströme (z. B. Mischer, Pumpe), Reaktor- und Speicherblöcke, Datenausgaben und Messblöcke. Ergänzt wird die Block-Bibliothek durch eine grafische Oberfläche zur Parametereingabe der Modelle sowie zur Steuerung, Verwaltung und Auswertung der Simulationsexperimente (Handbuch zum Programm SIMBA[®], Fa. ifak system GmbH, Magdeburg).

5.7.1 Modell der Laborkläranlage II

Für die Simulation wurden die Parameter mit globaler Bedeutung in den Dateien `asm1m.pfox3` und `p_asm1m.m` definiert, als Ausgangsbasis wurden diese Dateien gemäß den Vorgaben der Fa. ifak system GmbH, Magdeburg, verwendet (siehe Handbuch zum Programm SIMBA[®], Fa. ifak system GmbH, Magdeburg). Die Datei `asm1m.pfox3` enthält zusätzlich zur Definition der Prozess-Stöchiometrie und -Kinetik auch die Anfangswerte für die Zustandvariablen, während in der Datei `p_asm1m.m` die kinetischen und stöchiometri-

schen Parameter (laut Tabelle 3-3) vereinbart werden. Im Gegensatz zu der Modellkläranlage wurde für die Simulation von einer konstanten Temperatur von 20 °C ausgegangen. In der Abbildung 5-63 ist der Aufbau der Simulationskläranlage dargestellt.

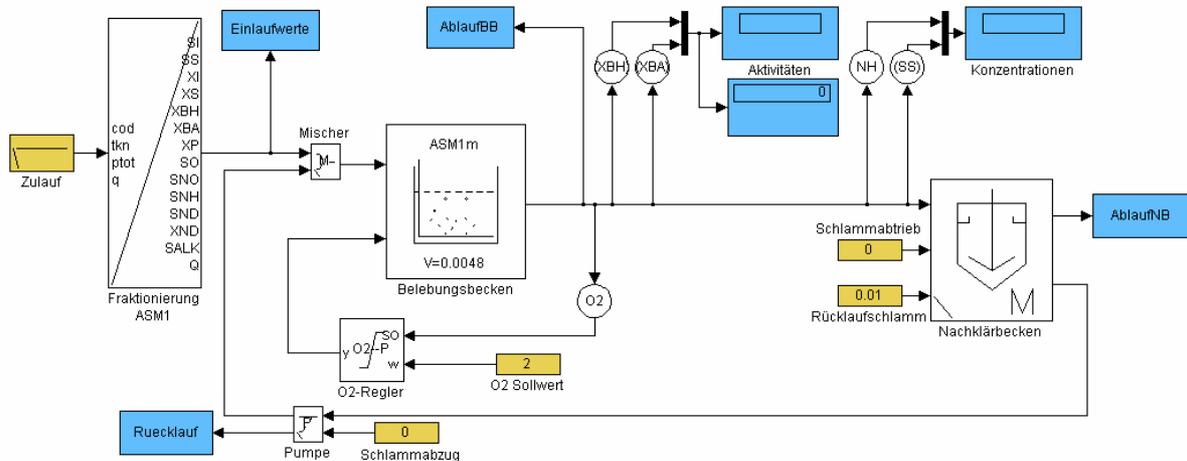


Abbildung 5-63: Verfahrenfließbild der Laborkläranlage II im Simulationsprogramm (zur Erläuterung der verwendeten Abkürzungen siehe Abschnitt 3.4)

Der Block Zulauf modelliert, entsprechend des Initialisierungsfiles `tgang3.m` (siehe Anhang), den Abwasserzufluss hinsichtlich der Zulaufkonzentrationen und des Volumenstroms und erzeugt einen entsprechenden Signalvektor. Der Signalvektor beschreibt für den Zulauf in der Modellkläranlage den Verlauf der Summenparameter CSB, Stickstoff und Phosphor (im ASM 1 nicht weiter berücksichtigt) sowie den Volumenstrom. Die Zulauffraktionierung erfolgt durch Aufruf des Blockes `FracASM1`. Eingang dieses Blockes ist der oben beschriebene Signalvektor, der Ausgang ist ein Signalvektor mit 14 Komponenten, bestehend aus den Stoffgruppen des ASM 1 und dem Volumenstrom. Das Fraktionierungsmodell basiert auf den Empfehlungen, die 1998 durch die ATV-Arbeitsgruppe 2.11.4 herausgegeben wurden (BORNEMANN et al. 1998). Die vorgegebenen Werte beziehen sich auf vorgeklärtes Abwasser und können daher näherungsweise für das Modellabwasser verwendet werden. Im Anhang (9.4.2) sind die entsprechenden Berechnungsgrundlagen und Anteilsfraktionen für die Fraktionierung dargestellt. In dem Block `Mischer` erfolgt die Vermischung des Abwasserzulaufs mit dem Rücklaufschlamm aus der Nachklärung. Anschließend gelangt dieses Gemisch in das `Belebungsbecken`, hier findet der aerobe Abbau der Abwasserinhaltsstoffe statt. Der Block `Belebungsbecken` beschreibt einen vollständig durchmischten Rührkesselreaktor mit Druckbelüftung, mit einem Eingang und einem Ausgang für das Abwasser-Schlamm-Gemisch. Parameter für diesen Block sind das Beckenvolumen und -tiefe sowie Parameter, die den Sauerstoffeintrag beschreiben. In diesem Becken wird über einen `O2-Regler` die Sauerstoffkonzentration geregelt. Hierfür wird ein Regler mit P-Verhalten einge-

setzt, der Verstärkungsfaktor wird entsprechend dem Belüftungsvolumen festgelegt. Eingänge für diesen Block sind als Regelgröße die Sauerstoffkonzentration und als Führungsgröße der Sollwert an Sauerstoff, der Volumenstrom als Stellgröße stellt den Ausgang dieses Blockes dar. Als Sollwert wurde analog zu den Untersuchungen unter 5.3.1 ein Wert von 2 mg Sauerstoff pro Liter vorgegeben. Das gereinigte Abwasser gelangt anschließend mit dem Belebtschlamm in das Nachklärbecken, dieses wird mit dem Block NK-Mix modelliert. Dieser Block stellt ein einfaches Nachklärmodell dar und wird durch die Eingabe des Beckenvolumens parametrisiert. Das Nachklärbecken besitzt drei Eingänge: Q_{zu} für den Abwasser/Schlamm-Zufluss, F_{AB} für den Feststoff-Abtrieb und F_{QR} als Vorgabe für den Volumenstrom an Rücklaufschlamm. Der Klarwasserablauf Q_{AB} und der Rücklaufschlammstrom Q_{RS} stellen die Ausgänge des Blockes dar. Der Block Schlammabtrieb berücksichtigt, dass ein Teil der Biomasse mit dem gereinigten Abwasser aus dem System entfernt wird. Ein Teil des Belebtschlammes aus der Nachklärung kann über eine Pumpe und den Block Schlammabzug aus dem Kreislauf entfernt werden. Die Pumpe besitzt als Eingänge den Abwasser/Schlamm-Zufluss und die Vorgabe für den abzuzweigenden Volumenstrom sowie als Ausgänge die entsprechenden zurückgeführten bzw. abgezweigten Abwasser-Schlamm-Gemische. Die Werte der Simulation werden mit Hilfe der Blöcke Einlaufwerte, AblaufBB, AblaufNB und Rücklauf gespeichert. Während der Simulation werden die simulierten Werte für die aktive heterotrophe und autotrophe Biomasse als Digitalanzeige und Grafik dargestellt sowie die Konzentrationen an NH_4N und SS (biologisch schnell abbaubare, gelöste organische Stoffe) graphisch abgebildet.

5.7.2 Simulation einer Anlaufphase in der Laborkläranlage

Für die Modellierung wurden in der Modellmatrix die Terme, welche die Änderungen des pH-Werts berücksichtigen, auf Null gesetzt und damit die Limitierungen der heterotrophen und autotrophen Biomasse durch den pH-Wert in der Simulation vernachlässigt. Dies berücksichtigt, dass das synthetische Abwassermedium eine Pufferkapazität aufweist und die Modellkläranlage mit einer pH-Regelung betrieben wurde. Im Zulauf der Anlage wurde die Konzentration an aktiver Biomasse auf Null gesetzt. Dies berücksichtigt, dass das zufließende synthetische Abwasser, im Gegensatz zu realen Abwässern, keine Mikroorganismen enthält. Weiterhin wurden die kinetischen Parameter laut Tabelle 5-15 geändert, hierbei erfolgte eine visuelle Anpassung an die gemessenen Werte.

Tabelle 5-15: Vorgegebene (siehe Tabelle 3-3) und geänderte kinetische Parameter des Belebtschlamm-Modells ASM 1 für die Simulation der Laborkläranlage (in den Klammern ist jeweils die vorgegebene Schwankungsbreite angegeben)

Parameter	Symbol	vorgegebener Wert (Schwankungsbreite)	Wert für die Simulation
max. spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der heterotrophen Biomasse in d^{-1}	μ_H	4 (3 – 6)*	8*
Sättigungsbeiwert der schnell abbaubaren Substanzen in $g_{CSB} m^{-3}$	K_S	5 (1 – 5)	7
max. spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der autotrophen Biomasse in d^{-1}	μ_A	0,9 (bis 1) *	1,4*
Sättigungsbeiwert des NH_4 -N-Abbaus in $g_{NH_4-N} m^{-3}$	K_{NH}	0,5 (0,2 – 0,7)	1

(*) der Parameter wird über Korrekturfaktoren an Temperaturen abweichend von 20 °C angepasst (siehe Handbuch zum Programm SIMBA®, Fa. ifak system GmbH, Magdeburg)

Der aerobe Abbau an Kohlen- und Stickstoff wurde unter 5.3.5.1 untersucht, der entsprechende Versuch wurde mit dem oben beschriebenen Modell simuliert. Die Abbildung 5-64 zeigt das gemessene BAS-Signal sowie die gemessenen und simulierten Verläufe an gelöstem organischem Kohlenstoff und Ammonium. Als DOC wurde für die Simulation die Konzentration an biologisch schnell abbaubaren, gelösten organischen Stoffen (SS) vom CSB auf die entsprechenden Kohlenstoffkonzentrationen umgerechnet.

Es zeigten sich hinsichtlich des zeitlichen Verlaufs gute Übereinstimmungen zwischen den gemessenen und simulierten Werten. In den ersten 24 h war ein starker Anstieg des BAS-Signals zu beobachten; dies korreliert mit einer starken DOC-Elimination in diesem Zeitraum. Zu Versuchsbeginn wurde ein DOC von 120 mg L^{-1} gemessen, nach 24 h waren bereits über 90 % des Substrates abgebaut. Im weiteren Verlauf des Versuches fand kontinuierlich eine über 90%ige Elimination des gelösten organischen Kohlenstoffes statt. Die Ammoniumkonzentration änderte sich in dieser Versuchsphase nicht wesentlich und betrug ca. $80 \text{ mg NH}_4\text{N pro Liter}$. Erst im Laufe des Prozesses kam es zu einer signifikanten Konzentrationsänderung des Substrates der Nitrifikanten. Nach ca. 100 h war ein verstärkter Abbau des Ammoniums festzustellen und die Ammoniumkonzentration erreichte nach ca. 11 d konstan-

te, niedrige Ablaufwerte. Im weiteren Verlauf wurden sowohl der mit dem Feeding eingetragene organische Kohlenstoff als auch das Ammonium kontinuierlich umgesetzt.

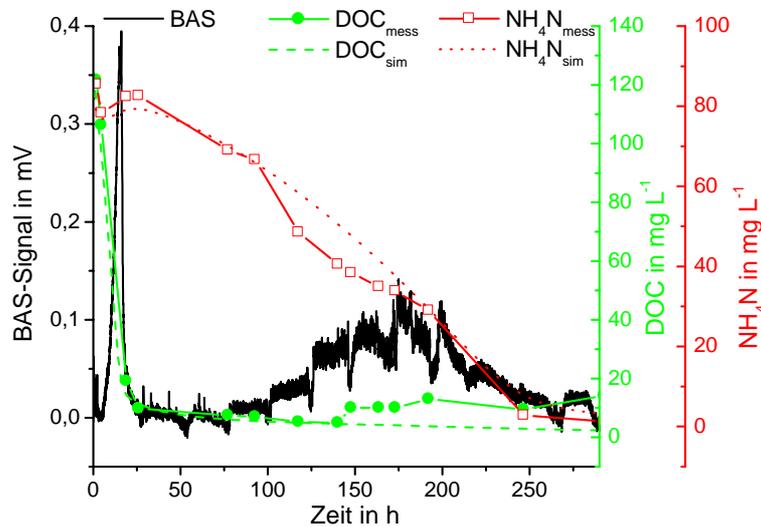


Abbildung 5-64: Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Werten für DOC und NH_4N während des aeroben Abbaus in der Laborkläranlage II

Die für die Simulation verwendeten Werte (Tabelle 5-15) liegen über den angegebenen Schwankungsbreiten. Mit diesen Anpassungen wurde im Wesentlichen berücksichtigt, dass das vorliegende synthetische Abwasser hinsichtlich der Kohlenstoff- und Stickstoffkomponenten für den Belebtschlamm in dem Reaktor sehr gut abzubauen war und eine gleichbleibende Zusammensetzung aufwies. Da die Simulation der Ablaufwerte mit dem dargestellten Modell erfolgreich durchgeführt werden konnte, wurden im Folgenden die zeitlichen Verläufe der BAS-Signale sowie der simulierten Parameter XBH und XBA (Konzentration der aktiven, heterotrophen bzw. autotrophe Biomasse) nach Änderungen der Zulaufbedingungen untersucht.

5.7.3 Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Aktivitäten

Unter 5.3.1.2 wurden die BAS-Signale durch Sprungsignale aus dem Fließgleichgewicht ausgelenkt und es zeigte sich eine Korrelation zwischen dem Abwasserzulauf bzw. der Verweilzeit des Abwassers in der Kläranlage und dem BAS-Signal. Bei hohen Aufenthaltszeiten in dem Reaktor waren die BAS-Signale unabhängig von der Verweilzeit, dagegen waren die Signale bei kurzen Verweilzeiten linear abhängig von dem Substrat-Feeding. Die Abbildung

5-65 zeigt das Ergebnis des Vergleichs zwischen den entsprechenden gemessenen und simulierten Werten, für die Simulation wurde der Abwasserzufluss in der Funktion `tgang.m` entsprechend den Versuchen unter 5.3.1.2 angepasst.

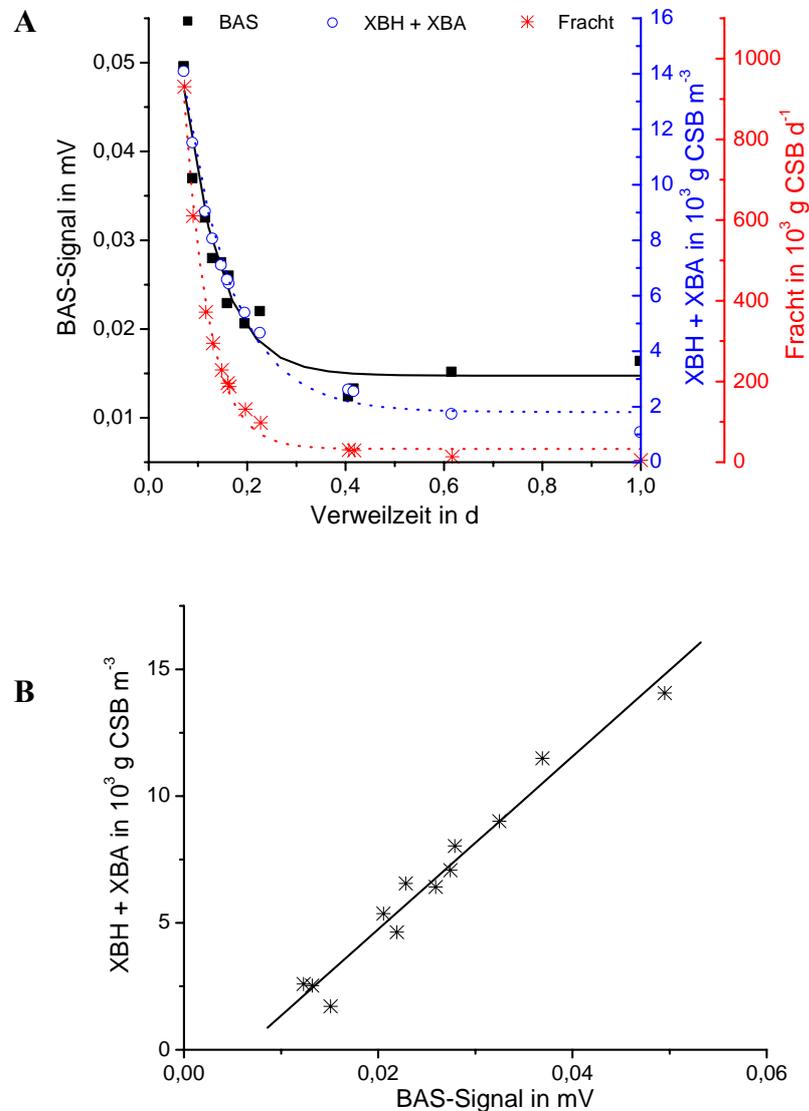


Abbildung 5-65: A - Abhängigkeit der Aktivitätssignale von der Verweilzeit (für die grafische Darstellung erfolgte eine Anpassung durch eine exponentielle Abnahme 2. Ordnung), B – Vergleich zwischen gemessenen BAS-Signalen und simulierten Konzentrationen an aktiver Biomasse (die Gleichung der Regressionsgeraden ist im Text angegeben, $R^2 = 0,96$)

Es zeigte sich, dass die Summe aus XBH und XBA in der Darstellung als Funktion der Verweilzeit einen vergleichbaren Verlauf zu den gemessenen BAS-Signalen aufwies. Bei hohen Aufenthaltszeiten in dem Reaktor waren die Konzentrationen an aktiver Biomasse unabhängig von der Verweilzeit und bei kurzen Verweilzeiten zeigte sich für die Parameter ein linearer Zusammenhang. Die einzelnen Parameter XBH und XBA zeigten ebenfalls einen

entsprechenden Verlauf. In der Abbildung 5-65 wurde die Summe der Aktivitäten dargestellt, da die gemessenen BAS-Signale auch als Summe der Aktivitäten gedeutet werden müssen. Die Fracht an aktiver Biomasse, als Produkt der CSB-Konzentration und dem Zulaufvolumen, ist ebenfalls in der Abbildung dargestellt, es ergab sich wiederum eine Korrelation zwischen den gemessenen und simulierten Werten. Für den Zusammenhang zwischen dem BAS-Signal und der Summe der simulierten Konzentrationen an aktiver hetero- und autotropher Biomasse wurde ein linearer Zusammenhang gefunden; die Geradengleichung lautet:

$$\sum XBH + XBA [\text{g CSB m}^{-3}] = 3,406 \cdot 10^8 [\text{g CSB m}^{-3} \text{ V}^{-1}] \cdot \text{BAS} [\text{V}] - 2061 [\text{g CSB m}^{-3}] .$$

Die Einstellung eines Fließgleichgewichtszustandes wurde bei der experimentellen Bestimmung mit dem BAS nach maximal 72 h beobachtet, dagegen wurde bei der Simulation bei hohen Durchflussraten ($66,4 \text{ L d}^{-1}$) erst nach ca. 1000 d ein konstanter Wert erreicht. Bei einer Durchflussrate von $4,8 \text{ L d}^{-1}$ wurden konstante Werte für die Parameter XBH und XBA nach ca. 300 d festgestellt. Im Folgenden wurde untersucht, welche Parameter die Konzentration der aktiven, heterotrophen Biomasse während der Simulation in welchem Umfang beeinflussen. Dazu wurden die Parameter Ertrag der heterotrophen Biomasse (YH), maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der heterotrophen Biomasse (μH), Sättigungsbeiwert der schnell abbaubaren Substanzen (KS) und die spezifische Zerfallsgeschwindigkeit der heterotrophen Biomasse (bH) jeweils in separaten Versuchen um $\pm 20\%$ und 10% geändert und die resultierenden Werte für XBH im Fließgleichgewicht ermittelt. Die Abbildung 5-66 zeigt das Ergebnis der entsprechenden Simulationen, die Änderungen des Parameters XBH sind als prozentuale Änderungen vom Ausgangswert aufgetragen.

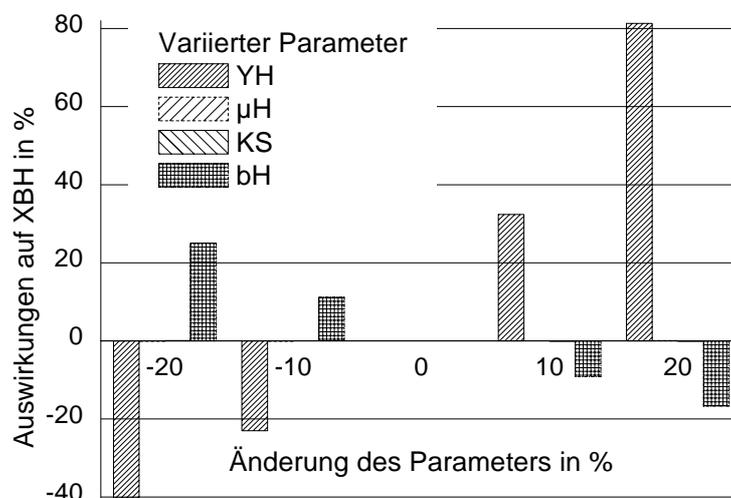


Abbildung 5-66: Variation der Parameter YH, μH , KS und bH bei der Simulation der Laborkläranlage und Auswirkung auf den Parameter XBH

Es zeigte sich, dass die Parameter μ_H und K_S nur geringe Auswirkungen auf XBH haben, die prozentualen Auswirkungen der zwanzigprozentigen Variation der Parameter lagen unter 0,1 % und sind in der Abbildung 5-66 nicht zu erkennen. Dagegen zeigte eine Änderung dieser Parameter einen deutlichen Einfluss auf den Substratabbau: eine Verringerung der Wachstumsrate und eine Erhöhung von K_S bewirkten einen verlangsamten Substratabbau. Die Parameter Y_H und b_H zeigten dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die simulierten Ablaufwerte der Laboranlage, aber einen starken Einfluss auf die Konzentration an aktiver Biomasse. Eine Erhöhung des Ertrags der heterotrophen Biomasse bewirkte erhöhte Konzentrationen an aktiver Biomasse, während eine Erhöhung der spezifischen Zerfallsgeschwindigkeit der heterotrophen Biomasse verminderte Biomassekonzentrationen verursachte. In einer weiteren Untersuchung wurde der Einfluss von verfahrenstechnischen Parametern, wie zum Beispiel dem Schlammabtrieb oder der Zuflussmengen auf XBH, untersucht. Die Abbildung 5-67 zeigt das Ergebnis der entsprechenden Simulationsläufe, die Simulationen wurden für 1000 d durchgeführt. In der Abbildung stellen die roten Markierungen den Normalzustand der Anlage dar, entsprechend den Versuchen unter 5.3.

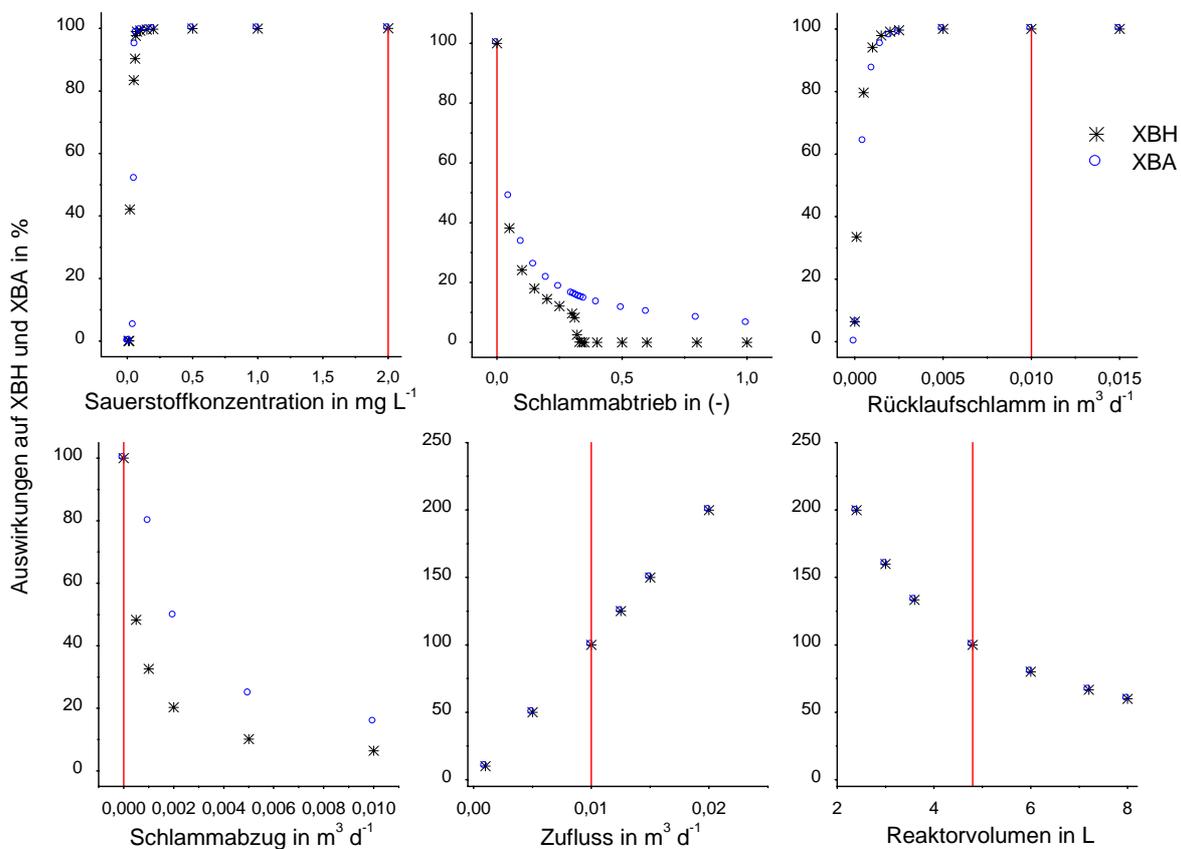


Abbildung 5-67: Auswirkungen von verfahrenstechnischen Parametern auf die aktive hetero- und autotrophe Biomasse in der Simulation der Laborkläranlage

In der Laborkläranlage wurde die Sauerstoffkonzentration auf 2 mg L^{-1} geregelt, die Simulation zeigte, dass für die heterotrophen Mikroorganismen erst bei einer Sauerstoffsollkonzentration von $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ ein Rückgang des Parameters XBH von mehr als zehn Prozent festzustellen war. Für den Parameter XBA stellte sich eine zehnjährige Verringerung ab einer Konzentration von $0,065 \text{ mg L}^{-1}$ ein. Bei der Variation des Parameters Schlammabtrieb zeigte sich, dass hier die autotrophen Mikroorganismen empfindlicher gegenüber einer Änderung sind als der heterotrophe Belebtschlamm. Die autotrophen Organismen werden aufgrund ihrer geringeren Wachstumsraten schneller aus dem System ausgewaschen. Bei einer Variation der Rücklaufschlammmenge kam es zu einer 10%igen Abnahme von XBA bei $0,001 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ und von XBH bei einem Wert von $0,0005 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$. Durch diese Prozessbedingungen erfolgte eine starke Akkumulation der aktiven Biomasse im Rücklaufschlamm bzw. in der Absetzzone des Nachklärbeckens. Selbst bei einem totalen Schlammabtrieb ($F_{AB} = 1$) bzw. einem totalen Schlammabzug ($\text{Flow} = 0,01$) kam es zu einem vollständigen, schnellen Abbau des Kohlenstoffes; dies ist auf die hohe Wachstumsrate der heterotrophen Mikroorganismen zurückzuführen. Unter diesen Bedingungen stellte sich ein XBH von $100 \text{ g}_{\text{CSB}} \text{ m}^{-3}$ ein. Dagegen wurden die Nitrifikanten schneller aus dem System ausgewaschen als sie nachwachsen konnten. Änderungen des Zulaufvolumens und des Volumens des Belebungsbeckens hatten auf die Parameter XBH und XBA eine übereinstimmende Wirkung gezeigt, mit einem Anstieg des Zuflusses war ein linearer Anstieg der Konzentration an Biomasse zu erkennen. Hier stieg die Raumbelastung in der Kläranlage an (Formel 3-4), dieser Befund entspricht den simulierten Ergebnissen der Abbildung 5-65 und den praktischen Untersuchungen unter 5.3.1.2. Ein verkleinertes Reaktorvolumen führte zu einer höheren Konzentration an aktiver Biomasse, da hier die Substratfracht in einem kleineren Volumen abgebaut werden musste, hier stieg die Raumbelastung entsprechend der Formel 3-4 an.

Die Auswirkungen von Substratpulsen auf die Aktivität der Mikroorganismen wurden ebenfalls mit dem oben beschriebenen Simulationsmodell und den entsprechenden Parametern untersucht. In der Abbildung 5-68 sind die gemessenen BAS-Signale nach Stoßdosierungen des Abwasserkonzentrates bzw. in der Abbildung 5-69 von Ammonium in das Belebungsbecken sowie die entsprechenden simulierten Signalverläufe für XBH bzw. XBA dargestellt. Die entsprechenden Versuche sind unter 5.3.1.3 bzw. 5.3.2 beschrieben worden.

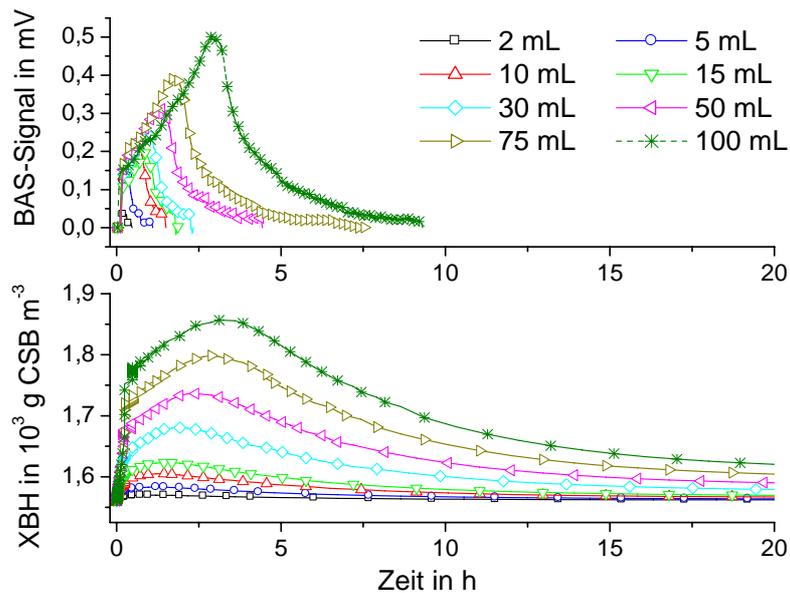


Abbildung 5-68: Stoßdosierungen eines 200fachen Abwasserkonzentrates in das Belebungsbecken der Laborkläranlage

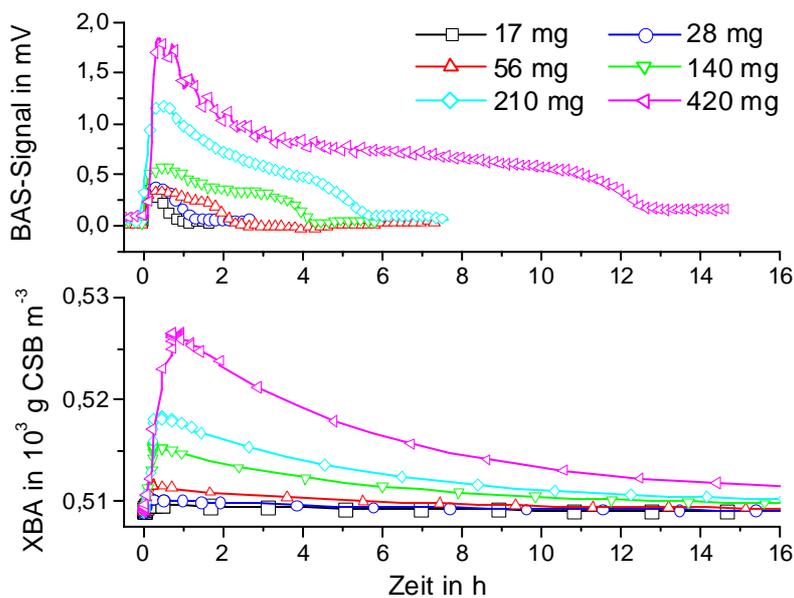


Abbildung 5-69: Stoßdosierungen von Ammonium in das Belebungsbecken der Laborkläranlage

Die Simulation der Substratpulse wurde mit dem Block Regenereignis durchgeführt, hierbei wurde der Substratstoß innerhalb einer Minute mit einem Feeding von $0,001 \text{ m}^3 \text{ d}^{-1}$ und den entsprechenden Konzentrationen durchgeführt. Das 200fach konzentrierte Abwasser rief bei kurzen Prozesszeiten im Wesentlichen eine Erhöhung der Aktivität der heterotrophen Mikroorganismen hervor, daher wurde bei diesen Untersuchungen lediglich der Parameter XBH betrachtet. Für die Ammonium-Dosierungen wurde entsprechend der Versuchsführung der Zufluss mit einem Ammonium-Medium durchgeführt, hier finden keine heterotrophen Stoff-

wechselvorgänge statt und es wurden die entsprechenden Prozesse aus der Datei asm1m.pfox3 eliminiert. Es zeigte sich im qualitativen Vergleich der gemessenen und der simulierten Werte eine gute Übereinstimmung für die Phasen, in denen ein Signalanstieg festzustellen war. Bei den heterotrophen Prozessen war jeweils zu Beginn ein starker Anstieg der Signale zu erkennen, dieser ging bei höheren Substratdosierungen in einen verlangsamten Anstieg über. Sowohl die Messwerte für die heterotrophe Biomasse als auch die simulierten Werte erreichten zu einem vergleichbaren Zeitpunkt das maximale Signal. Dagegen war das Absinken der BAS-Signale auf das Ausgangssignal bedeutend schneller als der Signalabfall bei den simulierten Werten. Bei dem Nitrifikationsprozess in der Abbildung 5-69 sind für den qualitativen Verlauf über den gesamten Bereich gute Korrelationen zwischen den gemessenen und simulierten Werten zu erkennen. Hinsichtlich eines quantitativen Vergleichs kann festgestellt werden, dass bei den heterotrophen Prozessen relativ starke Änderungen des Parameters XBH auftraten, dagegen änderte sich der Parameter XBA nach den Dosierungen nur in einem geringen Umfang.

6 Zusammenfassung und Diskussion

Die elektrochemischen Abläufe an den Elektroden des Bioaktivitätssensors und die entsprechenden Stoffwechselfvorgänge der Mikroorganismen können auf unterschiedlichen Komplexitätsstufen untersucht werden. Je größer die Komplexität des Systems ist, desto schwieriger wird es, Änderungen in dem System bestimmten Einflussfaktoren zuzuordnen. Mit zunehmender Komplexität wird es auch problematisch, einen Prozess zu beschreiben, weil die Anzahl der am untersuchten Prozess beteiligten Komponenten und Prozessgrößen sehr groß wird. In zellfreien Systemen konnten direkt die Wirkungen von Chemikalien auf das Signal des Bioaktivitätssensors aufgezeigt werden. Bei Versuchen mit Reinkulturen, wie zum Beispiel *E. coli*, sind die Stoffwechselwege bekannt, weisen aber bereits einen hohen Grad der Komplexität auf, so dass hier zwar qualitative und quantitative Zusammenhänge sichtbar werden, aber die Änderungen der elektrochemischen Signale sind nur noch bedingt auf molekularer Ebene zu deuten. Bei Einsatz von Belebtschlamm als biologischer Komponente können die stoffwechselphysiologischen Zusammenhänge dieses komplexen, dynamischen Systems nicht mehr erfasst werden. Hier können lediglich die messbaren Parameter zur Beschreibung der Reaktionen herangezogen werden. Gleichzeitig sinkt bei Versuchen mit einer Mischkultur der Grad der Reproduzierbarkeit, da das System von einer Vielzahl von Faktoren abhängig ist, welche nicht messtechnisch erfass- und steuerbar sind. Während bei einer Untersuchung mit Belebtschlamm im Labormaßstab die äußeren Bedingungen des Systems bekannt und kontrollierbar sind, können in den praktischen Anwendungen auf Abwasserreinigungsanlagen die Systeme im Allgemeinen nur beschrieben werden, ohne dass die exakten Ursache für die Änderungen der biologischen Parameter bekannt sind und sich diskreten Ereignissen zuordnen lassen.

6.1 Untersuchungen in Abwesenheit von mikrobieller Aktivität

Durch die Charakterisierung der Messsysteme (5.1.1) in Abwesenheit von aktiven Mikroorganismen konnten die Nachweisgrenze und der Arbeitsbereich des Laboraufbaus und des Prototypen festgelegt werden. Diese Ergebnisse erlauben eine weitere Analyse der BAS-Signale in Gegenwart von aktiven Mikroorganismen. Die Untersuchungen im zellfreien System (siehe 5.1) haben gezeigt, dass die Substrate Glucose, Ammonium, Nitrat und Nitrit nicht direkt an den Elektroden des Bioaktivitätssensors umgesetzt wurden. Methanol zeigte bei hohen Konzentrationen einen geringen Anstieg des BAS-Signals, welcher allerdings, vergli-

chen mit den Änderungen des BAS-Signals durch die Aktivität der Mikroorganismen, gering ist.

Aus der Gruppe der getesteten Stoffwechselprodukte zeigte die Ameisensäure einen konzentrationsabhängigen Signalanstieg. Die Fermentationsprodukte Acetat, Propionat, Lactat und Kohlendioxid bewirkten keinen Stromfluss an den Elektroden des BAS. Theoretisch wäre dagegen, ausgehend von den Normalpotentialen, eine Umsetzung von Acetat, Lactat und Succinat denkbar (siehe 3.1.1.2). Hier verhindern wahrscheinlich im Wesentlichen Überspannungseffekte die Umsetzung an den Elektroden, da eine sterische Behinderung des Elektronentransfers bei diesen Molekülen nicht zu erwarten ist. Anhand dieser Ergebnisse lässt sich feststellen, dass der Substratabbau und die Bildung von typischen Stoffwechselprodukten mit Ausnahme der Ameisensäure keinen Einfluss auf das BAS-Signal haben.

Die Umsetzung von Ameisensäure an Edelmetallelektroden ist in der Literatur beschrieben worden (z. B. BEYER 1984), das Redoxpotential der Reaktion Ameisensäure/CO₂ beträgt 430 mV (siehe Tabelle 9-2). Von den eingesetzten Substanzen ist dies der höchste Wert. Dieses Ergebnis stimmt mit den Anforderungen überein, dass die in einem amperometrischen Sensorsystem detektierbaren Substanzen eine möglichst hohe Potentialdifferenz zu den Elektroden des Sensorsystems aufweisen sollten. Die Umsetzung der Ameisensäure an den Elektroden des BAS deckt sich mit dem in der Literatur beschriebenen Elektronentransfer über elektrochemisch aktive Stoffwechselsubstanzen, hier wurde unter anderem Ameisensäure als möglicher Elektronendonator genannt (MATSUNAGA et al. 1979 sowie ASTON und TURNER 1984). Die nächsthöhere Monocarbonsäure Acetat weist ein Normalpotential von 290 mV auf und bewirkte an den Elektroden des BAS keine signifikante Signaländerung.

Von den eingesetzten Chemikalien bewirkten erwartungsgemäß Reduktionsmittel wie Kaliumborhydrid und Ascorbinsäure einen Anstieg des BAS-Signals. Diese Chemikalien geben leicht Elektronen ab, welche an den Elektroden des BAS umgesetzt werden und damit ein erhöhtes Stromsignal hervorrufen. Die Substanzen Cystein und Glutathion bewirkten ebenfalls einen Anstieg des BAS-Signals. Beide Substanzen haben in ihrer monomeren Form freie SH-Gruppen. Durch die Oxidation von zwei SH-Gruppen des Cysteins entsteht ein Cystin. Das Glutathion kann in der reduzierten Thiolform sowie in einer oxidierten Form, in der zwei der Tripeptide über eine Disulfidbrücke verknüpft sind, vorliegen. Die reduzierte Form des Glutathions dient als Sulfhydrylpuffer und spielt eine entscheidende Rolle bei Entgiftungsreaktionen mit Peroxiden (STRYER 1990). Die SH-Gruppen des Cysteins und des Glutathions können elektrochemisch oxidiert werden und damit ein Stromsignal an den Elektroden des BAS verursachen. Das Potential des Cystein/Cystin-Redoxpaars beträgt 350 mV und ist damit

80 mV niedriger als das Potential der Ameisensäure, aber die Potentialdifferenz zu den Elektroden des BAS ist ausreichend für eine elektrochemische Umsetzung. Die Wirkung des Redoxsystems Cystin/Cystein als extrazellulärer Elektronenüberträger wurde von Kaden bei der syntrophen Acetatoxidation durch *Geobacter sulfurreducens*- und *Wolinella succinogenes*-Ko-Kulturen gezeigt (KADEN 2003). Der extrazelluläre Elektronentransport über das Cystein wurde ebenfalls von Hernandez und Newman beschrieben (HERNANDEZ und NEWMAN 2001). Als Anforderung an einen potentiellen Elektronenüberträger wurde dabei neben einem geeigneten Redoxpotential auch die Reversibilität der Reduktion angegeben, welche für das Cystein gegeben sei. Das ebenfalls auf seine Wirkung auf den Elektronentransfer getestete starke Oxidationsmittel Wasserstoffperoxid entzieht dem System Elektronen und bewirkt daher einen Abfall des BAS-Signals.

Neben den Aussagen hinsichtlich der elektrochemischen Vorgänge an den Elektroden des BAS erlauben die durchgeführten Untersuchungen auch eine Abschätzung von möglichen Störeinflüssen auf das Sensorsignal. Es wurde gezeigt, dass erhöhte Konzentrationen an Reduktionsmitteln das BAS-Signal verstärken und dass Oxidationsmittel eine Verringerung des BAS-Signals bewirken. Die Änderungen der mikrobiellen Aktivität und die redoxaktive Wirkung der Chemikalien lassen sich nicht unterscheiden; die entsprechenden Konzentrationen liegen allerdings außerhalb des typischen Bereichs im kommunalen Abwasser und werden lediglich in speziellen Industriekläranlagen erreicht. Damit sind Störeinflüsse durch diese redoxaktiven Substanzen auf die BAS-Signale im praktischen Einsatz kaum zu erwarten.

6.2 Untersuchungen mit Modellorganismen

Da die Mikroorganismen in einer Belebtschlammflocke immer eine Mischkultur von verschiedenartigen Organismen darstellen, welche auf Änderungen der Kultivierung und der Betriebsbedingungen auf verschiedene Arten reagieren können, wurden zunächst Untersuchungen mit Modellorganismen durchgeführt. Hier können die Versuchsbedingungen weitestgehend konstant gehalten werden und die Änderungen der mikrobiellen Aktivität entsprechenden Ereignissen zugeordnet werden. Damit erlauben die Versuche mit Modellorganismen Aussagen bezüglich

- eines Vergleichs mit etablierten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität,
- der Wirkung von Stoffwechselgiften auf den Stoffwechsel der Mikroorganismen und die entsprechenden BAS-Signale sowie
- der Entstehung und Quantifizierung des BAS-Signals.

Weiterhin liegen für die Modellorganismen im Allgemeinen Literaturdaten vor, welche zur Analyse der resultierenden BAS-Signale herangezogen werden können.

6.2.1 Vergleich des elektrochemischen BAS-Signals mit etablierten Testmethoden

Den Untersuchungen wurde eine Überprüfung des geplanten Versuchskonzeptes vorangestellt, hier sollte die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gezeigt werden (siehe 5.2.1). Es wurden fünf Batch-Versuche mit *E. coli* durchgeführt, dabei waren Abweichungen zwischen den Signalverläufen festzustellen, diese Abweichungen lagen allerdings im Rahmen typischer biologischer Schwankungen. Damit konnte eine ausreichende Übereinstimmung festgestellt werden und die Versuchsdurchführung für weitere Untersuchungen als geeignet angesehen werden.

Durch die Untersuchung der Vergleichbarkeit zwischen dem elektrochemischen BAS-Signal und Methoden zur direkten und indirekten Aktivitätsbestimmung sollte einerseits das Sensorsignal mit den etablierten Methoden verglichen und andererseits die Vor- und Nachteile der verschiedenen Methoden dargestellt werden (5.2.2.1). Als Verfahren zur Bestimmung eines Aktivitätsparameters kamen die Bestimmung der Biotrockenmasse als Parameter für die Zellmassenzunahme, die Messung des Substratabbaus mittels Glucose-Messung sowie Bestimmung der Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff, die Messung der Proteinkonzentration als Parameter für die Konzentration der Zellbestandteile sowie die Messung der Aktivität der Dehydrogenasen als Schlüsselenzyme des Stoffwechsels zum Einsatz.

Es konnte zwischen dem BAS-Signal und den beschriebenen Methoden jeweils Übereinstimmungen hinsichtlich der Aussagen zur Aktivität der Mikroorganismen festgestellt werden. Die Korrelationen zwischen dem BAS-Signal und der Substratabnahme ließen sich dabei sowohl durch die Messung der Glucose-Konzentration als auch der Konzentration an gelöstem organischem Kohlenstoff beschreiben. Dabei zeigte die DOC-Messung eine bessere Übereinstimmung mit dem BAS-Signal. Das maximale BAS-Signal fiel mit dem vollständigen Glucose-Abbau zusammen, es wurde im nachfolgenden Versuchsverlauf weiterhin ein BAS-Signal gemessen. Während die Bestimmung der Glucose lediglich die Konzentration des Ausgangssubstrats beschreibt, berücksichtigt der DOC alle kohlenstoffhaltigen Substanzen in der Lösung. Diese können weitere im Medium vorkommende, kohlenstoffhaltige Substanzen oder ausgeschiedene Zwischenprodukte des Stoffwechsels sein. Diese Substanzen können nach Abbau des bevorzugten Substrates Glucose umgesetzt werden und dabei die mikrobielle Aktivität beeinflussen. Die Differentiation der Kurve des gelösten organischen Kohlenstoffes zeigte, dass das BAS-Signal während des Versuches proportional zum Substratabbau pro

Zeiteinheit war und damit die von Miksch geforderte wichtige Anforderung einer Proportionalität zwischen der gemessenen mikrobiellen Aktivität und dem Abbau des Substrates bzw. der Abwasserinhaltsstoffe aufweist (MIKSCH 1985).

Die parallele Messung der Aktivität der Dehydrogenasen und des BAS-Signals zeigte große Übereinstimmungen zwischen den Messsignalen. Neben dieser Korrelation kann allerdings nicht zwingend von einem kausalen Zusammenhang zwischen den Aktivitätssignalen ausgegangen werden. Ein direkter Elektronenübergang von den Dehydrogenasen auf die Elektroden des BAS ist aufgrund ihrer Molekülgröße und der Marcus-Theorie nicht zu erwarten (MARCUS 1993 und HABERMÜLLER et al. 2000), dagegen ist ein indirekter Zusammenhang zwischen der Dehydrogenaseaktivität und dem BAS-Signal über elektronenübertragende Substanzen zu erwarten, da jeweils ein Aktivitätsparameter bestimmt wird.

Während das BAS-Signal online und in-situ erfasst werden kann, benötigt die Bestimmung der Enzymaktivität eine zeit- und personalaufwändige Bearbeitung der Proben. Das Problem der aufwändigen Probenbearbeitung und der fehlenden Zeitnähe der Analyseergebnisse gilt analog für die offline Bestimmung der Biomasse- und Proteinkonzentration. Für nachfolgende Regelungs- und Steuerungsaufgaben ist allerdings eine zeitnahe Erfassung des Aktivitätssignals als unabdingbar anzusehen.

In der biologischen Abwasserreinigung ist die gravimetrische Messung einer Biomassekonzentration darüber hinaus nur bedingt als Aktivitätsparameter einsetzbar, da nicht zwischen aktiver und inaktiver Biomasse unterschieden werden kann. Methoden, welche eine Unterscheidung zwischen aktiver und inaktiver Biomasse erlauben, wie zum Beispiel Fluoreszenz-Techniken oder die Anfärbung von Zellen, bedeuten dagegen wiederum einen erheblichen Zeit-, Material- und Personalaufwand. Die Substratkonzentrationen lassen sich zwar online bestimmen, erlauben aber keine Aussage über die Aktivität der Mikroorganismen und die Abbaubarkeit des Substrats. Hier können nur Messungen im Zu- und Ablauf einer Abwasserreinigungsanlage eine Aussage über den Wirkungsgrad des mikrobiellen Abbaus und damit über die mikrobielle Aktivität ermöglichen.

Aus diesen Ergebnissen lässt sich zusammenfassend feststellen, dass die verschiedenen Messsysteme unter den gegebenen, definierten Bedingungen vergleichbare Signalverläufe aufweisen und dass damit das BAS-Signal als andersartig, aber gleichwertig zu den etablierten Methoden zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität angesehen werden kann.

Ein Vergleich der elektrochemischen Systeme Bioaktivitätssensor und 3-Elektrodensystem zeigte, dass mit beiden Messsystemen vergleichbare qualitative Kurvenverläufe aufgenommen werden konnten. Dagegen waren Unterschiede in den Stromdichten festzustellen: In dem

Versuch unter 5.2.2.2 wies die maximale Stromdichte des 3-Elektrodensystems einen ca. 3,3-mal höheren Wert auf wie die mit dem BAS-Sensor gemessene maximale Stromdichte. Ursache für diese Differenz sind die unterschiedlichen Potentiale der Sensorsysteme. Mit dem Potentiostaten wurde das Potential des 3-Elektrodensystems auf 300 mV gegen $\text{Ag}/\text{AgCl}_{\text{ges}}$ eingestellt, dieses Potential wurde in vorangegangenen Forschungsarbeiten zur optimalen Detektion der mikrobiellen Aktivität ermittelt (SELL 1991). Dagegen konnte sich das Potential zwischen den Elektroden des Bioaktivitätssensors während des Versuchs ändern. Die Potentialdifferenz zwischen der Kathode (Reduktion des Sauerstoffes + 810 mV) und der Anode (Oxidation der reduzierten Stoffwechselprodukte, Potential zwischen -300 und +200 mV) variiert mit der Zusammensetzung der Messlösung. Unter diesen variablen Bedingungen wurde eine geringere Menge an elektroaktiven Substanzen umgesetzt. Die maximale Stromdichte des BAS betrug $5 \mu\text{A cm}^{-2}$, die des 3-Elektrodensystems $16,7 \mu\text{A cm}^{-2}$. Von Schröder wurde die Anode mit einer leitfähigen Schicht aus Polyanilin beschichtet. Diese elektroaktive Schicht nimmt die Elektronen aus dem Stoffwechsel der Bakterien auf und überträgt sie auf die Anode, mit dieser Modifikation wurden kontinuierliche Stromdichten von $1,5 \text{ mA cm}^{-2}$ erreicht (SCHRÖDER et al. 2003). Die in dieser Arbeit gemessenen Stromdichten liegen in dem Bereich der Werte, welche bei Bond und Lovley mit *Geobacter sulfurreducens* (BOND und LOVLEY 2003) und bei Park und Zeikus mit Belebtschlamm als Biokatalysator sowie Eisen(III) und Mangan(IV) als Mediatoren (PARK und ZEIKUS 2003) erzielt wurden. Die entsprechenden Stromdichten betragen $6,5 \mu\text{A cm}^{-2}$ bzw. $0,18 \mu\text{A cm}^{-2}$.

In der praktischen Anwendung weisen die beiden elektrochemischen Messsysteme zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität Vor- und Nachteile auf; der BAS ist einfacher aufgebaut sowie für eine online Bestimmung ausgelegt und damit für praktische Anwendungen in biologischen Abwasserreinigungsanlagen oder bei der Fermentationskontrolle geeigneter. Dagegen erlaubt das aufwendigere 3-Elektrodensystem eine bessere Steuerung der elektrochemischen Vorgänge und kann daher im offline Betrieb im Labormaßstab oder für spezielle Anwendungsfelder, in denen die Funktionalität des BAS eingeschränkt ist, auch online wertvolle Informationen über die mikrobielle Aktivität liefern.

6.2.2 BAS-Signale bei der Kultivierung verschiedener Stoffwechseltypen

Durch die Kultivierung von verschiedenen Mikroorganismen mit unterschiedlichen Stoffwechselwegen und unter verschiedenen Kultivierungsbedingungen sollte untersucht werden, inwieweit die BAS-Signale von diesen Faktoren beeinflusst werden. In einer ersten Versuchs-

reihe wurden aerobe und anaerobe Fermentationen von *Escherichia coli* sowie *Saccharomyces cerevisiae* verglichen.

Escherichia coli gehört zu den Enterobacteriaceae und besitzt einen fakultativ anaeroben, chemoorganotrophen Stoffwechsel. Im Aeroben wird Glucose nach der Reaktionsgleichung 3-4 zu Kohlendioxid und Wasser umgesetzt, im Anaeroben führt der Organismus hingegen eine gemischte Säuregärung durch. Da Ameisensäure hier ein charakteristisches Produkt ist, wird der Stoffwechselweg auch als Ameisensäuregärung bezeichnet, weitere Produkte sind Ethanol, Succinat, Lactat, Acetat, Wasserstoff und Kohlendioxid.

Das Ergebnis des Versuchs zeigte, dass die Signale bei der anaeroben Kultivierung von *E. coli* ein ca. zehnmal höheres maximales Signal als bei der aeroben Kultivierung aufwiesen. Ursache der hohen Signale bei der anaeroben Kultivierung ist die Bildung der elektroaktiven Substanzen Ameisensäure und Wasserstoff. Die Umsetzung der Ameisensäure an den Elektroden des BAS wurde unter 5.1.1 gezeigt und unter 6.1 diskutiert. Wasserstoff wird sowohl in elektrochemischen als auch bioelektrochemischen Brennstoffzellen als Elektronendonator eingesetzt. In vielen der Biobrennstoffzellen wurden daher Mikroorganismen verwendet, welche Wasserstoff produzieren (siehe Tabelle 3-1). Von Tanisho wurde bei anaerob wachsenden Zellen von *Enterobacter aerogenes* auf Glucose gezeigt, dass der entstehende Wasserstoff die Hauptursache für den Stromfluss in der Brennstoffzelle ist (TANISHO et al. 1989). Die Normalpotentiale dieser Reaktionen (siehe Tabelle 9-2) sind bei 25 °C und pH 7 430 mV für die Umsetzung von Ameisensäure zu Kohlendioxid bzw. 410 mV für die Umsetzung des molekularen Wasserstoffs. Damit wird eine Potentialdifferenz zwischen der Anoden- und Kathodenreaktion von ca. 1,2 V erreicht. Diese hohe Potentialdifferenz gehört zu einer der wesentlichen Forderungen für einen effektiven Elektronentransfer in einer Brennstoffzelle und damit auch für die Detektion in dem BAS.

Die Hefe *Saccharomyces cerevisiae* ist sowohl zur Atmung als auch zur Gärung befähigt. Unter aeroben Bedingungen wird die Glucose nach Reaktionsgleichung 3-4 zu Kohlendioxid und Wasser oxidiert, unter anaeroben Bedingungen bildet *Saccharomyces cerevisiae* aus dem Substrat Glucose die Gärungsendprodukte Kohlendioxid und Ethanol. Der Energiegewinn bei der anaeroben Reaktion beträgt 235 kJ mol^{-1} , verglichen mit 2870 kJ mol^{-1} bei einer aeroben Kultivierung.

Im Gegensatz zu den Kultivierungen von *E. coli* wurden hier höhere BAS-Signale bei der aeroben als bei der anaeroben Kultivierung gemessen. Die maximale Höhe des Bioaktivitätssignals war bei den Versuchen mit *Saccharomyces cerevisiae* im Aeroben 4,4-mal höher als

im Anaeroben. Hier stellen die Endprodukte der Fermentation nicht den ausschlaggebenden Faktor für die BAS-Signale dar: weder Kohlendioxid noch Ethanol werden an der Anode des BAS umgesetzt. Vielmehr sind Zwischenprodukte des Stoffwechsels als Ursache des BAS-Signals anzusehen. Laut Zhang und Halme werden unter anaeroben Bedingungen von Hefen elektroaktive Substanzen wie NADH und NADPH in das Medium abgegeben, welche dann als Elektronendonatoren dienen können (ZHANG und HALME 1995). Die quantitativen Verläufe des BAS-Signals unter aeroben und anaeroben Bedingungen müssen auch unter dem Gesichtspunkt der Energieausbeute der entsprechenden Reaktionen betrachtet werden. Weiterhin muss auch der Einfluss des Sauerstoffs als Elektronenakzeptor berücksichtigt werden. Die Elektronen können unter aeroben Bedingungen auf den Sauerstoff oder die Anode des BAS übertragen werden, beide Reaktionen stehen damit in Konkurrenz als Elektronenakzeptor; ferner kann im Aeroben auch eine Reoxidation der reduzierten Stoffwechselintermediate in dem Medium auftreten. Unter diesen Gesichtspunkten würden die BAS-Signale unter aeroben Bedingungen negativ beeinflusst werden. Eine Abnahme der Effektivität des Elektronentransports durch eine Oxidation der reduzierten Stoffwechselintermediate und Mediatoren mittels Sauerstoff wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (ZHANG und HALME 1994 sowie BENNETTO et al. 1983).

Durch den Einsatz weiterer Organismen mit verschiedenen Stoffwechselwegen sollte versucht werden, Hinweise auf die stoffwechselphysiologischen Ursachen des Sensorsignals zu erhalten. Hierbei wurden Pseudomonaden, Lactobacillen, Stickstofffixierer und Methanol oxidierende Mikroorganismen eingesetzt.

Die Pseudomonaden besitzen einen strikt respiratorischen Stoffwechsel und können keine Gärungen durchführen. Bei Abwesenheit von Sauerstoff können denitrifizierende Arten Nitrat als Elektronenakzeptor verwenden. Im Gegensatz zu den ebenfalls Lactat produzierenden Enterobacteriaceae sind die Lactobacillen obligate Gärer, bei der Umsetzung von 1 mol Glucose gewinnen sie 198 kJ an Energie. Die Lactobacillen enthalten keine Hämine (Cytochrome, Katalase), trotz dieses Mangels sind die Lactobacteriaceae in der Lage, in Gegenwart von Luftsauerstoff zu wachsen, sie sind damit anaerob aber aerotolerant. *Azotobacter vinelandii* ist ein obligat aerober Stickstofffixierer. Die Stickstoff-Bindung erfolgt mit dem Nitrogenase-System, welches aus zwei Komponenten besteht: der Nitrogenase und der Nitrogenase-Reduktase. Beide Komponenten sind assoziiert im Cytoplasma lokalisiert und außerordentlich sauerstoffempfindlich. Neben dem NH_3 erzeugen daher alle Nitrogenase-Systeme auch Wasserstoff, welcher als „Schutzgas“ für die Nitrogenasen dient (SCHLEGEL

1992). *Methylobacillus* ist ein obligat Methanol oxidierendes Bakterium, die Kohlenstoffassimilation wird auf dem Ribulosemonophosphat-Weg durchgeführt und die Organismen besitzen nur einen unvollständigen Tricarbonsäurezyklus.

In den durchgeführten Versuchen konnte bei allen eingesetzten Mikroorganismen jeweils ein BAS-Signal registriert werden. Dieses Ergebnis zeigte, dass das Auftreten des BAS-Signals unabhängig vom Stoffwechsellyp der betrachteten Mikroorganismen ist. Da sowohl bei *Lactobacillus pentosus* und bei *Pseudomonas fluorescens* Signale mit dem BAS detektiert werden können, kann festgestellt werden, dass weder ein Gärungsstoffwechsel noch ein strikt aerober Stoffwechsel noch das Vorhandensein von Cytochromen zur Generierung des Sensorsignals notwendig ist. Es bleibt aber offen, ob bei unterschiedlichen Mikroorganismen ein bestimmter Mechanismus zu einem BAS-Signal führt oder, je nach Stoffwechsellyp, unterschiedliche Reaktionen durchlaufen werden, welche zu einem Sensorsignal führen.

Für die Mikroorganismen, welche mit Glucose als Kohlenstoffquelle kultiviert worden sind, lassen sich auch quantitative Aussagen treffen. Die Tabelle 6-1 zeigt die maximalen BAS-Signale sowie den Quotienten des maximalen BAS-Signals zu der verbrauchten Glucosemenge und den Energiegewinn.

Tabelle 6-1: Quantitativer Vergleich der BAS-Signale bei der Kultivierung verschiedener Mikroorganismen

Mikroorganismen	BAS _{max} mV	in $Y_{\text{BAS}_{\text{max}}/S}$ in mV g ⁻¹	$Y_{\text{BAS}_{\text{max}}/E}$ in mV kJ ⁻¹
<i>Escherichia coli</i> , aerob	2,3	3,04	0,19
<i>Escherichia coli</i> , anaerob	21,8	29,08	
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , aerob	2,2	1,04	0,07
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> , anaerob	0,5	0,24	0,18
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	1,6	1,68	0,12
<i>Lactobacillus pentosus</i>	0,5	0,16	0,15
<i>Azotobacter vinelandii</i>	15,7	16,8	

Auffallend hoch sind die Sensorsignale bei der anaeroben Fermentation von *E. coli* und bei der Kultivierung von *Azotobacter vinelandii*. Als Ursache kann bei der gemischten Säuregärung von *E. coli* das oben beschriebene Auftreten von Ameisensäure und Wasserstoff angesehen werden. Für *Azotobacter* wurde ebenfalls die intrazelluläre Bildung von Wasserstoff beschrieben. Dieser Wasserstoff sollte zwar mittels der Hydrogenasen dazu dienen, den

in die Zelle diffundierenden Sauerstoff zu reduzieren und damit das sauerstoffempfindliche Nitrogenase-System zu schützen. Darüber hinaus erscheint eine Diffusion des intrazellulär gebildeten Wasserstoffes zur Anode des BAS möglich. Dieses Ergebnis zeigt wiederum, dass die Bildung von Wasserstoff und Ameisensäure wesentliche Einflussfaktoren für die Höhe des BAS-Signals sind. Für die Höhe der maximalen BAS-Signale der weiteren Mikroorganismen ergab sich eine tendenzielle Übereinstimmung zu der in den Reaktionen gewonnenen Energie. Die Quotienten des maximalen BAS-Signals und der bei der Oxidation der Glucose gewonnenen Energie zeigte dabei Werte von 0,07-0,19 mV kJ⁻¹.

Eine weitere quantitative Aussage über das BAS-Signal lässt sich aus der Kultivierung von verschiedenen Mikroorganismen in einem definierten Medium ableiten (siehe 5.2.3). Dabei wiesen die BAS-Signale der aeroben Fermentationen von *Bacillus subtilis* subsp. *spizizenii*, *E. coli*, *Klebsiella terrigena*, *Pseudomonas* sp., *Flavobacterium gleum* und *Ralstonia eutropha* vergleichbare Peakflächen und damit auch vergleichbare Ladungsmengen auf, welche von dem Stoffwechsel der Mikroorganismen auf die Elektroden des BAS übertragen worden sind. Dieses Ergebnis zeigt, dass bei einem vergleichbaren Stoffwechselweg und dem daraus resultierenden Auftreten von reduzierten Stoffwechselsubstanzen auch vergleichbare BAS-Signale erzielt werden.

Die Untersuchungen zur Messung von Zellzahlen bzw. -massen mit dem Bioaktivitätssensor wurden unter 5.2.4 dargestellt. Hier wurde dargestellt, dass der Anstieg des BAS-Signals nur unter spezifischen Randbedingungen und mit Hilfe einer Kalibrierkurve zur Zellzahlbestimmung geeignet ist. Die eingesetzten Mikroorganismen müssen sich dabei in einem vergleichbaren Aktivitätszustand befinden, hierfür sind zum Beispiel konstante Bedingungen für die Vorkultur sowie eine Probenahme aus einer festgelegten Wachstumsphase notwendig. Weiterhin muss der Testzeitraum geringer sein als die Generationszeiten der Mikroorganismen, damit während der Untersuchungen keine Zellvermehrung stattfinden kann. Weiter wurde gezeigt, dass während einer Fermentation die Änderung des BAS-Signals als Summe aus der Änderung der Zellzahl und der Änderung der Aktivität pro Zelle gedeutet werden muss und dass sich die Aktivität pro Zelle während eines Versuchs um den Faktor 10 erhöhen kann.

6.2.3 Wirkung von stoffwechselaktiven Substanzen auf die mikrobielle Aktivität

Mit kompetitiven und irreversiblen Inhibitoren kann der Stoffwechsel der Mikroorganismen selektiv gehemmt bzw. blockiert werden. Die Effekte auf den Stoffwechsel sind ähnlich wie die von Mutationen: die Funktion einzelner Enzyme wird blockiert, vor dem Block stauen sich die Metabolite an und auf der Produktseite fehlen die entsprechenden Metabolite. Durch den Einsatz von entsprechenden Hemmstoffen sollte versucht werden, Hinweise auf die zelluläre Ursache des Auftretens der reduzierten Stoffwechselsubstanzen, welche an der Anode des BAS umgesetzt werden, zu erhalten. Die Versuche wurden mit den Organismen *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* durchgeführt (siehe 5.2.5).

Von den in der Atmungskette angreifenden Hemmstoffen zeigten bei *E. coli* Cyanid und Azid eine signalreduzierende Wirkung auf das BAS-Signal, dagegen beeinflusste die Dosierung von Antimycin A den Signal-Verlauf nicht. Die Wirkung von Hemmstoffen der Atmungskette bei *S. cerevisiae* wurde ebenfalls mit Antimycin A, Natriumazid und Rotenon untersucht, diese Substanzen zeigten jeweils eine hemmende Wirkung auf den Stoffwechsel von *S. cerevisiae* und in der Folge auf das BAS-Signal. Das Bakteriostatikum Chloramphenicol bewirkte bei *E. coli* in allen getesteten Konzentrationen einen Anstieg des BAS-Signals, bei höheren Konzentrationen wurden auch die Substrataufnahme und die Biomassenbildung gehemmt. Da die Biosynthese der Mikroorganismen inhibiert wird, ist hier der Anstieg des BAS-Signals auf einen größeren Anteil des im Energiestoffwechsel verwerteten Substrates zurückzuführen. Das Fluoracetat bewirkte als Hemmstoff des Tricarbonsäurezyklus in den untersuchten Konzentrationen keine akut hemmende Wirkung auf den Stoffwechsel der Mikroorganismen und damit auf das BAS-Signal.

Von den Ergebnissen ist die Wirkung des 2,4-Dinitrophenols (DNP) hervorzuheben, die Kopplung zwischen Elektronentransport und oxidativer Phosphorylierung wird durch diesen Entkoppler aufgehoben. Durch das DNP wird damit die Fähigkeit zur ATP-Synthese zerstört, ohne dass dabei die Sauerstoffaufnahme der Zellen gestört wird. Das DNP zeigte unterschiedliche Wirkungen auf die BAS-Signale bei der Kultivierung von *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae*. Bei *E. coli* bewirkte die DNP-Dosierung einen starken Anstieg des BAS-Signals und bei *S. cerevisiae* bewirkten vergleichbare Konzentrationen einen Abfall des BAS-Signals. Der Substratabbau wird bei den Organismen im gleichen Maße beeinflusst, bei hohen Konzentrationen an DNP wird die Substratverwertung verlangsamt. Dieses Ergebnis zeigt wiederum, dass die Ursache der Entstehung der BAS-Signale bei diesen Organismen unterschiedlich ist. Bei dem Prokaryonten *E. coli* werden nach der Dosierung des DNP ver-

mehrt reduzierte Substanzen ausgeschieden, während *S. cerevisiae* nach der DNP-Dosierung geringere Konzentrationen an reduzierten Stoffwechselintermediaten ausscheidet. Von Strotmann wurde die Wirkung von DNP auf Belebtschlamm untersucht, hier wurde beobachtet, dass durch diese Dosierung die Dehydrogenaseaktivität gehemmt, während die Atmungsaktivität stimuliert wurde (STROTSMANN 1992). Durch die Wirkung des Entkopplers wird von den Mikroorganismen kein ATP mehr gebildet. Weiterhin haben die Hemmstoffe der Enzyme ATPase und Adeninnucleotid-Translokase, Oligomycin und Atractylosid, jeweils keine akute Wirkung auf die BAS-Signale gezeigt.

Anhand der Ergebnisse wird auch deutlich, dass durch den Einsatz von spezifischen Hemmstoffen die Kopplung zwischen dem BAS-Signal und der Substratverwertung aufgehoben werden kann. Die Dosierungen von Chloramphenicol und Dinitrophenol zu *E. coli* bewirkten einen Anstieg der BAS-Signale, ohne dass eine entsprechende Beschleunigung der Substratverwertung stattfand.

Das Natriumfluorid hemmt die Enolase-Reaktion der Glykolyse (Fructose-1,6-bisphosphat-Weg): nach einer Dosierung von NaF zu aerob wachsenden Zellen von *S. cerevisiae* fiel das BAS-Signal schnell ab. Durch diese Hemmung können die nachfolgenden Reaktionen im Tricarbonsäurezyklus und der Atmungskette nicht weiter ablaufen. Der Transkriptionshemmstoff Actinomycin D und der Ionophor Valinomycin zeigten keinen Einfluss auf den Stoffwechsel der Mikroorganismen und damit auf das Signal des Bioaktivitätssensors. Das Nystatin bewirkte einen sofortigen Abfall des BAS-Signals, diese Substanz schädigt die Mikroorganismenzellen einerseits durch eine oxidative Wirkung und wirkt andererseits auf die Plasmamembran, indem durch eine Komplexierung mit Ergosterol eine Zunahme der Membranpermeabilität bewirkt wird. Durch die Erhöhung der Membranpermeabilität wäre bei einem in den Mikroorganismenzellen vorhandenen Pool an reduzierten Stoffwechselintermediaten eine erhöhte Ausschüttung dieser Substanzen zu erwarten gewesen, welche mittelfristig einen Anstieg des BAS-Signals hervorgerufen hätten. Daher kann von einer Wechselwirkung des Elektronenüberträgers mit den stoffwechselaktiven Komponenten ausgegangen werden und nicht von der Reaktion mit einem Reservoir der Substanzen in den Mikroorganismen.

Die Deutung der durchgeführten Versuche muss einerseits vor dem Hintergrund der Stoffwechselvielfalt der Mikroorganismen und andererseits unter Berücksichtigung der Randbedingungen der Versuchsdurchführung erfolgen. Die Vielfalt der Stoffwechselwege ermöglicht den Mikroorganismen unter entsprechenden Bedingungen das Umschalten auf einen alternativen Stoffwechselweg. Die Versuchsdurchführung erlaubt keine Aussagen über

langfristige Wirkungen der Hemmstoffe. Weiterhin ist zu beachten, dass diese Effekte konzentrationsabhängig sind. Anhand der durchgeführten Versuche mit aerob wachsenden *Escherichia coli* und *Saccharomyces cerevisiae* erscheint ein Zusammenhang zwischen dem Elektronentransfer zu den Elektroden des BAS und den Komponenten der Atmungskette wahrscheinlich, da im Wesentlichen die Hemmstoffe der Atmungskette indirekt zu einem Signalabfall des BAS geführt haben. Als Wirkprinzip von Redoxmediatoren wurde in der Literatur häufig deren strukturelle Ähnlichkeit mit Komponenten der Atmungskette beschrieben, zum Beispiel hat der Mediator 2-Hydroxy-1,4-Naphthochinon eine vergleichbare Struktur wie das Menachinon (SELL 2001). Dies legt auch einen möglichen Zusammenhang zwischen der Signalentstehung und der Atmungskette auch bei Abwesenheit eines Mediators nahe. Da allerdings auch für gärende Organismen mit dem BAS ein BAS-Signal gemessen werden konnte, kann die Atmungskette nicht der alleinige Ursprung des BAS-Signals sein. Die große Bedeutung der Hemmstoffe der Atmungskette lässt sich auch durch den hohen Energiegewinn der Mikroorganismen aus den Reaktionen der Atmungskette erklären..

6.2.4 Charakterisierung der BAS-Signale

Unter 5.2.6 wurden Untersuchungen zur Charakterisierung der BAS-Signale durchgeführt. Versuche mit *E. coli* haben gezeigt, dass bereits 3,5 s nach einer Substratdosierung eine Änderung des BAS-Signals festzustellen ist. In diesem Zeitraum müssen die Durchmischung des Substrats in dem Reaktor, die Aufnahme des Substrates, die biologische Umsetzung innerhalb der Mikroorganismen, das Ausscheiden der elektroaktiven Substanzen und die Umsetzung der reduzierten Stoffwechselintermediate an der Anode abgelaufen sein. Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurden Untersuchungen zur zeitlichen Dynamik des Kohlenstoff-Metabolismus von *E. coli* durchgeführt. Die zeitliche Dynamik der Konzentration der intrazellulären Adenylat-Nucleotide (ATP, ADP, AMP) und der Pyridin-Nucleotide (NAD, NADH, NADP, NADPH) nach einem Substratpuls wurde zum Beispiel von Chassagnole untersucht, hier waren deutliche Konzentrationsänderungen innerhalb eines Zeitfensters von wenigen Sekunden messbar. Es wurde weiterhin gezeigt, dass die intrazellulären Konzentrationen der Metabolite wie Glucose-6-Phosphat und Pyruvat innerhalb von 0,2 s signifikant angestiegen waren (CHASSAGNOLE et al. 2002). Diese Reaktionen berücksichtigen den Transport der extrazellulären Glucose in die Mikroorganismenzelle und die entsprechenden biochemischen Umsetzungen. Unter der Voraussetzung, dass die reduzierten Stoffwechselintermediate, welche an den Elektroden das BAS umgesetzt werden, zeitlich mit diesen Reaktionen zusammenhängen, kann von einer schnellen mikrobiellen Reaktion ausgegangen

werden. Die Gesamtzeit, bis ein Signalanstieg mit dem BAS gemessen werden kann, wird demnach im Wesentlichen von dem Transport der Stoffwechselintermediate aus der Zelle und der Diffusion an die Elektrode bestimmt. Aus dem Ergebnis kann zusammenfassend festgestellt werden, dass die Erfassung der mikrobiellen Aktivität mit dem BAS zeitnah erfolgt und damit die entsprechende Anforderung an ein Messsystem zur Aktivitätsbestimmung erfüllt wird. Auf diese Weise ergibt sich auch, dass die in der Abbildung 3-1 beschriebene Geschwindigkeitskonstante k_1 für die Umsetzung des Substrates klein ist verglichen mit der Summe aus der Geschwindigkeitskonstante k_2 für die Umsetzung der reduzierten Stoffwechselintermediate an der Anode und der Diffusion der Substanzen aus den Zellen in das Medium sowie an die Elektrode. In der Proteinelektrochemie ist in der Regel die Diffusion des Proteins zur Elektrode der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Gesamtreaktion.

In einer Untersuchung zum Einfluss des direkten Kontaktes zwischen den Mikroorganismen und der Anode wurde gezeigt, dass dieser Kontakt nicht für die Entstehung des BAS-Signals notwendig ist. Dieses Ergebnis steht im Widerspruch zu der Darstellung von Matsunaga, dass der direkte Kontakt der Mikroorganismen mit der Elektrode notwendig für die Entstehung des Stromsignals sei (MATSUNAGA et al. 1979). Laut Park können dagegen intakte Bakterienzellen nicht an einer Elektrode reagieren, da elektroaktive Proteine wie Atmungsketten-Cytochrome von Membranen umgeben sind (PARK et al. 1997). Ebenfalls kann mit Hilfe dieser Untersuchungen ein Elektronentransport über hochmolekulare Substanzen wie Cytochrome ausgeschlossen werden, da diese Substanzen nicht durch eine Dialysemembran mit einer Ausschlussgrenze von 1000 Dalton gelangen können. Von Chaudhuri und Lovley wurden als wesentliche Ursache für das Auftreten eines Stromsignals in einer Biobrennstoffzelle die Mikroorganismen, welche auf der Elektrodenoberfläche aufwachsen, identifiziert (CHAUDHURI und LOVLEY 2003), dies kann für die durchgeführten Versuche mit dem verwendeten Bioaktivitätssensor ausgeschlossen werden. Die Bildung von Biofilmen auf den Elektroden ist hier nicht der entscheidende Faktor für die Entstehung des BAS-Signals, dies konnte auch durch den Austausch der Elektroden während der Versuche gezeigt werden, hier war unabhängig von einem Biofilm auf den Elektroden ein vergleichbares Signal festzustellen.

In der Literatur wurde die Wirkung von Huminstoffen als Mediatoren für den Elektronentransfer zwischen Mikroorganismen und elektrochemischen Systemen diskutiert. Eine entsprechende Untersuchung der Wirkung von Huminstoffen als Mediatoren bei der Kultivie-

ung von *E. coli* hat gezeigt, dass dort die verwendeten Substanzen keinen Einfluss auf das BAS-Signal hatten. Die Huminstoffe sind strukturell sehr heterogen und enthalten eine Vielzahl von redoxaktiven Gruppen, wie zum Beispiel chinoide Substanzen, welche auch in den meisten Mediatoren vorliegen. Die Huminstoffe entstehen beim Abbau von organischen Substanzen und setzen sich hauptsächlich aus den schwer abbaubaren Anteilen der Biomasse zusammen. Damit kann das Auftreten dieser Substanzen bei allen mikrobiellen Prozessen erwartet werden. Aufgrund dieser Heterogenität der Huminstoffe kann der Elektrodentransfer über diese Substanzen jedoch nicht generell ausgeschlossen werden.

Bei der kontinuierlichen Kultivierung von *E. coli* TG1 (siehe 5.2.6.4) zeigte das BAS-Signal unabhängig von der eingestellten Verdünnungsrate einen nahezu konstanten Wert, obwohl den Mikroorganismen bei höheren Verdünnungsraten ein entsprechend höheres Substratangebot zur Verfügung steht. Dies wurde entsprechend auch in der Literatur beschrieben, Rabaey zeigte, dass die elektrischen Ausbeuten bei einem höheren Substrat-Feeding abnehmen (siehe auch 3.1.2, RABAEY et al. 2003). Die Versuche wurden in einem Bereich der Wachstumsraten von $0,10 - 0,33 \text{ h}^{-1}$ durchgeführt und damit unterhalb der von Kayser angegebenen kritischen Verdünnungsrate von $D = 0,43 \text{ h}^{-1}$ (KAYSER 1999). Weiterhin wurde von Kayser gezeigt, dass erst bei Wachstumsraten von größer $D = 0,40 \text{ h}^{-1}$ nennenswerte Mengen an organischen Säuren, wie zum Beispiel Acetat, gebildet werden und damit eine verstärkte Bildung von weiteren, nicht vollständig oxidierten Substanzen wie Ameisensäure erwartet werden.

Eine Abschätzung der Konzentration der Elektronendonatoren wurde durch Puls-Versuche mit *E. coli* TG1 und einer Glucose-Lösung im Chemostaten durchgeführt (5.2.6.4). Hier wurde gezeigt, dass bei aerob wachsenden *E. coli*-Zellen $0,54 \text{ Coulomb pro mol Glucose}$ an der Anode des BAS umgesetzt wird und dieses einem Anteil von ca. $2,3 \cdot 10^{-5} \%$ der bei der Oxidation von Glucose umgesetzten Elektronen entspricht.

In der Literatur sind Brennstoffzellen mit höheren Wirkungsgraden beschrieben worden; im Allgemeinen sind diese höheren Elektronentransferraten durch den Einsatz von frei diffundierbaren Mediatoren oder Mediator-haltigen Beschichtungen sowie unter anaeroben Bedingungen erzielt worden. Von Sell wurden mit anaerob-wachsenden *E. coli*-Zellen als Biokatalysator und HNQ als Mediator in einer Brennstoffzelle mit einer Sauerstoffdiffusionskathode und einer Festbettanode Wirkungsgrade von 10% erzielt (SELL 1991). Park und Zeikus haben Belebtschlamm als Biokatalysator und eine Mangan(IV)-Graphit-Anode sowie eine Eisen(III)-Graphit-Kathode eingesetzt; Eisen(III) und Mangan(IV) wirkten als Mediatoren

ren und bewirkten eine 1000fache Vergrößerung der Ströme (PARK und ZEIKUS 2003). Chaudhuri und Lovley haben in einer kompartmentierten Brennstoffzelle anaerob wachsende *Rhodospirillum rubrum*-Zellen ohne einen Mediator eingesetzt, hierbei wurden 83 % von den theoretisch übertragbaren Elektronen aus der Oxidation der Glucose auf die Anode der Brennstoffzelle transferiert (CHAUDHURI und LOVLEY 2003). Die Möglichkeiten eines Mediatoreinsatzes werden für den Abwasserbereich unter 6.3 diskutiert. Eine Vielzahl von Autoren hat dargestellt, dass die Effizienz der direkten Elektronenübertragung gering sei (ALLEN 1972, BENNETTO et al. 1983, KIM et al. 2000). Diese Effizienz ist für den Betrieb einer Biobrennstoffzelle einer der entscheidenden Faktoren, stellt allerdings in analytischen Anwendungen nur einen Faktor dar, der die Empfindlichkeit des Sensorsystems beeinflusst, und kann bei einer ausreichenden Sensitivität des Sensorsystems vernachlässigt werden.

Aus der Elektronenbilanz lässt sich auch eine Aussage über die Konzentration an reduzierten Stoffwechselintermediaten treffen, welche an der Anode des BAS umgesetzt werden. Unter der Voraussetzung eines 1-Elektronenübergangs ergibt sich, dass pro mol Glucose $5,52 \cdot 10^{-6}$ mol Intermediate an der Anode umgesetzt werden und entsprechend bei einem Transfer von 2 Elektronen pro Intermediat eine Substanzmenge von $2,76 \cdot 10^{-6}$ mol. Bei der Umsetzung von Ameisensäure an einer Platinanode werden zum Beispiel 2 Elektronen übertragen, damit ergibt sich bei einer Glucosekonzentration von 4 g L^{-1} (entsprechend $22,2 \cdot 10^{-3} \text{ mol L}^{-1}$, siehe Abbildung 5-5) eine Konzentration an Ameisensäure von $6,22 \cdot 10^{-8} \text{ mol L}^{-1}$ bzw. als Massenkonzentration ausgedrückt $2,86 \cdot 10^{-6} \text{ g Ameisensäure pro Liter}$.

Die Mechanismen, welche zu dem Elektronentransfer an die Elektroden des BAS führen, können auch nach Abschluss der Untersuchungen nicht exakt beschrieben werden. Es lässt sich aber aus den bisherigen Untersuchungen die Aussage treffen, dass ein Reaktionssystem, welches für das Signal verantwortlich ist, in allen bisher untersuchten Mikroorganismen und Stoffwechselwegen vorhanden ist. Das BAS-Signal kann damit aus einem physiologischen Reaktionssystem resultieren, welches in der Biosphäre weit verbreitet ist, oder es kann sich bei dem Auftreten des BAS-Signals um einen Vorgang handeln, der nicht an eine oder wenige physiologische Reaktionen, sondern unspezifisch an eine Vielzahl biologischer Redoxreaktionen gekoppelt ist und damit einen Summenparameter für diese Reaktionen darstellt.

6.3 Messung der mikrobiellen Aktivität in der biologischen Abwasserreinigung im Laborbetrieb

6.3.1 Detektion der mikrobiellen Stoffwechselvorgänge der biologischen Abwasserreinigung

Im Rahmen der Untersuchungen in den Laborkläranlagen konnte die Aktivität von Mikroorganismen in der biologischen Abwasserreinigung gemessen werden. Die Untersuchungen haben die Eignung des BAS zur Detektion der Aktivität der

- aeroben, heterotrophen (5.3.1)
- aeroben, autotrophen (5.3.2)
- anoxischen, heterotrophen (5.3.3)
- und anaeroben (5.3.4)

Stoffwechselvorgänge gezeigt (HOLTMANN und SELL 2002). Dies bedeutet, dass das Sensorsystem in der Lage ist, alle relevanten Stoffwechselvorgänge in der biologischen Abwasserreinigung zu erfassen. Von den unter 3.3 beschriebenen Verfahren zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität basiert ein Großteil der Geräte auf der Messung der Sauerstoffzehrung, womit eine Erfassung der anoxischen und anaeroben Stoffwechselvorgänge ausgeschlossen ist. Daneben stellt das Ergebnis der Sauerstoffzehrungsmessung einen Summenparameter der unterschiedlichen sauerstoffverbrauchenden Prozesse in einer Abwasserprobe dar; neben der Veratmung des Sauerstoffs beim Abbau des gelösten Substrats laufen weitere chemische und biochemische Prozesse sowie die Atmung der Organismen beim Verbrauch der Speicherstoffe ab. Zwischen all diesen Vorgängen kann bei der Messung der Sauerstoffzehrung nicht unterschieden werden.

Aus den Ergebnissen zur Bestimmung der Nitrifikation kann geschlossen werden, dass sowohl die mikrobielle Aktivität der Ammonium- als auch die Aktivität der Nitrit-Oxidierer mit dem BAS detektiert werden können. Da die nitrifizierenden Arten nur langsam wachsen und sehr empfindlich gegenüber Temperatur- und pH-Schwankungen sowie toxischen Abwasserinhaltsstoffen sind, stellt die Nitrifikation die Achillesferse der Stickstoffentfernung in Kläranlagen dar (WAGNER 2000). Daher ist es besonders notwendig, für diesen Bereich eine Messmethode zur Verfügung zu stellen, welche die Aktivität der Nitrifikanten erfasst. Dagegen ist die Denitrifikation im Allgemeinen ein verhältnismäßig stabiler Prozess, trotzdem kann hier ein Aktivitätssignal die Prozessführung unterstützen, z.B. hinsichtlich eines Schut-

zes vor toxischen Einflüssen auf die heterotrophen Denitrifikanten und der Dosierung der Elektronendonatoren (5.3.3.2). Die anaerobe biologische Abbaubarkeit wird üblicherweise über die Biogasbildung volumetrisch oder manometrisch bestimmt, mit dem BAS steht ein Messsystem zur Verfügung, welches direkt die mikrobielle Aktivität bestimmt und damit zum Beispiel bei Vergärungsversuchen wertvolle Informationen bezüglich dieses Parameters liefern kann.

Durch Zudosierung von Substraten wurde für die einzelnen Stoffwechselforgänge ein linearer Zusammenhang zwischen dem Substratangebot und der entsprechenden Peakfläche des BAS-Signals gezeigt. Die Tabelle 6-2 zeigt die in den verschiedenen Untersuchungen eingesetzten Substrate, die resultierende Geradengleichung sowie die Nachweisgrenze der Substanzen.

Tabelle 6-2: Vergleich des Abbaus verschiedener Substrate

Substanz	Geradengleichung der Peakfläche als Funktion des zudosierten CSB in mg L^{-1}	Nachweisgrenze
Abwasser- konzentrat	Peakfläche = $1,1 \cdot 10^{-6} \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	
Glucose	Peakfläche = $7 \cdot 10^{-6} \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	6,6 mg L^{-1}
Methanol	Peakfläche = $1,9 \cdot 10^{-6} \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	17,5 mg L^{-1}
Ethylenglycol	Peakfläche = $8,1 \cdot 10^{-7} \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	47,8 mg L^{-1}
2-Propanol	*	*
Ammonium (Nitrifikation)	Peakfläche = $2,6 \cdot 10^{-4} \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	2,7 $\text{mg NH}_4\text{N L}^{-1}$
Acetat (Denitrifikation)	Peakfläche = $2 \cdot 10^{-6} \cdot \text{CSB} - \text{Belastung}$	9,3 $\text{mg NO}_3\text{N L}^{-1}$

(*kein messbarer Abbau)

Das Abwasserkonzentrat beinhaltet alle für den Stoffwechsel der Mikroorganismen notwendigen Medienbestandteile, die Substanzen Glucose, Methanol, Ethylenglycol sowie 2-Propanol wurden als zusätzliche Kohlenstoffquellen eingesetzt. Dagegen wurde das Acetat als leichtabbaubare Kohlenstoffquelle unter denitrifizierenden Bedingungen eingesetzt. Der Anstieg der Geradengleichungen für diese Substrate variierte zwischen $8,1 \cdot 10^{-7}$ bis $7 \cdot 10^{-6}$

Flächeneinheiten pro mg CSB L⁻¹. Für die unter 5.3.1.4 eingesetzten Substrate kann eine Reihenfolge für die Abbaubarkeit angegeben werden:

Glucose > Methanol > Ethylenglycol > Propanol

Dieses entspricht den zu erwartenden Ergebnissen: Glucose und Methanol sind leicht abbaubar, dagegen sind Ethylenglycol und Propanol von den in Kläranlagen vorkommenden Mikroorganismen nicht oder nur schwer abbaubar. Dieses Ergebnis stellt eine Beschreibung für die vorhandene Mikroorganismenbiozönose in der Modellkläranlage dar und ist abhängig von der Adaption der Mikroorganismen an das Substrat sowie von den im Belebtschlamm vorkommenden Organismen und kann bei einer anderen Biozönose andere Werte annehmen (HOLTMANN et al. 2001).

Die größte Steigung nach der Substrat-Dosierung zeigte das Ammonium als Substrat der autotrophen Nitrifikanten, der gemessene Wert betrug $2,6 \cdot 10^{-4}$ Flächeneinheiten pro mg CSB L⁻¹ und lag damit ca. zwei Zehnerpotenzen höher als bei heterotrophen Prozessen. Die Untersuchungen unter 5.3.6 zum Vergleich der gemessenen BAS-Signale mit theoretisch bestimmbaren Werten bei der Substratumsetzung haben eine vergleichbare Reihenfolge gezeigt. Die heterotrophen Prozesse des aeroben Glucoseabbaus und der anoxischen Acetatverwertung haben für das Verhältnis der Peakfläche des BAS und des theoretischen Energiegewinns vergleichbare Werte gezeigt, die entsprechenden Werte für die aerobe Umsetzung von Ammonium und Nitrit lagen wiederum bedeutend höher. Diese Aussagen gelten analog für den Quotienten aus der Peakfläche des BAS und den übertragbaren Elektronen, hier waren die Unterschiede allerdings weniger ausgeprägt.

Diese Ergebnisse waren so nicht zu erwarten, da die Energieausbeuten bei den heterotrophen Prozessen höher sind als bei der autotrophen Nitrifikation. Da weiterhin für die Nitrifikationsreaktionen sowie für die Kohlendioxidfixierung über den Calvin-Zyklus kein Auftreten von redoxaktiven Substanzen bekannt ist, kann dies ebenfalls nicht die Ursache für diese hohen Werte sein. Ein möglicher Grund für die hohen Werte nach der Ammonium-Dosierung ist die vergleichsweise niedrigere Affinität der Nitrifikanten zum Sauerstoff; in der Tabelle 3-3 ist für die heterotrophen Mikroorganismen ein Wert von $0,2 \text{ g Sauerstoff m}^{-3}$ und für die autotrophen Mikroorganismen ein Wert von $0,4 \text{ g m}^{-3}$ angegeben. Hier würde es die geringere Affinität zu dem Sauerstoff als Elektronenakzeptor ermöglichen, dass ein höherer Anteil der Elektronen statt auf den Sauerstoff auf die Elektroden des BAS übertragen werden könnte.

In den Versuchen konnte gezeigt werden, dass zur Detektion der Aktivitäten des Belebtschlammes kein Mediator nötig ist, da bereits ein ausreichender Stromfluss ohne diese artifiziellen Elektronenüberträger detektiert werden konnte. Dieses ist für den Einsatz in einer

Kläranlage günstig, da unter diesen Bedingungen der Sensor als online Messsystem eingesetzt werden kann. Bei einer Notwendigkeit zum Einsatz eines Mediators wäre die Gebrauchsfähigkeit des Bioaktivitätssensors eingeschränkt, in diesem Falle wäre nur eine diskontinuierliche Kontrolle der Aktivität möglich. Hier müsste der Mediator nach einer Probenahme zudosiert werden und anschließend müsste einige Zeit gewartet werden, bis die Mikroorganismen mit dem Mediator reagiert hätten. Nach der Messung würde die Probe verworfen bzw. in die Kläranlage zurückgegeben werden. Für einen Einsatz des Mediators, zum Beispiel um die Sensitivität des Systems zu erhöhen, wäre ein Screening auf einen geeigneten Mediator oder, wie bei Patchett vorgeschlagen, auf einen geeigneten „Mediatorcocktail“ nötig (PATCHETT 1988). Für den Einsatz von Mediatoren in der biologischen Abwasserreinigung ergeben sich weitere limitierende Faktoren. Die extrazellulären polymeren Substanzen der Belebtschlammflocke stellen eine Diffusionsbarriere für die künstlichen Elektronenakzeptoren dar, welche eine schnelle Diffusion der Mediatoren in die Mikroorganismenzellen und entsprechend aus den Zellen hinaus behindert. Weiterhin können die Mediatoren zum Teil oder quantitativ in die EPS-Matrix eingelagert werden. Durch diese Veränderung der Mediatorkonzentration wird das Stromsignal des BAS beeinflusst, ohne dass die Abweichung auf eine Veränderung der mikrobiellen Aktivität zurückzuführen wäre. Ein Abbau der Mediatoren durch die Belebtschlammorganismen kann nicht ausgeschlossen werden. Damit ergeben sich in der Kombination des Belebtschlammes mit den Mediatoren erhebliche Abweichungen von den Anforderungen an einen idealen Mediator (STIRLING et al. 1983 und TANAKA et al. 1983).

Zur Charakterisierung der zeitlichen Dynamik der aeroben heterotrophen Stoffwechselläufe wurden neben den dargestellten Pulsversuchen auch Sprungversuche durchgeführt (5.3.1.2). Nach einer Erhöhung des Substratzuflusses stieg das BAS-Signal sofort stark an, erreichte einen maximalen Wert, fiel dann wieder ab und es stellte sich anschließend ein neuer Fließgleichgewichtszustand ein. Durch die Biomassenrückführung in die Abwasserreinigungsanlagen war ein höherer Biomassengehalt als zum Abbau des ursprünglich vorliegenden Substrates notwendig vorhanden. Die vorhandene Biomasse war daher ausgezehrt, dies bedeutet, dass die Mikroorganismen das Potential hatten, mehr als das vorhandene Substrat abzubauen. Durch das zusätzliche Substrat wurde der Stoffwechsel der Organismen stimuliert und es wurden verstärkt reduzierte Stoffwechselintermediate ausgeschieden. Im weiteren Verlauf stellte sich die Mikroorganismenpopulation auf das erhöhte Substratangebot ein und

die Stoffwechselaktivität der Organismen wurde wieder verringert (HOLTMANN et al. 2001).

Durch die Sprungsignale konnte ein Zusammenhang zwischen der Verweilzeit des Abwassers bzw. dem Substratangebot und dem BAS-Signal aufgezeigt werden. Hier änderten sich die BAS-Signale im Fließgleichgewicht bei niedrigen Verweilzeiten entsprechend dem Substratangebot und bei hohen Verweilzeiten und einem entsprechenden niedrigen Substratangebot waren die BAS-Signale konstant. Es zeigte sich für die Sauerstoffzehrung ein vergleichbarer Kurvenverlauf. Damit lassen sich aus den Aktivitätssignalen vergleichbare Aussagen ableiten. Qualitativ entspricht dieses Ergebnis dem Versuch mit *E. coli* im Chemostaten unter 5.2.6.4, auch hier war bei unterschiedlichen Verdünnungsraten das BAS-Signal konstant. Für die praktische Anwendung der elektrochemischen Bioaktivitätssensorik zeigt dieses Ergebnis, dass unter den eingestellten Bedingungen nicht von den BAS-Signalen im Fließgleichgewicht auf den Substratabbau bzw. das vorhandene Substratangebot geschlossen werden kann, diese Aussage gilt entsprechend auch für die Messung der Sauerstoffzehrung. Weiterhin wurde in den Untersuchungen beobachtet, dass die BAS-Werte im Fließgleichgewicht zwar innerhalb einer Versuchsreihe vergleichbar waren, aber zwischen den Versuchsreihen keine Vergleichbarkeit der Signale bestand. Ein Grund für diese Schwankungen der Messwerte ist die große Vielfalt der von den mikrobiellen Mischpopulationen des Belebtschlammes durchgeführten Stoffwechselwege und damit der ausgeschiedenen Stoffwechselprodukte.

Unter 5.3.1.5 wurde der Zusammenhang zwischen der Anzahl der Mikroorganismen und der Aktivität des Belebtschlammes sowie dem BAS-Signal untersucht. Wie zu erwarten wurde gezeigt, dass die aus einer Substratdosierung resultierenden Aktivitätsänderungen hier lediglich auf einen Anstieg der Aktivität der vorhandenen Mikroorganismen zurückzuführen waren und nicht auf eine Zunahme der Biomassekonzentration. Die Substratdosierung bewirkte bei Biomassekonzentrationen über $1,0 \text{ g L}^{-1}$ eine nahezu konstante Peakfläche, bei geringeren Konzentrationen an Biomasse war dagegen ein Anstieg der Peakflächen zu erkennen. Bei hohen Biomassekonzentrationen wurden die Substrate aufgrund des ausgezehrteten Zustands der Zellen zu einem großen Anteil zur Erhaltung der Stoffwechselaktivität der Mikroorganismen verbraucht, bei niedrigeren Konzentrationen an Biomasse verursachte das Substrat einen Anstieg des Energiestoffwechsels und damit die vermehrte Ausscheidung von Stoffwechselprodukten, welche einen Anstieg des BAS-Signals bewirkten. Diese Deutung kann entsprechend auf die oben beschriebene Sprungversuche zur Detektion der aeroben heterotrophen Stoffwechselvorgänge übertragen werden.

Die Korrelationen zwischen dem BAS-Signal und der Sauerstoffzehrung sowie der Dehydrogenaseaktivität wurden unter 5.3.1.6 für die biologische Abwasserreinigung untersucht. Es zeigten sich nach der Dosierung von zusätzlichem Substrat für die Sauerstoffzehrung und das BAS-Signal zeitliche Übereinstimmungen zwischen den Signalen hinsichtlich der Zeitpunkte der Signalanstiege und des Erreichens der Ausgangsniveaus. Während allerdings die BAS-Signale während des Versuchsverlaufs und mit steigender Substratdosierung anstiegen, zeigte die Sauerstoffzehrung während der Versuche nach einem ersten Anstieg konstante Werte. Dieses Ergebnis steht damit im Widerspruch zu den quantitativen Korrelationen zwischen den Aktivitätsparametern unter 5.3.1.2 und zu der Untersuchung zur Hemmstoffwirkung unter 5.3.7. Da das BAS-Signal von der Konzentration an reduzierten Stoffwechselintermediaten im Medium abhängig ist, kann auch eine Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration erwartet werden. Eine Abnahme der Effektivität des Elektronentransports zu den Elektroden einer Biobrennstoffzelle durch eine Oxidation der reduzierten Stoffwechselintermediate und Mediatoren mittels Sauerstoff wurde von verschiedenen Autoren beschrieben (ZHANG und HALME 1994 sowie BENNETTO et al. 1983). Dieser Zusammenhang wurde unter 5.3.1.7 untersucht. Es zeigte sich, dass das BAS-Signal konstant war, solange sich Sauerstoff im Medium befand. Dabei wurde zwar ein Teil der auftretenden reduzierten Verbindungen reoxidiert, es gelangte aber eine konstante Konzentration an reduzierten Intermediaten an die Elektrode des BAS und diese wurden dort umgesetzt. Wenn dagegen die Sauerstoffkonzentration gegen null ging, kam es zu keiner Reoxidation mehr und das BAS-Signal stieg sofort stark an. Daneben stellen die Mikroorganismen den Stoffwechsel bei Abwesenheit von Sauerstoff auf die anaeroben Bedingungen um und unter diesen Bedingungen werden verstärkt elektroaktive Gärprodukte wie Wasserstoff und Ameisensäure in das Medium abgegeben, welche mit dem BAS umgesetzt werden können. Eine weitere Diskussion des Zusammenhangs zwischen dem BAS-Signal und der Sauerstoffzehrung findet sich unter 6.4. Der Vergleich zwischen dem BAS-Signal und der Aktivität der Dehydrogenasen hat gezeigt, dass zwischen den Aktivitätsparametern sowohl bei der diskontinuierlichen als auch kontinuierlichen Versuchsführung ein linearer Zusammenhang besteht. Während allerdings das BAS-Signal online und in-situ erfasst werden kann, benötigt die Bestimmung der Aktivität der Dehydrogenasen einen Zeitraum von ca. einer Stunde bis das Analyseergebnis vorliegt; aufgrund dieser Analysendauer ist die Bestimmung der Dehydrogenaseaktivität für einen Einsatz im Rahmen von Regelungs- und Steuerungskonzepten damit nicht geeignet.

Da die verschiedenen mikrobiellen Stoffwechselaktivitäten (aerober, heterotropher (5.3.1), aerober, autotropher (5.3.2) und anoxischer, heterotropher (5.3.3) Stoffwechsel) jeweils in separaten Untersuchungen detektiert werden konnten, wurden unter 5.3.5.1 die aeroben autotrophen und heterotrophen Prozesse nebeneinander untersucht und unter 5.3.5.2 wurde zusätzlich die Aktivität der Denitrifikanten bestimmt. Die Bestimmung der aeroben Stoffwechselaktivitäten zeigte, dass zu Versuchsbeginn die heterotrophen Prozesse das BAS-Signal im Wesentlichen beeinflusst haben, im weiteren Versuchsverlauf wurde das BAS-Signal von den autotrophen Organismen bestimmt. Dieses Ergebnis ist aufgrund der höheren Wachstumsrate sowie der größeren Affinität zum Sauerstoff und Substrat (Tabelle 3-3) der heterotrophen Mikroorganismen zu erwarten. Während des weiteren Versuches muss das BAS-Signal als Summe der Aktivitäten der beiden aeroben Prozesse angesehen werden. Die parallele Bestimmung der aeroben und anoxischen Stoffwechselaktivitäten konnte ebenfalls gezeigt werden. Bei diesen Versuchen kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass es zwischen den aeroben und anoxischen Stufen der Laborkläranlagen zu Verschleppungen der reduzierten Stoffwechselintermediaten kommen kann. Dies kann bei praktischen Anwendungen in den Abwasserreinigungsanlagen aufgrund der bedeutend größeren Klärbecken und der entsprechenden Transportwege zwischen den Stufen ausgeschlossen werden.

6.3.2 Detektion der Wirkung von Hemmstoffen auf Belebtschlammorganismen

Die Wirkung von Hemmstoffen auf die mikrobielle Aktivität der Belebtschlammorganismen wurde in verschiedenen Versuchen untersucht, unter 5.3.2 wurde der Effekt des Nitrifikationssinhibitors Allylthioharnstoff auf die Aktivität der Nitrifikanten gezeigt. Die Wirkung eines Hemmstoffes auf die Denitrifikanten ist unter 5.3.3.1 beschrieben und die Reaktion der Mikroorganismen auf die Dosierung des Stoffwechselgiftes Cyanid wurde unter 5.3.7 quantifiziert. Hier wurden verschiedene Konzentrationen des Hemmstoffes zu dem Belebtschlamm dosiert und es konnten Dosis-Wirkungsbeziehungen aufgezeigt werden. Diese Ergebnisse zeigen die Eignung des BAS für einen online Zulaufschutz und für offline Toxizitätsuntersuchungen. Die Anwendung im Sinne eines Zulaufschutzes entspricht dem Toximeter der BASF (5.5.2) sowie verschiedenen Geräten, welche unter 3.3 beschrieben worden sind. Ziel für die Betreiber von Abwasserreinigungsanlagen ist es dabei, potentiell negative Wirkungen auf die Prozess-Mikroorganismen kontinuierlich zu beurteilen und gezielte Gegenmaßnahmen einzuleiten. Durch die Verwendung des BAS wird es möglich, diese Einflüsse auf die mikrobielle Aktivität zeitnah, biospezifisch und zuverlässig zu detektieren. Die Anwendung im Rahmen von offline Toxizitätsuntersuchungen erlaubt den Einsatz des

Belebtschlamm aus der entsprechenden Abwasserreinigungsanlage und eine gute Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Anlage. Damit wäre eine der Anforderungen an einen Toxizitätstest, eine möglichst mit der Realität übereinstimmende Testpopulation zu verwenden, erfüllt (TEMMINK et al. 1992). Im Gegensatz dazu stehen Verfahren, bei denen Testorganismen wie Leuchtbakterien oder speziell angezüchtete Mikroorganismen zum Einsatz kommen.

Weitere Untersuchungen zur Hemmung der mikrobiellen Aktivität wurden mit dem 3-Elektrodensystem durchgeführt (5.4.2). Es konnten hier für Natriumfluorid, Quecksilber(II)-chlorid, Kaliumcyanid und Natriumazid jeweils Dosis-Wirkungsbeziehungen gezeigt und ein EC_{50} -Wert ermittelt werden. Die gemessenen Werte weichen zum Teil erheblich von Literaturwerten für Belebtschlamm ab: für das Cyanid wurde ein EC_{50} von $483 \pm 106 \text{ mg L}^{-1}$ bestimmt, dagegen wurde von Strotmann mittels Sauerstoffzehrungsmessung ein Wert von $0,6\text{--}2,3 \text{ mg L}^{-1}$ gemessen. Strotmann stellt dazu weiter fest, dass die inhibitorische Wirkung von einigen Substanzen nicht mit jedem Testsystem detektiert werden kann. So hemmt Kaliumcyanid spezifisch die Atmungskette, was sich in der Atmungsaktivität deutlich zeigt, während im Dehydrogenasetest bei Konzentrationen von 200 mg L^{-1} keinerlei Hemmung zu verzeichnen war (STROTMANN et al. 1992). Eine bessere Übereinstimmung ergab sich für das Quecksilber; hier wurde bei Strotmann ein Wert von $3,1\text{--}4,0 \text{ mg L}^{-1}$ angegeben und der gemessene Wert betrug $6,4 \pm 2,4 \text{ mg L}^{-1}$. Quecksilber(II)chlorid bindet leicht an Sulfhydrylgruppen vieler Enzyme und kann so gleichzeitig viele Zellfunktionen inhibieren. Diese Wirkung zeigt sich auch darin, dass dieser Stoff in vielen Testsystemen schon bei geringen Konzentrationen stark inhibierend wirkt (STROTMANN et al. 1992). Der EC_{50} für Natriumfluorid liegt laut dem Sicherheitsdatenblatt der Fa. A. Hedinger, Stuttgart bei 2930 mg L^{-1} Belebtschlamm, hier wurde mit dem 3-Elektrodensystem ein Wert von $4870 \pm 1400 \text{ mg L}^{-1}$ gemessen. Als Ursache für diese zum Teil differierenden Ergebnisse können die jeweils verwendete Belebtschlammbiozönose, der Zustand der Mikroorganismen bei der Dosierung, die verwendete Messmethode, die Einwirkzeit der Substanzen sowie physikalisch-chemische Medienparameter angesehen werden.

Unterschiede zwischen verschiedenen Methoden zur Bestimmung der Toxizität wurden auch von Miksch und Schürmann beschrieben. Die Autoren haben parallel Messungen mittels Substratabnahme, Dehydrogenaseaktivität und Atmungsaktivität durchgeführt. Hierbei wurden zum Teil stark abweichende EC_{50} -Werte gefunden, so wurden für Zinksulfat Werte von $35\text{--}900 \text{ mg Zn}^{2+} \text{ L}^{-1}$ gemessen (MIKSCH und SCHÜRMAN 1988).

Die Vorteile eines elektrochemischen Toxizitätstests liegen einerseits in einer sehr guten Automatisierbarkeit sowie der Möglichkeit einer Miniaturisierung, andererseits in der Unabhängigkeit vom Sauerstoff, so dass auch Aussagen über die hemmenden Wirkungen auf anaerobe und anoxische Prozesse möglich werden. Problematisch können dagegen bei der online Messung der mikrobiellen Aktivität die zum Teil relativ niedrigen Messsignale sein, so dass evtl. auftretende inhibierende Effekte nicht zu erkennen sind.

Die Wirkung von Natriumazid wurde neben dem Belebtschlamm auch auf Zellen von *Pseudomonas fluorescens* untersucht, der EC_{50} Wert betrug hier $390 \pm 45 \text{ mg L}^{-1}$ und lag damit bedeutend niedriger als der Wert bei Einsatz des Belebtschlammes von $23200 \pm 1970 \text{ mg L}^{-1}$. Da Pseudomonaden wesentliche Bestandteile des Belebtschlammes sind (MUDRACK und KUNST 1994), sind diese Unterschiede zwischen den Hemmstoffwerten auf die Schutzfunktion der EPS-Matrix der Belebtschlammflocke zurückzuführen. Die toxischen Substanzen werden an die EPS gebunden und können daher nicht in das Zellinnere vordringen.

Ebenfalls mit dem 3-Elektrodensystem wurde die spezifische Detektion der aeroben autotrophen und heterotrophen Stoffwechselforgänge untersucht (5.4.1). Da die Dosierung des Hemmstoffes Allylthioharnstoff keinen Einfluss auf die Signale zeigte, ist davon auszugehen, dass die gemessenen BAS-Signale von den heterotrophen Mikroorganismen hervorgerufen wurden. Während die Probe aus der Kläranlage Kriftel nebeneinander hetero- und autotrophe Mikroorganismen enthält, wurden die Belebtschlammproben aus den Abwasserreinigungsanlagen Frankfurt-Sindlingen und –Niederrad aus der zweiten Stufe entnommen. In dieser Stufe laufen im Wesentlichen die Nitrifikationsvorgänge ab und es sollten aufgrund von getrennten Schlammkreisläufen nur geringe Konzentrationen an heterotrophen Mikroorganismen vorhanden sein. Dass keine Aktivität der Nitrifikanten detektiert werden konnte, liegt einerseits an dem relativ langsamen Stoffwechsel der autotrophen Mikroorganismen und andererseits an ihrer großen Empfindlichkeit gegenüber Umwelteinflüssen sowie ihrer geringen Adaptionsfähigkeit, so dass beim Transport der Proben bereits ein Aktivitätsverlust aufgetreten sein kann und die vorhandenen Konzentrationen an heterotrophen Organismen ausreichte, um die BAS-Signale hervorzurufen. Weitere Probleme bei dieser Bestimmungsmethode können der Abbau der eingesetzten Mediatoren durch die Mikroorganismen, eine Einlagerung der Mediatoren in die EPS-Matrix sowie eine verminderte Diffusion der Mediatoren durch die EPS-Matrix zu den Mikroorganismen verursachen.

6.3.3 Abgrenzung des BAS-Signals von dem Redoxpotential

Eine Abgrenzung zwischen dem BAS-Signal und dem Redoxpotential erscheint notwendig, da beide Messmethoden vom Auftreten reduzierter und oxidiertes Verbindungen abhängig sind. Die Änderungen des Redoxpotentials sind in der biologischen Abwasserreinigung die Folge der Oxidation reduzierter Verbindungen, wie zum Beispiel Glucose und Ammonium, zu oxidierten Verbindungen wie Kohlendioxid und Nitrat. Daneben wird unter aeroben Reaktionsbedingungen das messbare Redoxpotential laut der NERNST-Gleichung (Formel 3-2) stark vom Gehalt an Sauerstoff bestimmt und weist damit unter entsprechenden Randbedingungen eine Korrelation zur Sauerstoffzehrung und damit zur mikrobiellen Aktivität auf. Die NERNST-Gleichung zeigt ebenfalls den Zusammenhang zwischen dem Redoxpotential und dem pH-Wert auf.

Die Interpretation des Redoxpotentials bereitet wegen der überaus komplexen biologischen Redoxsysteme Probleme. Bei der Messung des Redoxpotentials muss weiterhin beachtet werden, dass nur solche Systeme messbar sind, die mit der Redoxelektrode Elektronen austauschen können. Viele organische Stoffe können dies aufgrund verschiedener Überspannungseffekte nicht, so dass sie zum Messwert keinen Beitrag liefern. Von dem messtechnischen Aufbau her besteht zwischen den Systemen der wesentliche Unterschied, dass beim Redoxpotential ein sehr hoher Widerstand eingesetzt wird. Damit kann kein Umsatz an den Elektroden stattfinden und das Messsystem greift nicht in die Vorgänge in dem Medium ein; bei der Messung mit dem BAS wird dagegen der Widerstand so gewählt, dass ein Umsatz stattfinden kann und damit ein entsprechender Strom fließt.

Die experimentelle Abgrenzung der Signale wurde unter 5.3.8 beschrieben. Es zeigte sich, dass eine Änderung des Redoxpotentials nicht zwingend mit einer Änderung der mikrobiellen Aktivität zusammenhängt bzw. dass ein konstantes Redoxpotential keine Aussage über eine konstante mikrobielle Aktivität erlaubt. Weiter wurde durch die parallele Messung des BAS-Signals, des Redoxpotentials sowie der Sauerstoffzehrung gezeigt, dass das BAS-Signal nicht mit dem Redoxpotential zusammenhängt, sondern von der mikrobiellen Aktivität abhängig ist.

Der Bioaktivitätssensor und die Redoxelektrode messen zwar jeweils das Vorhandensein von reduzierten Verbindungen, trotzdem ist die Aussage hinter diesen Messwerten verschieden. Mit dem Redoxpotential wird das Verhältnis der reduzierten zu den oxidierten Stoffen in dem Medium bestimmt (siehe Formel 3-2). Bei bekannten Konzentrationen an oxidierten und reduzierten Substanzen zeigt eine Darstellung des Redoxpotentials als Funktion der Konzent-

ration an reduzierten Substanzen einen sigmoiden Verlauf. Über weite Bereiche hat die Änderung der Konzentration an reduzierten Verbindungen keine oder nur geringste Auswirkungen auf das Redoxpotential. Dagegen ist das Signal des Bioaktivitätssensors proportional der Konzentration an reduzierten Verbindungen in dem Medium, da der Stromfluss durch die Oxidation der reduzierten Verbindungen an der Anode verursacht wird.

Anhand der dargestellten Untersuchungen hat sich gezeigt, dass mit dem Bioaktivitätssensor ein Sensor zur Verfügung steht, der geeignet ist, die Aktivität der Mikroorganismen im Belebtschlamm der Kläranlage zu erfassen. Weiterhin hat sich aus den praktischen Erfahrungen im Laborbetrieb gezeigt, dass der verwendete Bioaktivitätssensor von der Konstruktion auf einen Langzeitbetrieb mit einem geringen Bedarf an Wartung und Verbrauchsmitteln ausgelegt ist. Durch die Nutzung der Sauerstoffdiffusionskathode werden keine endlichen Oxidationsmittel an der Kathode verbraucht, der Gehalt an Sauerstoff in der Umgebung kann als konstant angenommen werden. Dieser Aufbau des BAS ist gegenüber dem Einleiten von gasförmigem Sauerstoff als Oxidationsmittel vorteilhaft, da dadurch eine Trennung in einen Anoden- und Kathodenraum über eine Ionenaustauschermembran entfallen kann. Bei anderen Typen von Bioaktivitätssensoren/Biobrennstoffzellen wurde zum Beispiel Kaliumhexacyanoferrat als Oxidationsmittel eingesetzt. Durch die Reaktionen wird das Oxidationsmittel verbraucht und muss nachgeliefert werden, da sonst eine Verarmung an Oxidationsmittel zu einer Signaländerung führt. Die Kompartimentierung über eine Ionenaustauschermembran, wie zum Beispiel bei CHAUDHURI und LOVLEY (2003) beschrieben, würde hinsichtlich einer mechanischen Stabilität und eines Membranfoulings für die praktische Anwendung in der Abwassertechnik eine Einschränkung darstellen. Der Aufbau des BAS als Durchflusszelle ist darüber hinaus als geeigneteste Konstruktion für die online Bestimmung der mikrobiellen Aktivität anzusehen.

6.4 Einsatz des Bioaktivitätssensors auf Abwasserreinigungsanlagen

Der entwickelte Prototyp (siehe 4.3.8) wurde auf den kommunalen Kläranlagen Frankfurt-Niederrad, Frankfurt-Sindlingen, Kriftel, Kelkheim-Ruppertshain und Messel sowie bei der Überwachung der Betriebsabwässer der BASF AG in Ludwigshafen eingesetzt. Diese Erprobungen dienten einerseits zur Überprüfung der Verwendbarkeit des Bioaktivitätssensors unter nicht idealisierten Bedingungen auf den Abwasserreinigungsanlagen und andererseits zur Kontrolle der Praxistauglichkeit der Prototypen hinsichtlich Störanfälligkeit und Eignung für den Dauerbetrieb.

Im Rahmen der Untersuchungen wurde gezeigt, dass in allen Anlagen ein Aktivitätssignal mit dem BAS detektiert werden konnte. Lediglich die Ergebnisse, welche auf der ARA Kelkheim-Ruppertshain erzielt wurden, erlauben keine Aussagen über die mikrobielle Aktivität, da die gemessenen Werte unter der Nachweisgrenze lagen. Bei großen Abwasserreinigungsanlagen zeigten die BAS-Signale keinen Zusammenhang mit den täglichen Tagesganglinien, so war zum Beispiel das BAS-Signal bei dem Testlauf auf der ARA Frankfurt-Niederrad nahezu konstant. In den kleineren Anlagen wie der ARA Kriftel waren dagegen typische Tagesganglinien im BAS-Signal zu erkennen. Da sich die absoluten Höhen der BAS-Signale zwischen den Abwasserreinigungsanlagen stark unterschieden haben, wurden die Signale auf einen Zusammenhang mit der Schlammbelastung der entsprechenden Anlage untersucht (Tabelle 6-3)

Tabelle 6-3: Zusammenhang zwischen den mittleren BAS-Signalen und der Schlammbelastung

Abwasserreinigungsanlage	Mittelwert des BAS-Signals in mV	Schlammbelastung in kg BSB ₅ kg _{TS} ⁻¹ d ⁻¹
Frankfurt-Niederrad	0,97	0,11
Frankfurt-Sindlingen	0,81	0,07
Kriftel	0,031	0,031
Kelkheim-Ruppertshain	0,008 (*)	0,015

(*) Messsignal unter der Nachweisgrenze des Sensorsystems (nach 5.1.1)

Es zeigte sich anhand dieser Gegenüberstellung, dass die Höhe des BAS-Signals tendenziell von der entsprechenden Schlammbelastung abhängt. Je höher die Schlammbelastung war, umso höher war auch das BAS-Signal, allerdings besteht zwischen den Größen kein linearer Zusammenhang. Bei Anlagen, die lediglich sehr niedrige BAS-Signale aufweisen, erscheint die Detektion von inhibierenden Stoffen im online Betrieb nicht möglich, da hier eine Abnahme des BAS-Signals schwer zu erkennen ist. Hier bieten sich Lösungsansätze an, wie sie auch bei den unter 3.3 beschriebenen Verfahren eingesetzt werden, zum Beispiel der Vergleich von Peaks eines Referenzsubstrates vor und nach der Dosierung der evtl. toxischen Probelösungen.

Während der Praxiserprobungen wurden verschiedene Ereignisse, welche einen Einfluss auf die mikrobielle Aktivität hatten, mit dem BAS detektiert: ein Ausfall der Belüftung (Abbildung 5-50), ein andauerndes Regenereignis (Abbildung 5-51) und ein Regenereignis

mit einem starken Absinken der Temperatur (Abbildung 5-52). Durch den Ausfall der Belüftung kam es zu einem sofortigen Absinken der Aktivität der Nitrifikanten und damit auch zu einem Absinken des BAS-Signals. Ein starkes, andauerndes Regenereignis bewirkte eine starke Verdünnung des Abwassers und damit eine verringerte Substrat-Konzentration. Durch das fehlende Substrat sank die messbare Aktivität ab. Ein Regenereignis im Winter bewirkte eine Verdünnung der Substratkonzentration und ein Absinken der Abwassertemperatur. Die Nitrifikation ist ein temperaturempfindlicher Prozess: Sinkt die Temperatur für einen längeren Zeitraum unter 5-10 °C, wie im vorliegenden Fall, ist mit einem vollständigen Verlust der Aktivität der Nitrifikanten zu rechnen, entsprechend sank das BAS-Signal stark ab. Weitere Störungen sind während der Erprobungen in den Abwasserreinigungsanlagen nicht aufgetreten, dies bedeutet, dass mit dem BAS alle relevanten Störungen detektiert werden konnten.

Die Testläufe bei der BASF AG haben gezeigt, dass der Bioaktivitätssensor prinzipiell zur Bestimmung der mikrobiellen Aktivität auch in der industriellen Abwasserreinigung geeignet ist. Dies bedeutet, dass die im industriellen Abwasser vorkommenden Substanzen die elektrochemische Bestimmung der mikrobiellen Aktivität nicht stören und damit zum Beispiel Oxidations- und Reduktionsmittel nicht in Konzentrationen vorlagen, welche die unter 5.1.1 beschriebenen Effekte hervorrufen.

Die Vergleichbarkeit der BAS-Signale mit der Sauerstoffzehrung und der NADH-Fluoreszenz wurde durch parallele Messung der Aktivitätsparameter untersucht. Während des Testlaufs des BAS auf der Abwasserreinigungsanlage in Kelkheim-Ruppertshain wurde gezeigt, dass in dem untersuchten Zeitraum sowohl das BAS-Signal als auch die NADH-Fluoreszenz konstant waren. Da in dieser Anlage die BAS-Signale unter der Nachweisgrenze lagen, kann keine Aussage hinsichtlich einer Vergleichbarkeit zwischen den Signalen getroffen werden.

Der Vergleich zwischen der Sauerstoffzehrung und dem BAS-Signal wurde durch die Messungen bei der Abwasserüberwachung der BASF AG ermöglicht. Hier wurde gezeigt, dass im Allgemeinen zwischen den Signalen eine gute Übereinstimmung bestand. Es traten aber auch Fälle auf, in denen das BAS-Signal eine Änderung der mikrobiellen Aktivität anzeigte, die Sauerstoffzehrung allerdings konstant blieb. Ewald stellte dementsprechend fest, dass die Bestimmung der Sauerstoffzehrung als alleiniger Aktivitätsparameter des Klärschlammes nur bedingt geeignet sei. Die Anwendung der Sauerstoffzehrung wird demnach einerseits durch die verschiedenen sauerstoffverbrauchenden Vorgänge eingeschränkt, andererseits konnte in der Vergangenheit gezeigt werden, dass es durch Stoffe, die zu keiner Verminderung der Atmungsaktivität des Belebtschlammes führen, zu schweren Schädigungen einer Kläranlage kommen kann (EWALD et al. 1987). Auch von Strotmann wurde festgestellt, dass Schädi-

gungen des Belebtschlammes durch Stoffe hervorgerufen werden können, die die Atmungsaktivität nicht beeinflussen (STROTMANN et al. 1992). Von Haid wurde im Rahmen von Untersuchungen zur online Messung nitrifikationshemmender Stoffe im Zulauf der Industriekläranlage der BASF in Ludwigshafen ermittelt, dass es zum Teil auch bei einer 80 %igen Hemmung der Sauerstoffzehrung der Nitrifikanten keine signifikanten Auswirkungen auf die Ablaufqualität der verwendeten Modellkläranlagen gab (HAID 1999).

Von Strotmann wurde festgestellt, dass einige Chemikalien die Aktivitätsparameter Atmungs- und Dehydrogenaseaktivität unterschiedlich beeinflussen und dass daher in der Praxis möglichst mehrere Monitoring-Parameter verwendet werden sollten (STROTMANN et al. 1992). Hier kann zum Beispiel die Verbindung des BAS mit der Sauerstoffzehrung dazu beitragen, die Prozesse auf den Abwasserreinigungsanlagen zu optimieren. Beide online Messsysteme sollten parallel eingesetzt werden, damit könnten evtl. auftretende Störeinflüsse auf einen der Parameter im Sinne von Ersatzwertkonzepten vermieden werden.

Die bisherigen Untersuchungen erlauben einen quantitativen Vergleich zwischen der Sauerstoffzehrung und der Änderung des Stromflusses beim Abbau von Glucose. Die Sauerstoffzehrung beim Abbau von 1 g Glucose pro Liter innerhalb einer Stunde lässt sich mit Hilfe der Reaktionsgleichung 3-4 abschätzen; demnach werden 8,9 mg Sauerstoff pro Liter und Minute verbraucht. Für die Berechnung des Elektronenflusses an den Elektroden des BAS wird der unter 5.2.6.4 bestimmte Anteil an übertragbaren Elektronen verwendet, daraus resultiert ein Stromfluss von 0,83 μA oder eine Potentialdifferenz von 0,83 mV. Die Signaländerungen sind jeweils eindeutig nachzuweisen. Bei einer umgesetzten Substratkonzentration von 0,1 g Glucose pro Liter und Stunde ist die theoretische Sauerstoffzehrung weiterhin zu detektieren, dagegen ist ein Stromfluss von 0,08 μA nicht mehr eindeutig vom Signalrauschen zu trennen. Diese Berechnungen zeigen, dass die Sauerstoffzehrung eine höhere Empfindlichkeit zur Detektion der mikrobiellen Aktivität aufweist als die Messung mit dem Bioaktivitätssensor.

Der Einsatz des Bioaktivitätssensors in Abwasserreinigungsanlagen, welche nach dem Sequencing-Batch-Verfahren arbeiten, wurde durch den Testlauf auf der Kläranlage Messel untersucht. Hier konnte gezeigt werden, dass die Änderungen des BAS-Signals mit den entsprechenden Zykluszeiten und dem Substratangebot korrelieren. In den Untersuchungen unter 5.3 wurde gezeigt, dass mit dem Bioaktivitätssensor die aeroben und anoxischen heterotrophen sowie die aeroben, autotrophen Stoffwechselvorgänge detektiert werden können. Dies bedeutet, dass das Sensorsystem in der Lage ist, die in den SBR-Reaktoren ablaufenden Stoffwechselvorgänge zu erfassen. Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass mit Hilfe des BAS

eine dynamische Steuerung der Zykluszeiten möglich ist und damit der BAS zu einer Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute beitragen kann.

Die praktischen Erfahrungen beim Einsatz des Prototypen haben die Eignung für den Einsatz auf kommunalen und industriellen Abwasserreinigungsanlagen gezeigt. Hierbei sollten Erweiterungen des Sensorkonzeptes wie eine Durchflussmessung, eine Vorrichtung für eine Rückspülung sowie der Einsatz von beheizbaren Schlauchleitungen je nach Einsatzort durchgeführt werden. Von den Anforderungen an ein „ideales“ Messgerät für die Abwassertechnik (KÖHNE 1995) werden damit die folgenden Anforderungen im Wesentlichen erfüllt: Messung direkt im Abwasser, kontinuierliche Arbeitsweise, geringe Totzeit, verschleiß- und wartungsarm, verbrauchsmittelfreier Betrieb sowie eine automatisierte Erfassung und Verarbeitung der Sensor-Signale.

Zusammenfassend konnten die Funktionsfähigkeit des Prototypen durch die Praxiserprobungen und die Eignung des BAS für eine online Erfassung der mikrobiellen Aktivität auf kommunalen und industriellen Abwasserreinigungsanlagen gezeigt werden.

6.5 Nutzung des BAS-Signals

6.5.1 Steuerungs- und Regelungskonzepte auf Basis des BAS-Signals

Die Abwasserreinigungsprozesse werden hauptsächlich durch zeitveränderliche Zulauf- und Umweltbedingungen gestört; typische Störgrößen sind daher Temperaturänderungen, Schwankungen des pH-Wertes, toxische Einflüsse sowie Schwankungen des zufließenden Abwassers hinsichtlich Menge, Konzentration und Zusammensetzung durch Trockenwetter, Regenereignisse, saisonale Einflüsse, Industrieeinleiter (nach KÖHNE 1996). Die wesentlichen Stellgrößen beim Abwasserreinigungsprozess sind der Sauerstoffeintrag, das gezielte Zudosieren von Kohlenstoffquellen, die Bewirtschaftung stickstoffhaltiger Frachten, das Bewirtschaften des Kanalnetzes und der Speicherbecken sowie der Überschussschlammabzug und die Rücklaufschlammförderung. Diese Größen haben vielfältige Wechselwirkungen mit der mikrobiellen Aktivität, so dass dieser Parameter generell geeignet ist, um für Regelungen und Steuerungen der entsprechenden Prozesse eingesetzt zu werden.

Das BAS-Signal kann zur laufenden Überwachung der Kläranlagenfunktion und des Reinigungserfolges, zur Ermittlung von Planungsdaten für neue Reinigungsanlagen oder die Erweiterung bestehender Anlagen, zur Prozessautomatisierung und zur generellen Informationsgewinnung eingesetzt werden.

Die Überwachung der Kläranlagenfunktion kann dabei einerseits im Sinne eines reinen Monitorings durchgeführt werden, hierbei sind allerdings nur nachträgliche Aussagen über Störungen möglich. Andererseits kann die Überwachung der Kläranlagen mittels der Bioaktivitätssensorik auch im Sinne eines Zulaufschutzes durchgeführt werden. Diese Anwendung wurde unter 5.5.2 beschrieben und erfolgt analog zu dem dort beschriebenen Toximeter; die Diskussion einer solchen Anwendung findet sich unter 6.4.

Unter 5.6 wurde die praktische Anwendung der elektrochemischen Bioaktivitätssensorik zur Erhöhung der Raum-Zeit-Ausbeute und Bestimmung des Abbaupotentials gezeigt. Bei den Untersuchungen zur Steigerung der Abbaugeschwindigkeit wurde verdeutlicht, dass sich die relativen Abbaugeschwindigkeiten für das Abwasserkonzentrat durch Belebtschlamm und für die Lactose durch *E. coli* innerhalb des Untersuchungszeitraums verdoppelt haben. Für den Abbau des Ethylenglycols durch Belebtschlamm wurde innerhalb 8 h eine Verfünffachung der Raum-Zeit-Ausbeute erreicht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass es möglich ist, eine aktivitätsgesteuerte Optimierung des Abbaus durchzuführen. Praktische Anwendungen liegen zum Beispiel bei der Elimination von schwer-abbaubaren Substanzen in Batch-Reaktoren. Daneben ist auch die Dosierung von hemmenden Teilströmen über eine aktivitätsgesteuerte Regelung möglich, hierbei würde die Dosierung erfolgen, bis eine Abnahme der mikrobiellen Aktivität erfolgt.

Die Messung des Abbaupotentials im Betrieb einer Abwasserreinigungsanlage gibt Auskunft, ob die vorhandene Biomasse in der Lage ist, zusätzliches Substrat abzubauen. Wenn die Dosierung eines Referenzsubstrates eine Steigerung der Aktivität hervorruft, hat die Belebtschlammbiozönose das Potential zusätzliches Substrat abzubauen. Verursacht dagegen die Dosierung keine Änderung der BAS-Signale, muss davon ausgegangen werden, dass die Mikroorganismen entweder durch toxische Stoffe gehemmt sind oder das vorhandene Substrat mit ihrer maximalen Abbauleistung verwerten. Auf Basis dieser Ergebnisse könnte dann die diskontinuierliche Dosierung von zusätzlichen Abwasserteilströmen, zum Beispiel nach Regenereignissen oder zur Vergleichmäßigung der Tagesgangfrachten, aus den entsprechenden Speicherbecken erfolgen. Daneben kann die Kenntnis des Abbaupotentials auch eine Auskunft über den Zustand der Mikroorganismen in der Abwasserreinigungsanlage geben.

Das Messsignal des Bioaktivitätssensors kann weiterhin zur Überwachung und Regelung von Sequencing-Batch-Reaktoren eingesetzt werden, dieses wurde unter 5.5.1.5 vorgestellt. Die Regelung der Sauerstoffkonzentration im Belebungsbecken mit dem Signal des BAS kann analog zum SymBio-Verfahren (siehe 5.5.1.4) durchgeführt werden. Von Köhne und Schuhen wurden Verfahren zur Steuerung des Sauerstoffeintrags und zur Regelung des Überschuss-

schlammabzugs mittels einer Sauerstoffzehrungsmessung beschrieben (KÖHNE und SCHUHEN 1996), diese Verfahren lassen sich entsprechend auf die Bestimmung der mikrobiellen Aktivität mit dem Bioaktivitätssensor übertragen.

Eine weitere Einsatzmöglichkeit des BAS ist die Regelung der Dosierung von kohlenstoffhaltigen Substanzen in der Denitrifikation; diese Dosierung ist dann notwendig, wenn die Konzentration an Elektronendonatoren für eine wirkungsvolle Denitrifikation nicht ausreicht. Als Quellen der Elektronendonatoren können reine Kohlenstoffquellen wie Methanol eingesetzt werden; hier ist das Verhältnis von Methanol zu Nitrat bekannt und die Dosierung kann auch über den Nitratgehalt gesteuert werden oder es werden kohlenstoffhaltige Prozesswässer eingesetzt. Hier ist die Konzentration der verwertbaren Elektronendonatoren im Allgemeinen nicht bekannt und analytisch schwer zu bestimmen. Die Regelung über die mikrobielle Aktivität bietet den Vorteil, dass die Dosierung solange fortgesetzt werden kann, bis keine weitere Aktivitätssteigerung möglich ist. Die prinzipielle Eignung des BAS für die beschriebene Regelung wurde unter 5.3.3.2 gezeigt. Dadurch würde zum Beispiel für die nachgeschaltete Denitrifikation eine exakte Dosierung des zugeführten Frischabwassers oder der Einsatz preiswerter Kohlenstoffquellen möglich. Bei einer solchen Regelung wäre dann zum Beispiel die Dosage von Reststoffen aus Weinbaubetrieben, Brauereien oder ähnlichen Lebensmittelbetrieben möglich. Diese sind, wie frühere Untersuchungen zeigten, sehr gut für den Einsatz in der nachgeschalteten Denitrifikation geeignet (FRIEDRICH et al. 1995).

Die Nutzung des BAS zur Bestimmung des biologischen Sauerstoffbedarfs (BSB) erscheint auf Basis der Untersuchungen unter 5.3.1.3 und 5.3.1.4 ebenfalls möglich und würde, verglichen mit der Durchführung nach DIN 38409-H51, einen deutlichen Zeitvorteil bedeuten. In vergleichbaren Systemen auf Basis von Biobrennstoffzellen wurden Modellorganismen eingesetzt, zum Beispiel *Clostridium butyricum* (KARUBE et al. 1977), *E. coli* (PASCO et al. 2000), immobilisierte Hefen (TROSOK et al. 2001) und das metallreduzierende Bakterium *Shewanella putrefaciens* (KIM et al. 2003b). Hier sind die gemessenen Daten nur unter Vorbehalt auf die Belebtschlammbiozönose zu übertragen, da die Modellorganismen nicht zwingend einen vergleichbaren Abbau zu dem Belebtschlamm aufweisen.

Eine weitergehende Nutzungsmöglichkeit des BAS ist auch der Einsatz im Sinne einer Biobrennstoffzelle zur Energieerzeugung, eine entsprechende Anwendung wurde von Jang beschrieben (JANG et al. 2004). Dabei kann im Abwasserbereich das zufließende Abwasser als nahezu unendliches Substrat angesehen werden, wobei die Konzentrationen an abbaubaren Substanzen verglichen mit einem technischen Fermentationsmedium relativ gering sind. Daher bietet sich vorläufig ein Einsatz einer Biobrennstoffzelle zur Energieerzeugung im

Abwasserbereich besonders bei hochbelasteten Abwasserströmen, wie zum Beispiel in der Papier- oder Stärkeindustrie, an. Ein weiterer Vorteil einer entsprechenden Anwendung wäre die verringerte Biomassebildung durch die Aufnahme von Elektronen aus dem Stoffwechsel der Mikroorganismen und eine damit verbundene Verringerung der Überschussschlammproblematik (GIL et al. 2003).

6.5.2 Modellierung und Simulation der Modellkläranlage und der mikrobiellen Aktivitäten

In den Untersuchungen unter 5.7 wurde eine Modellkläranlage mit dem Programm SIMBA[®] modelliert; mittels einer Simulation der Anlaufphase eines Versuches konnten zwischen den gemessenen und simulierten Ablaufwerten relativ gute Übereinstimmungen festgestellt werden. Für die Anpassung der gemessenen und simulierten Werte wurden die Parameter max. spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der hetero- und autotrophen Biomasse sowie die Sättigungsbeiwerte der schnell abbaubaren Substanzen und des NH₄-N-Abbaus angepasst. Diese Anpassungen erscheinen vor dem Hintergrund, dass sich die vorgegebenen Werte auf kommunales, vorgeklärtes Abwasser schwankender Zusammensetzung beziehen, gerechtfertigt. Dagegen weist das eingesetzte synthetische Abwasser eine konstante Zusammensetzung auf, an die sich die Mikroorganismen optimal adaptieren können. Weiterhin läuft durch die gleichbleibende Zusammensetzung auch eine Selektion in dem Belebtschlamm auf Mikroorganismen ab, welche das Substrat schnell abbauen. Auch die durchgeführten Vereinfachungen, wie zum Beispiel die Umrechnung der Fraktion SS (biologisch schnell abbaubare, gelöste organische Stoffe) in den DOC, die Übernahme der vorgegebenen Parameter für die Fraktionierung und die Annahme einer konstanten Temperatur von 20 °C in dem Reaktor, stellen keine relevanten Einschränkungen des Modells dar. Damit konnten Untersuchungen hinsichtlich eines Zusammenhangs zwischen den gemessenen Signalen des Bioaktivitätssensors und den simulierten Werten für die Konzentration der aktiven hetero- und autotrophen Biomasse durchgeführt werden. Es wurde für verschiedene Durchflussraten gezeigt, dass sowohl die BAS-Werte als auch die simulierten Werte von den Zuflussfrachten abhängen und damit auch eine Korrelation zwischen den BAS-Werten und den simulierten Werten angegeben werden kann. Es ergaben sich allerdings stark voneinander abweichende Zeiträume, bis sich konstante Werte für die Aktivitätsparameter eingestellt hatten. Während die BAS-Signale nach ca. 72 h konstante Werte annahmen, stellten sich für die simulierten Werte erst nach bedeutend längeren Zeiträumen konstant bleibende Werte ein. Dies ist unter anderem von den gewählten verfahrenstechnischen Parametern abhängig, so wurde bei Berücksichtigung eines Schlammabtriebes in dem Nachklärbecken eine schnellere Fließgleichgewichtseinstellung erreicht. Die Fließgleichgewichtseinstellung wurde ebenfalls

durch verringerte Ausbeutekoeffizienten und erhöhte Hydrolyseraten beschleunigt. Für das Modell wurden die Parameter Ertrag der heterotrophen Biomasse, maximale spezifische Wachstumsgeschwindigkeit der heterotrophen Biomasse, Sättigungsbeiwert der schnell abbaubaren Substanzen und die spezifische Zerfallsgeschwindigkeit der heterotrophen Biomasse variiert und die Auswirkungen auf die Konzentration der aktiven heterotrophen Biomasse untersucht. Es wurde dargestellt, dass die Parameter μ_H und K_S nur geringste Auswirkungen auf X_{BH} haben, dagegen zeigten Änderungen dieser Parameter einen deutlichen Einfluss auf den Substratabbau. Die Parameter Y_H und b_H wiesen dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die simulierten Ablaufwerte der Laboranlage, aber einen starken Einfluss auf die Konzentration an aktiver Biomasse.

Weiterhin wurden in dem Modell die verfahrenstechnischen Parameter Sauerstoffkonzentration, Schlammabtrieb, Rücklaufschlamm, Schlammabzug, Zufluss und Reaktorvolumen variiert und die entsprechenden Änderungen von X_{BH} quantifiziert. Die qualitativen Aussagen aus diesen Simulationen stimmen mit den Ergebnissen von Uhlenhut überein, der in einer Sensitivitätsanalyse für die Simulation der Kläranlage Emden/Larrelt zeigte, dass der Überschussschlammabzug, die Rücklaufschlammmenge und der Abtriebsfaktor der Nachklärung den Summenparameter X_{BH} stark beeinflussen (UHLENHUT et al. 1999). Durch die Untersuchung des Einflusses der verfahrenstechnischen Parameter wurde auch dargestellt, dass selbst bei einem totalen Schlammabtrieb bzw. einem totalen Schlammabzug ein vollständiger, schneller Abbau des Kohlenstoffes stattfand und sich eine konstante Konzentration an aktiver, heterotropher Biomasse einstellte. Dies deutet darauf hin, dass die Wachstumsrate der heterotrophen Mikroorganismen höher ist als die Auswasch- und Hydrolyserate der Organismen. Weiterhin zeigte die Simulation, dass damit bei den gewählten Parametern für den heterotrophen Abbau keine Schlammrückführung nötig gewesen wäre, dagegen würden die autotrophen Mikroorganismen ohne eine Schlammrückführung aus dem Reaktor ausgewaschen werden und es fände keine wirkungsvolle Nitrifikation mehr statt.

Bei der Untersuchung von Substratpulsen in das Belebungsbecken einer Kläranlage konnten für den Signalanstieg Übereinstimmungen zwischen dem BAS-Signal und den Parametern X_{BH} bzw. X_{BA} gezeigt werden. Indessen sind deutliche Unterschiede beim zeitlichen Absinken der Signale zu erkennen. Wesentliche Ursache für diesen Effekt ist, dass in das Modell ASM 1 die Konzentration an aktiver Biomasse als Parameter eingeht, dagegen ist das BAS-Signal, wie unter 5.2.4 und 5.3.1.5 gezeigt, eine Funktion der Zellkonzentration und der Aktivität pro Zelle. In den Untersuchungen wurde weiterhin gezeigt, dass sich die spezifische Aktivität der Mikroorganismen um den Faktor zehn ändern kann, dies wird in dem Modellansatz ASM 1 nicht berücksichtigt.

Ein Einsatz des BAS zur Fraktionierung des CSB im Zulauf einer Kläranlage stellt gegenüber einer Sauerstoffzehrung (zum Beispiel bei VESTNER und GÜNTHERT 2001 beschrieben) keinen Vorteil dar, da eine Umrechnung von den BAS-Signalen in den Sauerstoffbedarf einen erheblichen Aufwand darstellen würde. Um Informationen über die aktive Biomasse für einen Einsatz der dynamischen Simulation zu erhalten, bietet sich dagegen neben den Atmungs- und Zehrungsmessgeräten auch der BAS an. Der Bioaktivitätssensor stellt ein Messsystem dar, mit dem es möglich ist, online und in-situ Informationen über diesen Parameter zu erhalten. Die online Messungen können allerdings nicht direkt für die Simulation eingesetzt werden, da die BAS-Signale, wie oben dargestellt, eine weitergehende Aussage haben als eine reine Angabe über die Konzentration an aktiver Biomasse. Aussagen über diese Konzentration ließen sich jedoch aus den Messungen zum Abbaupotential ableiten, da dort die Konzentration der aktiven Biomasse den ausschlaggebenden Parameter darstellt, oder auch durch offline Untersuchungen analog zu 5.2.4 zur Bestimmung der Abhängigkeit des BAS-Signalanstiegs nach einer Substratdosierung. Diese Werte sind dann geeignet, um die Konzentration an aktiver Biomasse zu bestimmen und als Parameter in der dynamischen Simulation eingesetzt werden zu können.

7 Abbildungs-, Tabellen- und Formelverzeichnis

7.1 Abbildungsverzeichnis

1-1: Schematische Darstellung der aeroben mikrobiellen Vorgänge beim Substratabbau	1
3-1: Prinzip der Entstehung des Stromflusses in einer Brennstoffzelle bzw. des Signals des Bioaktivitätssensors	6
3-2: Konzentrationsgradient der elektroaktiven Substanzen in der NERNST'schen Diffusionsgrenzschicht	9
3-3: Prinzip des 3-Elektrodensystems	11
3-4: Prinzip des Stromflusses in einer Biobrennstoffzelle in Gegenwart eines Mediators	12
3-5: Schema einer Kläranlage am Beispiel der Abwasserreinigungsanlage Kriftel	24
3-6: Schematische Darstellung der Denitrifikation mit Essigsäure als Elektronendonator	29
3-7: Stoffgruppen und Prozesse im ASM 1	37
4-1: Fotografie der Komponenten des BAS	54
4-2: Schematische Darstellung der Modellkläranlage	56
4-3: Schematische Darstellung und Fotografie der Modellkläranlage II mit vorgeschalteter Denitrifikation	58
4-4: Blockschaltbild und Fotografie des Prototypen	60
4-5: Aufbau und Programmoberfläche des Visual-Designer-Programms	62
5-1: Untersuchungen zur Charakterisierung des BAS	64
5-2: Wirkung von Ameisensäure, Succinat und Wasserstoffperoxid in einem zellfreien System auf das Signal des BAS	65
5-3: BAS-Signal als Funktion der Durchflussgeschwindigkeit	68
5-4: Reproduzierbarkeit der Versuche sowie Sterilkontrolle	71
5-5: Zeitlicher Verlauf des BAS-Signals, des Glucose-Abbaus und der Biomassekonzentration (Versuch A) sowie des BAS-Signals, der DOC-Konzentration und des Substratabbaus pro Zeiteinheit (Versuch B) während aerober Batch-Versuche mit <i>E. coli</i>	72
5-6: Zeitlicher Verlauf des BAS-Signals und des Proteingehaltes (A) sowie des BAS-Signals und der Dehydrogenaseaktivität (B) während aerober Batch-Versuche mit <i>E. coli</i>	74
5-7: Messung der mikrobiellen Aktivität mit dem BAS und dem potentiostatisch geregelten 3-Elektrodensystem	75
5-8: Vergleich zwischen einer aeroben und einer anaeroben Kultivierung von <i>E. coli</i>	76
5-9: Vergleich zwischen einer aeroben und einer anaeroben Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i>	77
5-10: BAS-Signal, OD und Glucose bei der aeroben Fermentation von <i>Pseudomonas fluorescens</i> (Versuch A) und bei der anoxischen Fermentation von <i>Pseudomonas sp.</i> (Versuch B)	79
5-11: BAS-Signal und Glucose bei der aeroben Fermentation von <i>Azotobacter vinelandii</i> (Versuch A) BAS-Signal und DOC bei der aeroben Fermentation von <i>Methylobacillus sp.</i> (Versuch B)	80
5-12: BAS-Signal, OD und Glucose bei der anaeroben Fermentation von <i>Lactobacillus pentosus</i>	81
5-13: A – BAS-Signale bei der Kultivierung von verschiedenen Mikroorganismen im M1-Medium, B – Peakflächen der Kultivierungen	83
5-14: BAS-Signal und Glucosekonzentration von aeroben <i>E. coli</i> -Kulturen im AM-Medium unter Variation der Animpfkonzentration	84
5-15: BAS-Signal nach einer Substratdosierung bei $t = 0$ min und Abhängigkeit des Anstiegs des BAS-Signals von der Zellmasse	85
5-16: BAS-Signal, Biotrockenmasse und spezifisches BAS-Signal	86
5-17: Wirkung von stoffwechselaktiven Substanzen auf aerob wachsende <i>E. coli</i> -Zellen	88

5-18: Wirkung von Hemmstoffen auf aerob wachsende Zellen von <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	92
5-19: Versuch zur Bestimmung der zeitlichen Dynamik der Signalentstehung	95
5-20: Nutzung von Huminstoffen als Mediatoren	97
5-21: BAS-Signal, Biotrockenmasse und Glucose als Funktion der Verdünnungsrate	98
5-22: A - Zugabe eines Glucosekonzentrates während einer kontinuierlichen Fermentation von <i>Escherichia coli</i> mit einer Durchflussrate von $0,2\text{h}^{-1}$, B - Bestimmung der mit dem BAS gemessenen elektrischen Ladungen nach der Dosierung von Glucose in einen Chemostaten bei verschiedenen Durchflussraten	99
5-23: Darstellung einer Startphase in der Laborkläranlage II	103
5-24: BAS-Signal und DOC bei Übergang von $\tau = 0,62\text{ d}$ nach $\tau = 0,2\text{ d}$ bei $t = 68,1\text{ h}$	104
5-25: Sauerstoffzehrung und Redoxpotential bei Übergang von $\tau = 0,62\text{ d}$ nach $\tau = 0,2\text{ d}$ bei $t = 68,1\text{ h}$	105
5-26: BAS-Signal, Sauerstoffzehrung, DOC und Redoxpotential als Funktion der Verweilzeit	106
5-27: A - Verlauf des BAS-Signals und der Konzentration an gelösten Kohlenstoffverbindungen nach der Stoßdosierung verschiedener Volumina eines Abwasserkonzentrates, B - Zusammenhang zwischen dem CSB des zudosierten Substrats und der Peakfläche	107
5-27: A - BAS-Signale nach Dosierung von $20\text{ g CSB}_{\text{theo.}}$ der Substrate, B - Zusammenhang zwischen dem CSB und den resultierenden Peakflächen	110
5-28: Signale nach der Dosierung von 2 mL Substrat in das Belebungsbecken in Abhängigkeit von der Biomassekonzentration	112
5-29: Peakfläche und Peakhalbwertsbreite nach der Dosierung von Substraten als Funktion der Biomassekonzentration im Belebungsbecken	113
5-30: Anfangsanstieg des BAS 10 min nach Substratdosierungen als Funktion der Biomasse	114
5-31: Vergleich zwischen dem BAS-Signal und der Sauerstoffzehrung nach Substratdosierung	115
5-32: A - Darstellung des BAS-Signals und der Dehydrogenaseaktivität nach der Substratdosierung bei $t = 68,8\text{ h}$, B - BAS-Signal als Funktion der Dehydrogenaseaktivität	116
5-33: BAS-Signal und Redoxpotential in Abhängigkeit von der Sauerstoffkonzentration	118
5-34: A - BAS-Signal und Konzentration an Ammonium- und Nitrit-Stickstoff nach der Dosierung von Ammonium, B - BAS-Signal und Nitrit-Stickstoff-Konzentration nach der von Nitrit	119
5-35: A - BAS-Signale nach der Dosierung von Ammonium-Stickstoff, B - Peakfläche der BAS-Signale als Funktion der NH_4N -Konzentration	121
5-36: Vergleich der BAS-Signale nach einer Ammonium-Dosierung mit und ohne ATH	122
5-37: BAS-Signal im anoxischen Denitrifikationsbecken	124
5-38: A - Dosierung von 3 g Natriumacetat bei $t = 185,4\text{ h}$ in das anoxische Denitrifikationsbecken, B - Peakfläche des BAS-Signals nach Dosierung von Natriumacetat	125
5-39: Dosierung von Substraten jeweils bei $t = 0\text{ h}$ in einen anaeroben Reaktor	127
5-40: BAS-Signal, DOC und Ammonium-Stickstoff im Ablauf einer nitrifizierenden Laborkläranlage	128
5-42: Elektrochemische Bestimmung der mikrobiellen Aktivität in der anoxischen und aeroben Stufe der Laborkläranlage sowie der Verlauf des Redoxpotentials, der Konzentration an DOC, Ammonium- und Nitratstickstoff	130
5-43: BAS-Signal, Sauerstoffzehrung und DOC nach einer Dosierung von KCN in das Belebungsbecken	134
5-44: Vergleich der Dosierung an verschiedenen Kaliumcyanidkonzentrationen	135

5-44: Abgrenzung von BAS-Signal und Redoxpotential während der Nitrifikation	136
5-45: Selektive Bestimmung der hetero- und autotrophen Aktivität	139
5-46: A - Wirkung von Kaliumcyanid auf die Aktivität von Belebtschlamm bei Untersuchungen im 3-Elektrodensystem, B – Bestimmung der quantitativen Hemmwirkung (Erläuterung im Text)	140
5-48: Quantitative Hemmwirkung von Cyanid, Fluorid, Quecksilber(II) und Azid auf Belebtschlamm	141
5-49: Signale des BAS im Ablauf der zweiten biologischen Stufe der ARA Frankfurt-Niederrad vom 23.07.01 bis 02.08.01	143
5-49: BAS-Signal sowie Ammonium-Konzentration im Zu- und Ablauf während eines Ausfalles der Belüftung in der zweiten biologischen Stufe der ARA Niederrad	145
5-50: BAS-Signal sowie Ammonium-Konzentration im Zu- und Ablauf während eines starken dauerhaften Regenfalls in der zweiten biologischen Stufe der ARA Niederrad	145
5-51: BAS-Signal, Temperatur sowie Ammonium-Konzentration im Zu- und Ablauf während eines Regenereignisses im Winter in der zweiten biologischen Stufe der ARA Niederrad	146
5-52: BAS-Signal und Ammonium-Konzentration im Zulauf der zweiten biologischen Stufe der ARA Sindlingen	147
5-53: BAS-Signal sowie Ammonium- und BSB-Konzentration im Zulauf der zweiten biologischen Stufe der ARA Sindlingen am 08.04.02 sowie 09.04.02	148
5-54: A - Signale des BAS in der anoxischen Stufe der ARA Kriftel, B - BAS-Signal und Ammoniumkonzentration am 20.09.03 und 21.09.03	150
5-55: A - Signale des BAS-Sensors auf der ARA Kelkheim-Ruppertshain in dem Zeitraum vom 25.11.03 bis zum 07.12.03, B – Vergleich der Signale des BAS und der NADH-Messsonde vom 30.11. und dem 01.12.03	152
5-56: A - BAS-Signal und Konzentration an Nitrat-Stickstoff in dem Zeitraum vom 13.12.03 00:00 bis zum 17.12.03 12:00 auf der ARA Messel, B – Ausschnitt aus dem Tagesgang vom 15.12.03 mit dem BAS-Signal, der Nitrat-Stickstoff- und Sauerstoff-Konzentration	154
5-57: A - Gesamtdarstellung der Ergebnisse des Prototypen im Toximeter 1 in dem Zeitraum vom 14.11.02 bis 25.04.03, B – Verlauf des BAS-Signals und der Sauerstoffzehrung vom 15.11.02 bis 27.11.02	157
5-58: BAS-Signal, Ammonium-Konzentration und Sauerstoffzehrungsgeschwindigkeit im Toximeter 4	158
5-59: A - Optimierung der Raum-Zeit-Ausbeute auf Basis der BAS-Signale am Beispiel eines Abwasserkonzentrats, B - Steigerung der Abbaugeschwindigkeiten beim Abbau des Abwasserkonzentrates und Ethylenglycols durch Belebtschlamm sowie der Lactose durch E. coli	160
5-60: Untersuchungen zum Abbaupotential der Mikroorganismen	162
5-61: Abbaupotential der Mikroorganismen als Anstieg des BAS nach einer Substratdosierung	163
5-62: Verfahrenfließbild der Laborkläranlage II im Simulationsprogramm	165
5-63: Vergleich zwischen gemessenen und simulierten Werten für DOC und NH ₄ N während des aeroben Abbaus in der Laborkläranlage II	168
5-64: A - Abhängigkeit der Aktivitätssignale von der Verweilzeit, B – Vergleich zwischen gemessenen BAS-Signalen und simulierten Konzentrationen an aktiver Biomasse	169
5-65: Variation der Parameter YH, μ H, KS und bH bei der Simulation der Laborkläranlage und Auswirkung auf den Parameter XBH	170
5-66: Auswirkungen von verfahrenstechnischen Parametern auf die aktive hetero- und autotrophe Biomasse in der Simulation der Laborkläranlage	171
5-68: Stoßdosierungen eines 200fachen Abwasserkonzentrates in das Belebungsbecken der Laborkläranlage	173
5-69: Stoßdosierungen von Ammonium in das Belebungsbecken der Laborkläranlage	173

9-1: Darstellung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve nach einer Kurvenanpassung mit der logistischen Gleichung	225
9-2: Zeichnung des zusammengebauten BAS	226
9-3: Zeichnung der Komponenten des BAS	227

7.2 Tabellenverzeichnis

3-1: Zusammenstellung von in Brennstoffzellen verwendeten Substrat- und Biokatalysator-Kombinationen	14
3-2: Stoffe und Stoffgruppen des ASM 1	38
3-3: Parameter des Belebtschlamm-Modells ASM 1 mit typischen Werten und der Schwankungsbreite für eine Abwassertemperatur von 20 °C	39
4-1: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers	47
4-2: Eingesetzte Küvetten-Tests zur Bestimmung der Stickstoffkonzentrationen	52
4-3: Betriebsdaten der Laborkläranlagen	59
5-1: Zusammenfassung der Wirkung von Chemikalien auf das Signal des BAS	66
5-2: In Batch-Versuchen eingesetzte Mikroorganismen mit unterschiedlichem Stoffwechsel	78
5-3: Versuche zur Bestimmung der Wirkung von Hemmstoffen auf die Stoffwechselaktivität von E. coli-Kulturen	90
5-4: Versuche zur Bestimmung der Wirkung von Hemmstoffen auf die Stoffwechselaktivität von Saccharomyces cerevisiae-Kulturen	93
5-5: Zusammensetzung des synthetischen Abwassers	101
5-6: Zeitpunkt und Volumen der Dosierung des Abwasserkonzentrates sowie CSB im Reaktor nach der Dosierung	108
5-7: Berechnung des theoretischen CSB für Glucose, Methanol, Ethylenglycol und iso-Propanol	109
5-8: Vergleich des Abbaus verschiedener Substrate	111
5-9: Verwendete Substrate, Kulturmedien sowie der theoretische Energiegewinn E_{theo} und die übertragbaren Elektronen $N_{\text{Elektronen, theo}}$ zum Vergleich des BAS-Signals mit den theoretischen Werten	132
5-10: Vergleich zwischen den Signalen des BAS und dem theoretischen Energiegewinn sowie den theoretisch übertragbaren Elektronen	133
5-11: Änderungen von Redoxpotential, BAS-Signal und Sauerstoffzehrung nach der Dosierung eines Hemmstoffes oder Substrates	137
5-12: Hemmwirkung von Cyanid, Fluorid, Quecksilber(II) und Azid auf Belebtschlamm	142
5-13: Testläufe auf der ARA Frankfurt-Niederrad	144
5-14: Testläufe auf der ARA Frankfurt-Sindlingen	148
5-15: Vorgegebene und geänderte kinetische Parameter des Belebtschlamm-Modells ASM 1 für die Simulation der Laborkläranlage	167
6-1: Quantitativer Vergleich der BAS-Signale bei der Kultivierung verschiedener Mikroorganismen	183
6-2: Vergleich des Abbaus verschiedener Substrate	192
6-3: Zusammenhang zwischen den mittleren BAS-Signalen und der Schlammbelastung	202
9-1: Freie Bildungsenergien	224
9-2: Mikrobiologisch wichtige Redoxpotentiale bei 25 °C und pH 7	224
9-3: Formeln für die Fraktionierung des Zulaufs	228
9-4: Anteilsfaktoren für die Fraktionierung des Abwasserzulaufs	229

7.3 Formelverzeichnis

3-1: Potentialdifferenz in einer Brennstoffzelle	7
3-2: NERNST-Gleichung	8
3-3: Massentransportgleichung	10
3-4: Raumbelastung	30
3-5: Schlammbelastung	30
3-6: Verweilzeit	30
3-7: Rücklaufverhältnis	31
3-8: Rezirkulationsverhältnis	31
3-9: Abbaugrad	31
3-10: Differentialgleichung zur Beschreibung der Änderungen der aktiven heterotrophen Biomasse im ASM 1	40
3-11: Differentialgleichung zur Beschreibung der Änderungen der aktiven autotrophen Biomasse im ASM 1	40
5-1: Geradengleichung des linearen Bereichs des BAS	64
5-2: Proportionalität zwischen dem BAS-Signal und dem Substratabbau	73
5-3: Proportionalität zwischen dem BAS-Signal und der Aktivität der Dehydrogenasen	75
5-4: Bestimmung der Ladungsmenge	82
5-5: Anstieg des BAS-Signals als Funktion der Zellmasse	85
5-6: Bestimmung der spezifischen Aktivität	86
5-7: Ladungsmenge des BAS als Funktion des Glucoseumsatzes	100
5-8: Bestimmung der theoretisch übertragbaren Elektronen	100
5-9: Anteil der übertragenen Elektronen	100
5-10: Berechnung des CSB	109
5-11: Vereinfachte Formel zur Berechnung des CSB	109
5-12: BAS-Signal und Dehydrogenaseaktivität als Funktion der Verweilzeit	117
5-13: Berechnung einer theoretischen Eliminationskurve	120
5-14: Bestimmung der Hemmwirkung auf Belebtschlamm	141
9-1: Berechnung der freiwerdenden Energie bei der Dentrifikation mit Acetat als Elektronendonator	223
9-2: Logistische Gleichung	225

8 Literaturverzeichnis

- AKIBA, T., BENNETTO, H.P., STIRLING, J.L., TANAKA, K. (1987) Electricity generation from alkalophilic organisms, *Biotechnol. Lett.*, **9**, 611 - 616
- ALLEN, M.J. (1972) Biofuel Cells, in: *Methods in Microbiology*, NORRIS, J.R., RIBBON, D.W. (Hrsg.) Academic Press, New York, 247 – 283
- ALMEIDA, J.S., JÚLIO, S.M., REIS, M.A.M., CARRONDA, M.J.T. (1995) Nitrite Inhibition of Denitrification by *Pseudomonas fluorescens*, *Biotechnol. Bioeng.*, **46**, 194 – 201
- ASTON, W.J., TURNER, A.P.F. (1984) Biosensors and biofuel cells, in: *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews 1*, RUSSELL, G.E. (Hrsg.) Intercept, Newcastle Upon Tyne, 89 – 120
- ATV (1991) Arbeitsblatt A 131 - Bemessung von einstufigen Belebungsanlagen ab 5000 Einwohnerwerten, St. Augustin, Gesellschaft zur Förderung der Abwassertechnik
- ATV (1997a) in: *ATV-Handbuch – Biologische und weitergehende Abwasserreinigung*, Ernst & Sohn, Berlin, 305
- ATV (1997b) 1. Arbeitsbericht der Arbeitsgruppe 2.11.4 "Simulation von Kläranlagen", *Korresp. Abwasser*, **11**, 2064 - 2074
- BAUMANN, U. (1994) Untersuchung der biologischen Abbaubarkeit organischer Stoffe mit einfachen Mitteln, *Chem. Unserer Zeit*, **5**, 253 – 258
- BAUMEISTER, F., KÖNIG, A., METZGER, J.W. (2002) Drei Testsysteme zur Bestimmung der Nitrifikationshemmung in Abwässern, *Korresp. Abwasser*, **49**, 1086 – 1095
- BENNETTO, H.P., BOX, J., DELANEY, G.M., MASON, J.M., ROLLER, S.D. (1987) Redox-mediated electrochemistry of whole microorganisms: from fuel cells to biosensors, in: *Biosensors*, TURNER, A.P.F., KARUBE, I., WILSON, G.S. (Hrsg.) Oxford University Press, Oxford, 291 – 314
- BENNETTO, H.P., STIRLING, J.L., TANAKA, K. (1985) Reduction of 'Redox' mediators by NADH and electron transduction in bioelectrochemical systems, *Chemistry and Industry*, 695 – 697
- BENNETTO, H.P., STIRLING, J.L., TANAKA, K., VEGA, C.A. (1983) Anodic reactions in microbial fuel cells, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 559 – 568
- BEVER, J., STEIN, A., TEICHMANN, H. (1993) *Weitergehende Abwasserreinigung*, R. Oldenbourg Verlag, München, 80
- BEYER, H. (1984) in: *Lehrbuch der Organischen Chemie*, überarbeitet von WALTER, W., Hirzel Verlag, Stuttgart, 224
- BÖHNKE, B. (1989) Bemessung der Stickstoffelimination in der Abwasserreinigung - Ergebnisse eines Erfahrungsaustausches der Hochschulen, *Korresp. Abwasser*, **9**, 1046 – 1061
- BOND, D.R., HOLMES, D.E., TENDER, L.M., LOVLEY, D.R. (2002) Electrode-reducing microorganisms that harvest energy from marine sediments, *Science*, **295**, 483 – 485
- BOND, D.R., LOVLEY, D.R. (2003) Electricity production by *Geobacter sulfurreducens* attached to electrodes, *Appl. Env. Microbiol.*, **69**, 1548 – 1555
- BORNEMANN, C., LONDONG, J., FREUND, M., NOWAK, O., OTTERPOHL, R., ROLFS, T. (1998) Hinweise zur dynamischen Simulation von Belebungsanlagen mit dem Belebtschlammmodell Nr. 1 der IAWQ, *Korresp. Abwasser*, **45**, 455-462
- CHANG, I.S., JANG, J.K., GIL, G.C., KIM, M., KIM, H.J., CHO, B.W., KIM, B.H. (2004) Continuous determination of biochemical oxygen demand using a microbial fuel cell type biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, in press

- CHASSAGNOLE, C., NOISOMMIT-RIZZI, N., SCHMID, J.W., MAUCH, K., REUSS, M. (2002) Dynamic modeling of the central carbon metabolism of *Escherichia coli*, *Biotechnol. Bioeng.*, **79**, 53 – 73
- CHAUDHURI, S. K., LOVLEY, D. R. (2003) Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells, *Nature Biotechnology*, **21**, 1229 – 1232
- CHIAO, M., LAM, K.B., LIM, L. (2003) A micromachined microbial fuel cell, 6th IEEE International MEMS Conference, Kyoto, Japan, 19. – 23. Januar
- CHOI, Y., JUNG, E., KIM, S., JUNG, S. (2003) Membrane fluidity sensing microbial fuel cell, *Bioelectrochemistry*, **59**, 121 – 127
- COHEN, B. (1931) The bacterial culture as an electrical half-cell, *J. Bacteriol.*, **21**, 18
- CURRAN, T.M., BUCKLEY, D.H., MARQUIS, R.E. (1994) Quasi-irreversible inhibition of enolase by fluoride, *FEMS Microbiol. Lett.*, **119**, 283 – 288
- CYPIONKA, H. (1999) *Grundlagen der Mikrobiologie*, Springer Verlag, Berlin, 138
- DAVIS, J.B., YARBOROUGH, H.F. (1962) Preliminary experiments on a microbial fuel cell, *Science*, **137**, 615
- DEV L3 (1993) Bestimmung der Toxizität von Abwässern und Abwasserinhaltsstoffen nach der Dehydrogenasenaktivität mittels 2,3,5-Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung, Hrsg. Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft Deutscher Chemiker, Beuth Verlag, Berlin
- DIN 38409-H51 (1987) Bestimmung des Biochemischen Sauerstoffbedarfs in n Tagen nach dem Verdünnungsprinzip (Verdünnungs-BSBn), in: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung, Beuth Verlag, Berlin
- DIN 38412-24 (1981) Bestimmung der biologischen Abbaubarkeit unter Anwendung spezieller Analysenverfahren, in: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung, Beuth Verlag, Berlin
- DIN 38412-26 (1994) Abbau- und Eliminationstest für Tenside zur Simulation kommunaler Kläranlagen, in: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung, Beuth Verlag, Berlin
- EN 1484 (1997) H 3: Anleitung zur Bestimmung des gesamten organisch gebundenen Kohlenstoffs (TOC) und des gelösten organischen Kohlenstoffs (DOC), in: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung, Beuth Verlag, Berlin
- EN ISO 8192 (1995) L39: Bestimmung der Hemmung des Sauerstoffverbrauchs von Belebtschlamm, in: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung, Beuth Verlag, Berlin
- EN ISO 9509 (1995) L 38: Verfahren zur Bestimmung der Nitrifikations-Hemmung von Mikroorganismen im Belebtschlamm durch Stoffe und Abwasser, in: Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser und Schlammuntersuchung, Beuth Verlag, Berlin
- EWALD, M., HERMANN, K., WEIDMANN, M. (1987) Kurzzeittest für die Bestimmung der Dehydrogenasenaktivität von Belebtschlämmen, *Vom Wasser*, **68**, 165 – 175
- FRIEDRICH, J., KLEIN-SCHNELL, H.-P., ROSSWANG, P., SCHMITT, R. (1995) Kosteneinsparung auf Abwasserreinigungsanlagen durch Einsatz externer Kohlenstoffquellen bei der Denitrifikation, *Korresp. Abwasser*, **2**, 248 - 256
- GIL, G.-C., CHANG, I.-S., KIM, B.H., KIM, M., JANG, J.-K., PARK, H.S., KIM, H.J. (2003) Operational parameters affecting the performance of a mediator-less microbial fuel cell, *Biosens. Bioelectron.*, **13**, 327 – 334
- GUWY, A.J., BUCKLAND, H., HAWKES, F.R., HAWKES, D.L. (1998) Active biomass in activated sludge: comparison of respirometry with catalase activity measured using an online monitor, *Water Res.*, **32**, 3705 – 3709

- HABERMANN, W., POMMER, E.-H. (1991) Biological fuel cells with sulphide storage capacity, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **35**, 128 – 133
- HABERMÜLLER, K., MOSBACH, M., SCHUHMANN, W. (2000) Electron-transfer mechanisms in amperometric biosensors, *Fresenius J. Anal. Chem.*, **366**, 560 – 568
- HAID, M. (1999) Online-Messung nitrifikationshemmender Stoffe im Zulauf einer Industriekläranlage – Entwicklung eines Nitrifikationstoximeters, 4. GVC Abwasser-Kongreß 6. - 8.9.1999, Bremen, Preprints Band 1, 163 – 168
- HARTMANN, L. (1983) *Biologische Abwasserreinigung*, Springer Verlag, Heidelberg
- HENZE, M., GRADY, C.P.L., GUJER, W., MARAIS, G.v.R, MATSUO, T. (1987) Activated Sludge Model No.1, IAWPRC Scientific and Technical Reports, No.1, IAWPRC, London
- HERNANDEZ, M.E., NEWMAN, D.K. (2001) Extracellular electron transfer, *Cell. Mol. Life Sci*, **58**, 1562 – 1571
- HERTEL, T. , LEIFHEIT, M. (1997) Bio-Aktivitäts-Sensorik (BAS) in: AHLERS, H. (Hrsg.) *Multisensorik*, Springer Verlag, Heidelberg, 125 – 150
- HIGGINS, I.J., HILL, H.A.O. (1979) Microbial generation and interconversion of energy sources, in BULL, A.T., ELLWOOD, D.C. and RATLEDGE, C. (Hrsg.), *Microbial technology: Current state, future prospects*, Cambridge University Press, Cambridge, 359 – 377
- HOLTMANN, D., SCHRADER, J., SELL, D., BORCHERT, A. (2001) Untersuchungen zum bioelektrochemischen Monitoring der Aktivität von Organismen im belebten Schlamm, *Korresp. Abwasser*, **48**, 1241 – 1246
- HOLTMANN, D., SELL, D. (2002) Detection of the microbial activity of aerobic heterotrophic, anoxic heterotrophic and aerobic autotrophic activated sludge organisms with an electrochemical sensor, *Biotechnol. Lett.* **24**, 1313 – 1318
- ISAACS, S., HENZE, M. (1994) Fluorescence monitoring of an alternating activated sludge process, *Water Sci. Technol.*, **4**, 229 – 238
- JANG, J.K., PHAM, T.H., CHANG, I.S., KANG, K.H., MOON, H., CHO, K.S., KIM, B.H. (2004) Construction and operation of a novel mediator- and membrane-less microbial fuel cell, *Process Biochem.* , in Press
- JUMAR, U., SEIBERT-ERLING, G. (1998) Regelung abwassertechnischer Anlagen, in: GMA-Kongress '98 Mess- und Automatisierungstechnik, VDI-Berichte **1397**, VDI Verlag, Düsseldorf, 567 – 588
- KADEN, J. (2003) Extrazelluläre Elektronenübertragung in einer syntrophen Kokultur aus *Geobacter sulfurreducens* und *Wolinella succinogenes*, Dissertation, Universität Konstanz
- KANNE, R. (1987) Die quantitative Bestimmung von ATP (Adenosintriphosphat) als Parameter für die physiologische Aktivität von Belebtschlamm, *Vom Wasser*, **68**, 277 – 281
- KAPPELER, J., GUJER, W. (1992) Estimation of Kinetic Parameters of Heterotrophic Biomass Under Aerobic Conditions and Characterization of Wastewater for Activated Sludge Modelling, *Water Sci. Technol.*, **25**, 125 – 139
- KARUBE, I., MATSUNAGA, T., MITSUDA, S., SUZUKI, S. (1977) Microbial electrode BOD sensors. *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1535–1547
- KARUBE I., SUZUKI, S., MATSUNAGA, T, KURIYAMA, S. (1981) Biochemical energy conversion by immobilized whole cells, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **369**, 91 – 99
- KATZ, E., SHIPWAY, A.N., WILLNER, I. (2003) Biochemical fuel cells, in: *Handbook of Fuel Cells - Fundamentals, Technology, Applications*, VILSTICH, W., GASTEIGER, H., LAMM, A. (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, **1**, 355 – 381
- KATZ, E., WILLNER, I. (2003) A biofuel cell with electrochemically switchable and tunable power output, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6803 – 6813

- KAYSER, A.N. (1999) Stoffflüsse in *Escherichia coli* TG1 unter aeroben, glucoselimitierten Bedingungen, Dissertation, TU Braunschweig
- KIM, B.H., CHANG, I.S., GIL, G.C., PARK, H.S., KIM, H.J. (2003b) Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell, *Biotechnol. Lett.* **24**, 541-45
- KIM, H.-H., MANO, N., ZHANG, Y., HELLER, A. (2003a) A miniature membrane-less biofuel cell operating under physiological conditions at 0.5 V, *J. Electrochem. Soc.*, **150**, A209 – A213
- KIM, H.J., PARK, H.S., HYUN, M.S., CHANG, I.S., KIM, M., KIM, A.H. (2002) A mediator-less microbial fuel cell using a metal reducing bacterium, *Shewanella putrefaciens*, *Enzyme Micro. Technol.*, **30**, 145 – 152
- KIM, N., CHOI, Y., JUNG, S., KIM, S. (2000) Development of microbial fuel cell using *Proteus vulgaris*, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **21**, 44 – 48
- KÖHNE, M. (1995) Grundzüge kontinuierlicher Messverfahren in der Abwassertechnik, in: Eigen- und Prozeßkontrolle in Kläranlagen, KUNZ, P.M. (Hrsg.), VCH-Verlag, Weinheim, 177-190
- KÖHNE, M. (1996) Regelungs- und Steuerungskonzepte zur Stickstoff- und Phosphorelimination auf der Basis von Online-Messungen, in: Angewandte Prozess-Messtechnik, NOWACK, G. (Hrsg.) Schriftenreihe der Fa. Dr. Lange, **14**, 1 – 21
- KÖHNE, M. (1998) Analyse und Regelung biologischer Abwasserreinigungsprozesse in Kläranlagen, at – Automatisierungstechnik, **46** (5), 215 – 234
- KÖHNE, M., SCHUHEN, M. (1996) Online Zehrungs- und Aktivitätsmessungen zur Überwachung und Regelung von Kläranlagen, *awt – abwassertechnik*, **5**, 52 – 55
- KREYSA, G., KRÄMER, P. (1989), Macrokinetics and mathematical modelling of quinone reduction by cyanobacteria, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **B44**, 205 – 217
- KREYSA, G., SELL, D., KRÄMER, P. (1990) Bioelectrochemical fuel cells, *Ber. Bunsenges. Phys. Chem.*, **94**, 1042 – 1045
- KRISTENSEN, G.H., JØRGENSEN, P.E., HENZE, M. (1992) Characterisation of functional microorganism groups and substrate in activated sludge and wastewater by AUR, NUR and OUR, *Water Sci. Technol.*, **25**, 43 – 57
- LEE, D., SONG, S.H., KIM, J.H., YOO, Y.J. (2002) Online monitoring of the denitrification process by measurement of NADH fluorescence, *Biotechnol. Lett.*, **24**, 949 – 952
- LEIFHEIT, M., MOHR, K.-H. (2000) Automatische Messung der Hemmwirkung toxischer Abwässer auf Prozess-Mikroorganismen, *Chem.-Ing.-Tech.*, **72**, 760 – 763
- LEWIS, K. (1966) Biochemical fuel cells, *Bacteriol. Rev.*, **30**, 101 -103
- LOVLEY, D.R., COATES, J.D., BLUNT-HARRIS, E.L., PHILLIPS, E.J.P., WOODWARD, J.C. (1996) Humic substances as electron acceptors for microbial respiration, *Nature*, **382**, 445 – 448
- MADIGAN, M.T., MARTINKO, J.M., PARKER, J. (2000) *Mikrobiologie*, begründet von BROCK, T.D., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, 1116
- MANO, N., MAO, F., HELLER, A. (2002) A miniature biofuel cell operating in a physiological buffer, *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12962 – 12963
- MANO, N., MAO, F., HELLER, A. (2003) Characteristics of a miniature compartment-less glucose-O₂ biofuel cell and its operation in a living plant, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6588 – 6594
- MARCUS, R.A. (1993) Elektronentransferreaktionen in der Chemie – Theorie und Experiment, *Angew. Chem.*, **105**, 1161 – 1280
- MATSUNAGA, T., KARUBE, I., SUZUKI, S. (1979) Electrode system for the determination of microbial populations, *Appl. Env. Microbiol.*, **37** (1), 117 – 121
- MATSUNAGA, T., KARUBE, I., SUZUKI, S. (1980) Electrochemical determination of cell populations, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **10**, 125 - 132

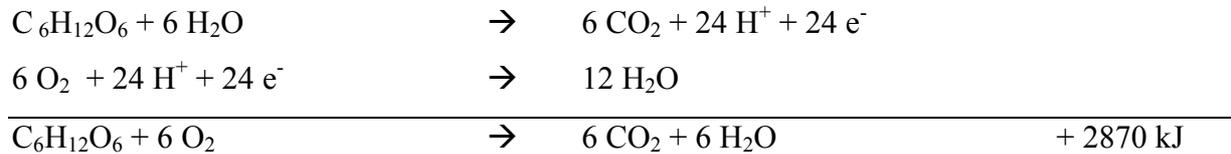
- MATSUNAGA, T., NAKAJIMA, T. (1985) Electrochemical classification of Gram-negative and Gram-positive bacteria, *Appl. Env. Microbiol.*, **20**, 238 – 242
- MIKSCH, K. (1985) Biochemische Bewertungsmethoden der Belebtschlammaktivität, *Gewässerschutz, Wasser, Abwasser*, **62**, 509 – 531
- MIKSCH, K., FINGERHUT, U. (1990) Bestimmung der Aktivität eines Belebtschlammes als Maß für die Eliminationsleistung von Kläranlagen, *Vom Wasser*, **74**, 261 - 269
- MIKSCH, K., SCHÜRMAN, B. (1988) Toxizitätsbestimmung von Zinksulfat, Kupfersulfat und Phenol anhand verschiedener Methoden, *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.*, **21**, 193 – 198
- MIYABYASHI, A., DANIELSSON, B., MATTIASON, B. (1987) Development of a flow-cell system with dual fuel cell electrodes for continuous monitoring of microbial populations, *Biotechnol. Tech.*, **1**, 219-224
- MOSER, D. (2000) Einfache Methoden zur Beurteilung von Analyseergebnissen, *KA-Betriebs-Info*, **30** (1); 911 – 912
- MUDRACK, K., KUNST, S. (1988) *Biologie der Abwasserreinigung*, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart
- NAUMER, H., HELLER, W. (1997) *Untersuchungsmethoden in der Chemie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 117
- NEITZEL, V. (1998) *Abwasser: Technik und Kontrolle*, Wiley-VCH Verlag, Weinheim
- NEWMAN, D.K., KOLTER, R. (2000) A role for excreted quinones in extracellular electron transfer, *Nature*, **405**, 94 – 97
- ONKEN, U., JOSTMANN, T. (1984) Influence of pressure of growth of *Pseudomonas fluorescens*, *Biotechnol. Lett.*, **6**, 413 – 418
- OSWALD, G., MATHER, M., SPÄTH, W., THOMANN, W., GILLES, E.D. (1998) Modellgestützte Prozeßüberwachung und automatisierte Prozeßführung einer industriellen biologischen Abwasserbehandlungsanlage, *at – Automatisierungstechnik*, **46** (5), 257 – 266
- PAGGA, U. (1985) Stoffprüfungen in einem Kläranlagenmodell - Abbaubarkeits- und Toxizitätstests im BASF-Toximeter, *Z. Wasser-Abwasser-Forsch.*, **18**, 222-232
- PARK, D. H., ZEIKUS, J.G. (2000) Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electrophore, *Appl. Env. Microbiol.*, 1292 - 1297
- PARK, D.H, KIM, B.H., MOORE, B., HILL, H.A.O., SONG, M.K., RHEE, H.W. (1997) Electrode reaction of *Desulfovibrio desulfuricans* modified with organic conductive compounds, *Biotechnol. Tech.*, **11** (3), 145 – 148
- PARK, D. H., ZEIKUS, J.G. (2003) Improved fuel cell and electrode designs for producing electricity from microbial degradation, *Biotechnol. Bioeng.*, **81**, 348 – 355
- PASCO, N., BARONIAN, K., JEFFRIES, C., HAY, J. (2000) Biochemical mediator demand – a novel rapid alternative for measuring biochemical oxygen demand, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**, 613 – 618
- PATCHETT, R.A., KELLY, A.F., KROLL, R.G. (1988) Use of a microbial fuel cell for the rapid enumeration of bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **28**, 26-31
- PERSSON, B., GORTON, L., JOHANSSON, G., TORSTENSSON, A. (1985) Biofuel anode based on D-glucose dehydrogenase, nicotinamide adenine dinucleotide and a modified electrode, *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 549 – 552
- PIRSING, A. (1996) in: *Reaktionstechnische Untersuchung und mathematische Modellierung der Nitrifikation in hochbelasteten Abwässern*, VDI-Verlag, Düsseldorf, 12 – 13
- POTTER, M.C. (1911) Electrochemical effects accompanying the decomposition of organic compounds, *Proc. Univ. Durham Philos. Soc.*, **4**, 260 – 266
- RABAEY, K., LISSENS, G., SICILIANO, S.D., VERSTRAETE, W. (2003) A microbial fuel cell capable of converting glucose to electricity at high rate and efficiency, *Biotechnol. Lett.*, **25**, 1531 – 1535

- RAWSON, D.M., WILLMER, A.J., TURNER, A.P.F. (1989) Whole-cell biosensors for environmental monitoring, *Biosensors*, **4**, 299 – 311
- RIEDEL, K., RENNEBERG, R., WOLLENBERGER, U., KAISER, G., SCHELLER, F.W. (1989) Microbial sensors: Fundamentals and application for process control, *J. Chem. Tech Biotechnol.*, **44**, 85 – 106
- SCHELLER, F.W., SCHUBERT, F., RENNEBERG, R., MÜLLER, H.-G., JAENCHEN, M., WEISE, H. (1985) Biosensors: Trends and commercialization, in: *Biosensors Vol. 1* (2), 135-160
- SCHLEE, D., KLEBER, H.-P. (1991) *Wörterbücher der Biologie – Biotechnologie*, Gustav Fischer Verlag, Jena
- SCHLEGEL, H.G. (1992) *Allgemeine Mikrobiologie*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- SCHMIDT, I., GRIES, T., WILLUWEIT, T. (1999) Nitrifikation – Grundlagen des Stoffwechsels und Probleme bei der Nutzung von Ammoniakoxidanten, *Acta hydrochim. hydrobiol.*, **27**, 121 – 135
- SCHRÖDER, U., NIESSEN, J., SCHOLZ, F. (2003) A generation of microbial fuel cells with current outputs boosted by more than one order of magnitude, *Angew. Chem.*, **115**, 2986 – 2989
- SEELIGER, S., CORD-RUWISCH, R., SCHINK, B. (1998) A periplasmic and extracellular c-type cytochrome of *Geobacter sulfurreducens* acts as a ferric iron reductase and as an electron carrier to other acceptors or to partner bacteria, *J. Bacteriol.*, **180**, 3686 – 3691
- SELL, D. (1991) *Untersuchungen zur Elektrochemie und Biochemie einer bioelektrochemischen Brennstoffzelle*, Dissertation, Universität Dortmund
- SELL, D. (2001) Bioelectrochemical Fuel Cells, in: *Biotechnology, Special Processes*, REHM, H.-J., REED, G., PÜHLER, A., STADLER, P. (Hrsg.), Wiley-VCH, Weinheim, **10**, 5-23
- STIRLING, J.L., BENNETTO, H.P., DELANEY, G.M., MASON, J.R., ROLLER, S.B., TANAKA, K., THURSTON, C.F. (1983) Microbial fuel cells, *Biochem. Soc. Trans.*, **11**, 451 – 453
- STROTMANN, U., ZAREMBA, S., BIAS, W.-R. (1992) Kurzzeit-Toxizitätstests zur Messung der Toxizität von Chemikalien gegenüber Belebtschlamm, *Acta hydrochim. hydrobiol.*, **20** (3), 136 – 142
- STRYER, L. (1990) *Biochemie*, Spektrum der Wissenschaften Verlagsgesellschaft, Heidelberg
- STURM, v. F. (1980) Implantable Electrodes, *Topics in Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, **3**, 191 - 242
- SÜSSMUTH, R., EBERSPÄCHER, J., HAAG, R.; SPRINGER, W. (1987) *Biochemisch-mikrobiologisches Praktikum*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 63
- SUZUKI S., KARUBE, I., MATSUNAGA, T., KURIYAMA, S., SUZUKI, N., SHIROGAMI, T., TAKAMURA, T. (1980) Biochemical energy conversion using immobilized whole cells of *Clostridium butyricum*, *Biochimie*, **62**, 353 -358
- TANAKA, K., VEGA, C.A., TAMAMUSHI, R. (1983) Thionine and ferric chelate compounds as coupled mediators in microbial fuel cells, *Bioelectrochem. Bioener.*, **11**, 289 – 297
- TANISHO, S., KAMIYA, N., WAKAO, N. (1989) Microbial fuel cell using *Enterobacter aerogenes*, *Bioelectrochem. Bioener.*, **21**, 25 – 32
- TEMMINK, H., SPANJERS, H., KLAPWIJK, A. (1992) Kontinuierlicher Respirationsanalysator bei Toxizitätstests für Belebtschlamm, *WaBoLu-Ber.*, **10**, 34 – 39

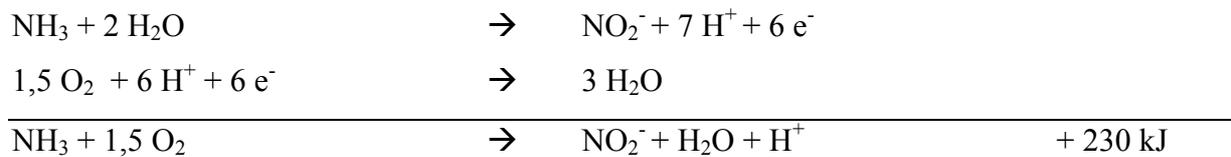
- TROSOK, S.P., DRISCOLL, B.T., LUONG, J.H. (2001) Mediated microbial biosensor using a novel yeast strain for wastewater BOD measurement, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**, 550 – 554
- TSUJIMURA, S., WADANO, A., KANO, K., IKEDA, T. (2001) Photosynthetic bioelectrochemical cell utilizing cyanobacteria and water-generating oxidase, *Enzyme Microb. Technol.*, **29**, 225 – 231
- UHLENHUT, F., SIEFERT, E., SCHLAAK, M., SCHULLER, D. (1999) Sensitivitätsanalyse der Parameter des Simulationsprogramms SIMBA[®] am Beispiel der Kläranlage Emden/Larrelt, *gwf – Wasser/Abwasser*, **140**, 704 – 711
- VESTNER, R.J., GÜNTHER, F.W. (2001) CSB-Fraktionierung als Grundlage zur Bemessung von kommunalen Kläranlagen, *gwf – Wasser/Abwasser*, **142**, 635 – 644
- VIDELA, H.A., ARVIA, A.J. (1971) Biological fuel cell using a strain of *Micrococcus cerificans* metabolising n-hexadecane, *Experientia*, **18 S**, 667 – 674
- VIDELA, H.A., ARVIA, A.J. (1975), The response of a bioelectrochemical cell with *Saccharomyces cerevisiae* metabolizing glucose under various fermentation conditions, *Biotechnol. Bioeng.*, **17**, 1529-1543
- WAGNER, M. (2000) Abbau von Stickstoffverbindungen in Kläranlagen – Neue Nitrifikanten in Kläranlagen entdeckt, *Biospektrum*, **6**, 186 – 188
- WALKER, G.M. (1998) *Yeast – Physiology and Biotechnology*, John Wiley & Sons, New York, 178
- WENTZEL, M.C., UBISI, M.F., EKAMA, G.A. (1998) Heterotrophic active biomass component in activated sludge mixed liquor, *Water Sci. Technol.*, **37**, 79 – 87
- WILKINSON, S. (2000a) “Gastrobots” – Benefits and challenges of microbial fuel cells in food powered robot applications, *Autonomous Robots*, **9**, 99 – 111
- WILKINSON, S. (2000b) “Gastronome” – A pioneering food powered mobile robot, *Proc. IASTED 2000 (8th) Int. Conf. on Robotics and Applications*, Paper 318-037 Honolulu, Hawaii, Aug. 14–16
- WILLNER, I., ARAD, G., KATZ, E. (1998) A biofuel cell based on pyrroloquinoline quinone and microperoxidase-11 monolayer-functionalized electrodes, *Bioelectrochem. Bioener.*, **44**, 209 – 214
- WOLFSON, S.K., WINGARD, L.B., LIU, C.C., YAO, S.J. (1977) Possible roles of enzymes in development of a fuel cell power source for the cardiac pacemaker, in: *Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*, T.M.S. Chang (Hrsg.), Plenum Press, New York, 377 – 399
- XU, S., HULTMAN, B. (1996) Experiences in wastewater characterization and model calibration for activated sludge process, *Water Sci. Technol.*, **33**, 89 – 98
- YAGISHITA T., HORIGOME T., TANAKA K. (1993), Effects of light, CO₂ and inhibitors on the current output of biofuel cells containing the photosynthetic organism *Synechococcus spec.*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **56**, 393-399
- YAGISHITA T., SAWAYAMA S., TSUKAHARA K., OGI T. (1996), Photosynthetic biofuel cells using immobilized cyanobacterium *Anabaena variabilis* M-3, *Progress in Biotechnology*, **11**, 563-569
- YUE, P.L., LOWTHER, K. (1986) Enzymatic oxidation of C1 compounds in a biochemical fuel cell, *Chem. Eng. J.*, **33**, B69 – B 77
- ZHANG, X.-C., HALME, A. (1994) A summary of the study of bioelectrochemical fuel cell by using *Saccharomyces cerevisiae*, in: *Research reports of Automation Technology Laboratory of Helsinki University of Technology*, HALME, A., SELKÄINAHO, J., ORAVA, J. (Hrsg.), **10**, 1 – 10
- ZHANG, X.-C., HALME, A. (1995) Modelling of a microbial fuel cell process, *Biotechnol. Lett.*, **17**, 809 – 814

9 Anhang

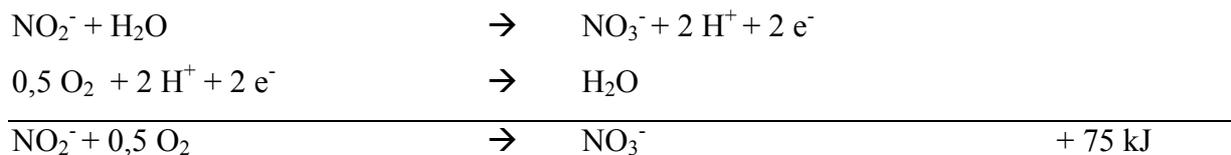
9.1 Reaktionsgleichungen, Bildungsenthalpien und Redoxpotentiale



Reaktionsgleichung 9-1: Oxidation von Glucose

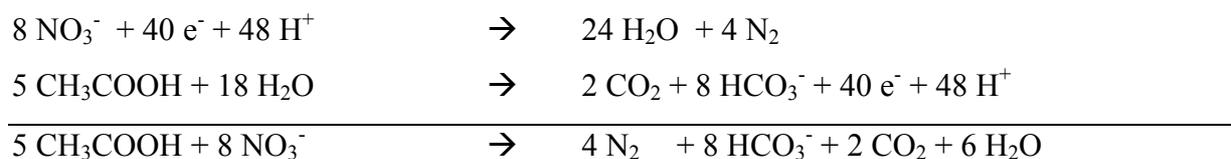


Reaktionsgleichung 9-2: Oxidation von Ammonium



Reaktionsgleichung 9-3: Oxidation von Nitrit

Für die Denitrifikationsreaktion wurde die freiwerdende Energie aus den freien Bildungsenergien (Tabelle 9-1) berechnet (MADIGAN et al. 2000).



Reaktionsgleichung 9-4: Denitrifikation (mit Acetat als Elektronendonator und Nitrat als Elektronenakzeptor)

$$\begin{aligned}
 & (8 \cdot (-586,85) + 2 \cdot (-394,4) + 6 \cdot (-237,17)) - (5 \cdot (-369,41) + 8 \cdot (-111,34)) = \\
 & -4169 \frac{\text{kJ}}{\text{Reaktion}} = -833,8 \frac{\text{kJ}}{\text{molAcetat}}
 \end{aligned}$$

Formel 9-1: Berechnung der freiwerdenden Energie bei der Denitrifikation mit Acetat als Elektronendonator

Tabelle 9-1: Freie Bildungsenergien (MADIGAN et al. 2000)

Verbindung	G_f^0 in kJ mol^{-1}
N_2	0
NO_3^-	- 111,34
CO_2	- 394,4
HCO_3^-	- 586,85
Acetat	- 369,41
H_2O	- 237,17
H^+	- 39,83 (bei pH 7)

Tabelle 9-2: Mikrobiologisch wichtige Redoxpotentiale bei 25 °C und pH 7 (MADIGAN et al. 2000)

Redoxpaar	E_0' in V
$\text{CO}_2/\text{Formiat}^-$	- 0,43
$2 \text{H}^+/\text{H}_2$	- 0,41
NAD^+/NADH	- 0,32
$\text{CO}_2/\text{Acetat}^-$	- 0,29
S^0/HS^-	- 0,27
FAD/FADH	- 0,22
$\text{Pyruvat}^-/\text{Lactat}^-$	- 0,19
Menachinon ox/red	- 0,075
$\text{Fumarat}^{2-}/\text{Succinat}^{2-}$	+ 0,033
Cytochrom b ox/red	+ 0,035
Ubichinon ox/red	+ 0,113
Cytochrom c_1 ox/red	+ 0,23
Cytochrom a_3 ox/red	+0,385

9.2 Hemmwirkung auf Mikroorganismen: Angleichung mittels logistischer Gleichung

Die Bestimmung der Dosis-Wirkungs-Kurven von Hemmstoffen auf die Aktivität des Belebtschlammes und Kulturen von *E. coli* erfolgte mittels der logistischen Gleichung des Programms ORIGIN (Fa. Microcal Software, Northampton, USA). Die Formel 9-2 zeigt die entsprechende Gleichung und die Abbildung 9-1 ein Beispiel für eine nichtlineare Kurvenanpassung mit der logistischen Gleichung.

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + (x/x_0)^p} + A_2$$

Formel 9-2: Logistische Gleichung

mit	p	=	Exponent
	A ₁	=	y-Wert bei y → - ∞
	A ₂	=	y-Wert bei y → + ∞
	x ₀	=	Mitte mit $y(x_0) = \frac{A_1 + A_2}{2}$

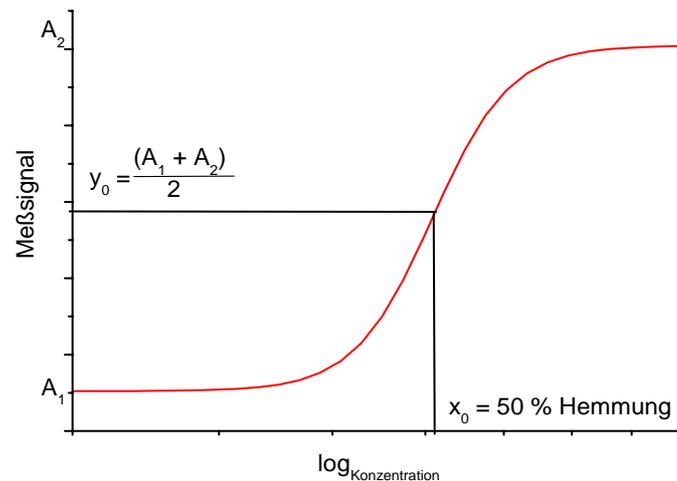


Abbildung 9-1: Darstellung einer sigmoidalen Dosis-Wirkungskurve nach einer Kurvenanpassung mit der logistischen Gleichung

9.3 Technische Zeichnungen und Fotografien des Bioaktivitätssensors

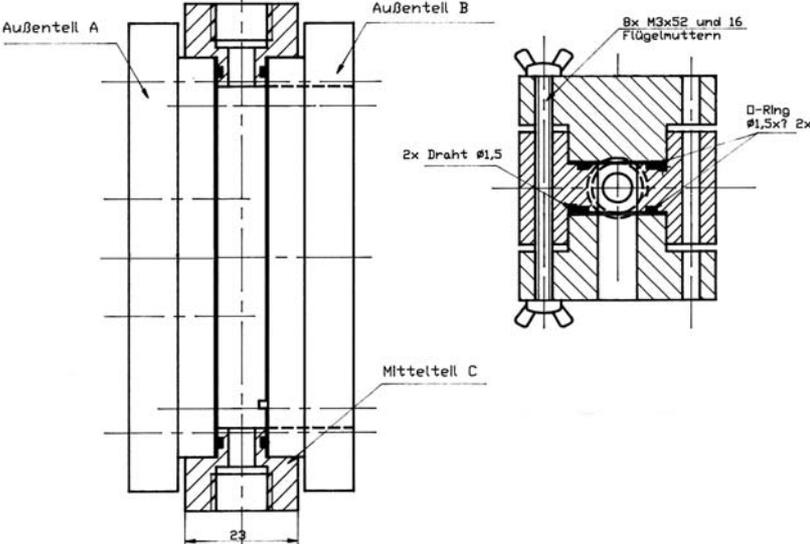


Abbildung 9-2: Zeichnung des zusammengebauten BAS

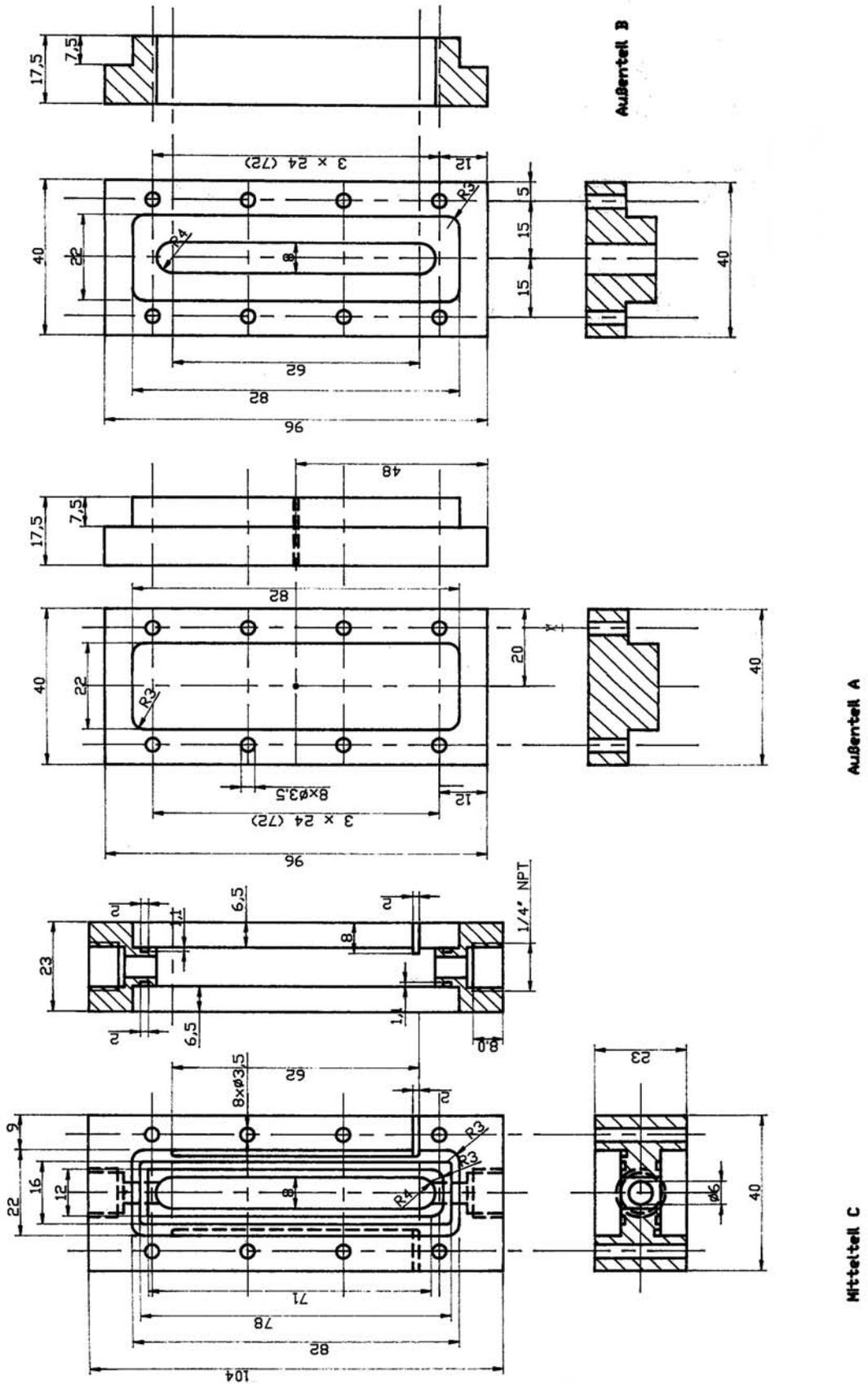


Abbildung 9-3: Zeichnung der Komponenten des BAS

Tabelle 9-4: Anteilsfaktoren für die Fraktionierung des Abwasserzulaufs

Name	Einheit	Wert
aSS	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{g}_{\text{CSB}}^{-1}$	0.2
aSI	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{g}_{\text{CSB}}^{-1}$	0.07
aXI	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{g}_{\text{CSB}}^{-1}$	0.1
aXB	$\text{g}_{\text{CSB}} \text{g}_{\text{CSB}}^{-1}$	0.15
iSS	$\text{g}_{\text{N}} \text{g}_{\text{CSB}}^{-1}$	0.01
iSI	$\text{g}_{\text{N}} \text{g}_{\text{CSB}}^{-1}$	0.02
iXI	$\text{g}_{\text{N}} \text{g}_{\text{CSB}}^{-1}$	0.03
iXS	$\text{g}_{\text{N}} \text{g}_{\text{CSB}}^{-1}$	0.03
iXB	$\text{g}_{\text{N}} \text{g}_{\text{CSB}}^{-1}$	$s_{\text{fp}}(\text{'asm1m'}, \text{'iXB'})$
salk	mol m^{-3}	8

