

# TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

## Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft

### Untersuchung des Einflusses von Oberflächeneigenschaften verschiedener Kunststoffe auf die Besiedlung durch und die Umsatzleistung von *PSEUDOMONAS PUTIDA* MT2

**Dipl. Biol. Univ. Dominik Montag**

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Bauingenieur- und Vermessungswesen  
der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzende: Univ. - Prof. Dr. rer. nat. habil. Brigitte Helmreich

Prüfer der Dissertation:

1. Univ. - Prof. Dr. rer. nat. habil. Harald Horn, Karlsruher Institut für Technologie
2. Univ. - Prof. Dr. rer. nat. habil. Rudi F. Vogel
3. Hon. - Prof. Dr. Ing. Klaus Liefeith, Technische Universität Ilmenau

Die Dissertation wurde am 14.02.2012 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Bauingenieur- und Vermessungswesen  
am 30.05.2012 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b> .....	<b>2</b>
<b>ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>4</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>5</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>7</b>
1.1 WASSER.....	7
1.2 ABWASSER UND UMWELT .....	8
1.3 BIOFILM.....	12
1.3.1 Allgemeines.....	12
1.3.2 Aufbau und Funktion .....	13
1.3.3 Vorkommen.....	14
1.3.4 Entstehung und Wachstum von Biofilmen .....	17
1.3.5 Methoden zur Biofilmuntersuchung .....	18
1.3.6 "Quorum Sensing" – interspezielle Kommunikation .....	19
1.3.7 Simulationen – mathematische Modelle.....	20
1.3.8 Biofilmreaktoren .....	20
1.4 BESIEDLUNGSEIGENSCHAFTEN UND OBERFLÄCHENEIGENSCHAFTEN .....	21
1.4.1 Besiedlung und Initialadhäsion .....	21
1.4.2 Physiko-chemische Oberflächeneigenschaften .....	22
1.5 EXKURS - DISSOZIATIONSKONSTANTE .....	24
1.6 POLYMERE - KÜNSTLICHE OBERFLÄCHEN .....	26
1.6.1 Allgemeines.....	26
1.6.2 Polymere in der Textiltechnologie .....	26
1.6.3 3D-Textilien.....	28
1.7 ARBEITSHYPOTHESEN UND FORSCHUNGSZIEL.....	30
<b>2 MATERIALIEN UND METHODEN</b> .....	<b>31</b>
2.1 BESCHICHTUNGEN.....	31
2.1.1 Glasreinigung.....	31
2.1.2 Nasschemische Beschichtungen .....	32
2.1.3 Tegophobe® - Beschichtung .....	33
2.1.4 Andere Beschichtungsverfahren .....	33
2.2 PHYSIKO-CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG .....	34
2.2.1 Physiko-chemische Beständigkeit.....	34
2.2.2 Kontaktwinkel / Oberflächenspannung.....	34
2.2.3 Zetapotential.....	35
2.2.4 Attenuated total reflectant Fourier transformed infrared spektroskopie.....	36
2.2.5 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) – Tiefenprofil .....	36
2.3 ZELLKULTUR UND AUFBEWAHRUNG .....	37
2.4 <i>PSEUDOMONAS PUTIDA</i> MT2 - METABOLISMUS .....	38
2.5 BILDGEBUNG.....	39
2.5.1 Phasenkontrastmikroskopie.....	39
2.5.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM) .....	39
2.5.3 Raster-Kraft-Mikroskop (AFM).....	41
2.5.4 Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM).....	41
2.6 FLIEßZELLAUFBAUTEN .....	42

2.7 CHARAKTERISIERUNG DER BAKTERIELLEN ADHÄSION .....	44
2.7.1 Organismen und Medium .....	45
2.8 BIOFILMWACHSTUM UND WACHSTUMSSIMULATION .....	47
2.9 HPLC .....	49
2.10 LABOR-SÄULEN-BIOREAKTOR .....	51
2.11 DEMONSTRATOR (AUFBAU) .....	52
2.11.1 Festbetteinbauten .....	53
2.12 DEMONSTRATOR (VERSUCHE) .....	54
<b>3 ERGEBNISSE UND DISKUSSIONEN .....</b>	<b>55</b>
3.1 BESCHICHTUNGEN UND BESTÄNDIGKEIT .....	55
3.2 PHYSIKO-CHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG .....	60
3.2.1 AFM - Messungen .....	60
3.2.2 REM - Aufnahmen .....	61
3.2.3 XPS - Tiefenprofil .....	62
3.2.4 Kontaktwinkel und Oberflächenspannung .....	62
3.2.5 Zetapotential .....	64
3.3 CHARAKTERISIERUNG DER BAKTERIELLEN ADHÄSION .....	65
3.4 KORRELATION DER BAKTERIELLEN ADHÄSION MIT DER PHYSIKO-CHEMIE DER OBERFLÄCHE .....	68
3.4.1 Korrelation der Parameter der Initialadhäsion mit der Oberflächenspannung .....	68
3.4.2 Korrelation der Parameter der Initialadhäsion mit dem Zetapotential .....	72
3.5 EXKURS: DISSOZIATIONSKONSTANTE VON <i>P.PUTIDA</i> AUF PA6 .....	74
3.5.1 Dynamisches Gleichgewicht .....	74
3.5.2 Adhäsionsgeschwindigkeit .....	76
3.6 WACHSTUMSVERSUCHE .....	76
3.6.1 Numerische Simulation .....	77
3.6.2 Porosität - Versorgung - Biofilmwachstum .....	78
3.7 SCHADSTOFFADSORPTION AN MATERIALOBERFLÄCHEN .....	80
3.8 LABOR-SÄULEN-BIOREAKTOR .....	81
3.9 DEMONSTRATOR .....	82
3.9.1 Abbauprobieren .....	82
3.9.2 Korrelation der Abbauleistung mit verschiedenen Systemparametern .....	85
<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>87</b>
ANHANG .....	89
<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>90</b>
<b>4 REFERENZEN .....</b>	<b>91</b>

## Abkürzungen

Neben den gebräuchlichen wurden folgende Abkürzungen in dieser Arbeit verwendet:

Abs	Absorbtion	Ole	Oleophobol <sup>®</sup> SLA new
AFM	Raster-Kraft-Mikroskop	OS	Oberflächenspannung
$\beta$	exponentielle Akkumulationsrate	PA6	Polyamid 6
B33	Borosilikat-Glas 3.3	PA6+TG	Tubiguard-Mod. auf PA6
B33+TP	TegoPhobe-Mod. auf B33	PET	Polyester
BA	Benzoessäure	PET+TG	Tubiguard-Mod. auf PET
BOH	Benzylalkohol	PP	Polypropylen
BHO	Benzaldehyd	q	Zelldichte auf der Oberfläche
BF	Biofilm	q <sub>max</sub>	Zelldichte im stationären Zustand
C	Kohlenstoff (-quelle)	QS	Quorum Sensing
CBL	concentration boundary layer	QSM	QS signal molecule
CLSM	Confocal-Laser-Scanning-Microscopy	QSP	QS appropriate protein
DIM	Diiodmethan	RMS	root mean square
DM	Durchmesser ( $\emptyset$ )	RT	Retentionszeit (HPLC)
FG	Feuchtgewicht	$\sigma$	Wandscherrate
$\gamma_s$	Grenzflächenspannung (Solid)	TG	Tubiguard <sup>®</sup>
$\gamma_L$	Grenzflächenspannung (Liquid)	TOL	Toluol
j	Adhäsionsgeschwindigkeit	TP	TEGO <sup>®</sup> Phobe
j <sub>0</sub>	initiale (maximale) Adhäsionsgeschwindigkeit	TrG	Trockengewicht
KW	Kontaktwinkel	WKW	Wasserkontaktwinkel
OD	Optische Dichte	WW	Wechselwirkungen
OF	Oberfläche	WZ	Wellenzahl (FTIR)
		$\zeta$	Zetapotential

## Abstract

*Eine deutsche Zusammenfassung ist auf Seite 87 verfügbar.*

Understanding why bacteria prefer several artificial materials compared to most natural materials, allows choosing a material or a coating, which is optimal for a special application. In fields with high hygienic requirements, for example, materials that inhibit microbial colonization could be used. To immobilize bacteria for industrial use (productive biofilm or waste water treatment), the natural mechanisms of adhesion can be used on optimized surfaces. In this way, one of the aims of this work is the generation of an optimized, fixed bed supported biofilm process to mineralize aromatic pollutions in a certain kind of wastewater.

The focus of this thesis is on the relation between material properties and microbial adhesion. The surface energy as a part of physico-chemical properties was calculated from the contact angle as value of wettability. The choice of materials was intended to provide a wide spectrum from low to high energetic surfaces. The lowest energetic surface (hydrophobic) was found in PET+TG ( $10.3 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ). On the high energetic, hydrophilic end of the scale a value of  $44.7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  was calculated.

To estimate the weight of electrostatic interaction forces zeta-potential was measured. Values between  $-28.3 \text{ mV}$  (modified glass; B33+TP) and  $-74.8 \text{ mV}$  (unmodified glass; B33) were detected. A vital microorganism *Pseudomonas putida* mt2 represents a zeta-potential of  $-20.8 \text{ mV}$ .

The process of microbial adhesion was fitted to a mathematical model (exponential rise to maximum). The functions parameters ( $q_{\text{max}}$ ,  $\beta$ ) are an indication for strength of affinity between bacterium and material surface. Both parameters are joined through the function of initial adhesions velocity ( $j_0 = q_{\text{max}} \cdot \beta$ ). The value for  $j_0$  ( $\sim 500 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) is almost constant. Because of that, the cell concentration per unit surface area in the steady state ( $q_{\text{max}}$ ) rises while the exponential accumulation factor ( $\beta$ ) decreases and vice versa. Measurement values for  $q_{\text{max}}$  are between  $6.6 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^{-2}$  (B33) and  $28.1 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^{-2}$  (polypropylene; PP). Values for  $\beta$  are calculated between  $0.06 \cdot \text{h}^{-1}$  (PP) and  $0.15 \cdot \text{h}^{-1}$  (B33).

By correlation of initial adhesion parameters with surface tension data, optimal conditions were found for immobilization of *P. putida* to be at a surface tension of  $24.7 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$ . Both, higher as well as lower surface tensions lead to a smaller amount of

adsorbed cells per surface area. This result indicates two limits on both sides of the parameter field. It is assumed that the limitation from the high energetic, hydrophilic side is caused by high ordered, near-surface network of water molecules, the "exclusion zone". Under low energetic, hydrophobic conditions bacterial adhesion seems to be limited by the so-called "depletion layer". The water molecules in the nearest neighborhood of the surface have to be in a higher energy state compared to molecules in the bulk. It is assumed that the exchange reaction into the "depletion layer" is unfavorable. In this way there is additionally to the hydrophilic border evidences for a hydrophobic limit that minimizes bacterial adhesion.

Correlation of  $q_{\max}$  with zeta potential results in a linear relationship. The closer the zeta potential is to zero, the higher the accumulated cell density. Due to the observed negative surface charge of *P. putida*, electrostatic repulsion can, together with apolar Lifshitz van der Waals interactions, be an important factor of influencing bacterial adhesion.

The next step following the adhesion is the growth of micro-colonies. It is shown that form and density of micro-colonies is strongly dependent on the initial cell density ( $q_{\max}$ ). Numerical simulations indicate a higher roughness with lower initial cell density. In the steady state between sloughing and growing, the biofilm's structural parameters are predominantly determined by other system parameters, like oxygen supply (support porosity).

In terms of degradation potential there is a small effect due to supply conditions on the volume-related degradation rate. The Biofilm's area-related degradation rate seems to correlate with the initial adhesions density ( $q_{\max}$ ). Presumably the cell density on the ground of the biofilm-matrix is more important than the biofilm's thickness.

This thesis' results show how the surface energy ( $\gamma_s$ ) influences the development and finally the degradation rate, in terms of a biofilm process. For the species under investigation, an optimal surface energy was found which resulted in maximum immobilization and efficient pollution degradation. Furthermore, the results give a new basis for antifouling research, using very low surface tension materials.

# 1 Einleitung

## 1.1 Wasser

Wasser und besonders sauberes Wasser ist eines der wichtigsten und kostbarsten Güter für alle Lebewesen und für unsere Zivilisation im Speziellen. Es ist für Menschen direkt und indirekt (in der Landwirtschaft) ein Lebensmittel und ist unentbehrlich für viele industrielle Produktionsprozesse.

Wasser ist, im antiken Sinne, ein einzigartiges Element. Dieses Molekül verfügt über besondere physikalische Eigenschaften, die durch seinen polaren Charakter und der damit verbundenen Möglichkeit der Wasserstoffbrückenbindung bestimmt werden. Methan als gleichschweres aber eher unpolares Molekül ist bei normalen Bedingungen (Temperatur und Druck) im Vergleich zu Wasser gasförmig. Die Kohäsionskräfte reichen hier nicht aus, um die Methanmoleküle in einem flüssigen Verband zu halten. Die Wasserstoffbrückenbindungen sind ebenfalls die Ursache für die Anomalie des Wassers. Diese Bindungsenergie bewirkt, dass flüssiges Wasser ein kleineres Volumen einnimmt als normales Eis. Diese starken Bindungen innerhalb des Wassers (Kohäsion) haben an der Grenzfläche zu Materialien große Bedeutung. Dort verursachen sie den Effekt der Grenzflächen- beziehungsweise Oberflächenspannung und der Ausrichtung der grenzflächennahen Moleküle innerhalb der Flüssigkeit. Dass diese strukturelle Ausrichtung an hydrophilen und hydrophoben Oberflächen stattfindet ist nicht mehr umstritten. Einige Wissenschaftler gehen jedoch weiter und implizieren Wasser Gedächtnis- und Informationsspeichereigenschaften. Wie lange Wasser und unter welchen Umständen es eine bestimmte Integrität aufrechterhält ist nicht geklärt. Die stark strukturierende Wirkung direkt an der Grenzfläche von Wasser zu unpolaren, polaren oder geladenen Materialien wurde jedoch in vielen Arbeiten gezeigt.

„Das Leben kommt aus dem Wasser.“ Für die heute diskutierten Theorien, über die Entstehung des Lebens in der „Ursuppe“, „RNA-Welten“ und die Bildung erster Kompartimente, ist Wasser die Umgebung beziehungsweise das Lösungsmittel. Für die Funktion von Enzyme, Ionenkanäle und anderen kanalformenden Proteinen sowie für fast alle biochemischen Prozesse sind direkte oder indirekte Interaktionen mit Wasser erforderlich.

„Wasser ist Leben.“ Die Wasserqualität ist stark verknüpft mit der Lebensqualität. Deutlich zeigten diesen Zusammenhang Seuchen wie zum Beispiel Cholera oder Ruhr im 19. Jahrhundert. Den natürlichen Reinigungsprozessen in Flüssen, Seen oder Meeren sind mit einer bestimmten Bevölkerungsdichte Grenzen gesetzt. Die Aufbereitung des gebrauchten Wassers musste also aktiv durch den Menschen erfolgen.

Das Wissen über die Natur des Wassers hilft etablierte Prozesse der Abwasserbehandlung zu verbessern und eröffnet neue Möglichkeiten der effizienten Reinigung. Der Mensch hat durch verschiedene Technologien die Möglichkeit und gegenüber nachfolgenden Generationen die Pflicht, die Süßwasserreservoirs der Erde zu erhalten und im Hinblick auf das Bevölkerungswachstum auszubauen.

### 1.2 Abwasser und Umwelt

Der Begriff Remediation bedeutet frei übersetzt „zurück in die Mitte“ und meint damit, dass Gleichgewichtsparameter, wie die Konzentrationen von Kohlenstoff (C), Stickstoff (N), Phosphat (P) und Spurenelementen eines natürlichen Systems wiederhergestellt werden. Das kontaminierte System ist in einer bestimmten Weise aus dem Gleichgewicht gerückt. Einige Komponenten können bei einer Anhäufung problematisch werden: C-Quelle→Ölteppich, Stickstoff→Eutrophierung, Spurenelemente→ Schwermetalle. Das Ziel einer nachhaltigen Abfallwirtschaft ist die Rückstellung des Gleichgewichts in seinen natürlichen Zustand. Das heißt beispielsweise Komponenten, die zu hoch konzentriert sind (Cd/Ni/NH<sub>3</sub>/Kohlenwasserstoffe) entfernen und mangelnde Komponenten (O<sub>2</sub>) ergänzen.

Die Geschichte der Abwasserreinigung beginnt schon sehr früh und ist meist verknüpft mit starkem Bevölkerungswachstum und erhöhter Bevölkerungsdichte. In der jüngeren Geschichte setzte sich bis heute das Belebtschlamm-Verfahren wegen seiner diversen Steuerungsmöglichkeiten durch (Henze *et al.*, 2008).

Eine Schwachstelle der Reinigung mit den herkömmlichen Verfahren zeigt (Levine *et al.*, 2006) auf. Unvollständig abgebaute Substanzen, wie ausgeschiedene Medikamente von Mensch und Tier (z.B. Antibiotika oder Hormone), Chemikalien aus Industrie und Haushalt werden teilweise in den Vorfluter (meist Fließgewässer) geleitet. Durch ihre geringe therapeutische Breite können sie nicht nur die Umwelt (Pflanzen und Tiere) belasten, sondern auch direkt oder indirekt Einfluss auf die Gesundheit des Menschen nehmen. Auf dem indirekten Weg sind die Organismen an der Spitze der



Nahrungskette, wie der Mensch, deutlich benachteiligt, da sich die Schadstoffe in dieser Richtung akkumulieren.

Besonders problematisch ist die Entsorgung von polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffen (PAK). Zahlreiche Verbindungen dieser Klasse sind nachweislich karzinogen, da sie bei der Metabolisierung im Körper zu Epoxiden oxidiert werden und diese Epoxide in einer nucleophilen Ringöffnungsreaktion mit den DNA-Basen reagieren können.

Je nach Bauart der Abwasserbehandlungsanlage, der Prozessführung und der Jahreszeit können PAK unterschiedlich gut abgebaut werden (Vogelsang *et al.*, 2006). Neben unpolaren Lösungsmitteln wie BTEX (Benzol, Toluol, Ethylbenzol und Xylol) (Diaz *et al.*, 2008; Saien & Nejati, 2007; Wang *et al.*, 2007) sind auch wässrig gelöste Stoffe, wie zum Beispiel Azofarbstoffe aus der Textilindustrie Problemstoffe (Puvaneswari *et al.*, 2006), die sich jedoch mit geeigneten Abwasserbehandlungsprozessen und spezialisierten Organismen effektiv entfernen lassen.

Im Zusammenhang mit dem heute oft diskutierten, anthropogenen Treibhauseffekt wird in den nächsten hundert Jahren das Wasser zu einem der wichtigsten Rohstoffe. Die ariden Flächen der Welt dehnen sich beträchtlich aus, sodass es auch innerhalb Europas zu einer Desertifikation kommt (z.B. in Spanien). Das Interesse liegt nicht nur bei der Verfügbarkeit von Wasser im Allgemeinen, sondern auch beim Vorhandensein von sauberem, von Menschen und der Landwirtschaft nutzbarem Wasser. Das Wachstum der Weltbevölkerung und die steigende Nachfrage nach industriellen Produkten erhöhen zusätzlich die Nachfrage nach einer knapper werdenden Ressource. Wie in allen Bereichen, in denen mit Ressourcenmangel umgegangen werden muss, ist auch die Wasserwirtschaft zu Einsparungen und Recycling gezwungen. Wasser, als Hilfsmittel für viele industrielle Prozesse, muss bei der Rückführung in die Umwelt die gleichen Parameter aufweisen, wie zur Zeit der Entnahme.

Die Abwasserbehandlung hat in Deutschland einen sehr hohen Stand erreicht. Jedoch gibt es immer noch Handlungsbedarf zur Verbesserung der Qualität von Abwässern. Dies gilt insbesondere auch für die Aufbereitung dezentral anfallender industrieller Abwässer, die durch Schadstoffe wie toxische Schwermetalle, halogenorganische Verbindungen (z.B. chlorierte Aromaten oder Aliphaten), gelöste Kohlenwasserstoffe (z.B. BTEX-Gruppe) und erhöhte Mengen an Stickstoff- und Phosphorverbindungen belastet sind. Vorrangig besteht das Ziel darin, durch Maßnahmen des

produktionsintegrierten Umweltschutzes schadstoffbelastete Abwässer nicht erst entstehen zu lassen und Ausgangsstoffe zurück zu gewinnen (z.B. org. Lösungsmittel). Durch das Recycling von Wasser soll Wasser mit angepasster Qualität im Bezug auf die nachfolgende Wiederverwendung bereitgestellt werden. Technologien zur nachgeschalteten Abwasserbehandlung sind besonders dort erforderlich, wo produktionsintegrierte Maßnahmen nicht zur Verfügung stehen um eine ausreichende Reduzierung der Schadstoffe zu gewährleisten. Heute sind schwer abbaubare Schadstoffe, die nur in Spuren vorliegen, ein größeres Problem, als hohe Konzentrationen leicht abbaubarer Stoffe (Vogelsang *et al.*, 2006; Welker, 2004).

Für den Abbau von spezifisch verunreinigten Abwässern, durch naturfremde (xenobiotische) aber auch übermäßige natürliche Nährstoffquellen (C, N, P) sind in Deutschland zur Zeit eine Vielzahl sehr guter und effizienter Verfahren im Einsatz. Diese lassen sich zum einen nach ihrem Wirkprinzip in chemische (Oxidation / Reduktion / Fällung), photochemische (UV-Behandlung), biologische (Metabolisierung / Akkumulation), physikalische (Adsorption) und thermische Verfahren unterteilen. Zum anderen ist eine Gliederung nach der Prozessführung (Sequenz-Batch-Reaktor, Chemostat, u. A.), die sich durch zeitliche oder räumliche Trennung der Verfahrensschritte unterscheiden, sinnvoll.

Als ökonomisches Verfahren hat sich die biologische Abwasserreinigung etabliert. Hier ist, neben der Energie für den Betrieb von Kompressoren zum Lufteintrag, nur wenig zusätzlicher Aufwand notwendig, der laufende Kosten verursacht. Die aktive Komponente produziert und regeneriert sich selbst.

In Abhängigkeit von der hydraulischen Verweilzeit des Schadstoffes, steht der biologischen Komponente oft weniger Zeit zur Verfügung, als für die komplette Oxidation des Schadstoffes erforderlich wäre. Um einen Schadstoff oder das Abwasser insgesamt für die Abbaumethode zu klassifizieren, wurden verschiedene Kenngrößen aufgestellt. Für leicht abbaubare Schadstoffe, die in der verfügbaren Zeit biologisch oxidiert werden können, wird die Kenngröße des BSB<sub>5</sub> (Biochemischer Sauerstoffbedarf für 5 Tage) verwendet. Der CSB (Chemischer Sauerstoffbedarf) ist der Sauerstoffbedarf den das Abwasser für eine komplette Mineralisierung benötigen würde. Der Schadstoffanteil, der schwerer abbaubar ist, wird durch den CSB indirekt beschrieben. Der Sauerstoffbedarf für diese Verbindungen ergibt sich aus dem CSB abzüglich des BSB<sub>5</sub>. Durch zusätzliche Verfahren, die der biologischen Behandlung meist vorgeschaltet

sind, soll diese Differenz auf die Seite des BSB<sub>5</sub> verschoben werden. Auch nachgeschaltete physikalische (z.B. Ozonisierung) oder chemische Methoden (z.B. Fällung) können bei der vollständigen Klärung des Abwassers helfen.

Die Effizienz kann erhöht werden, indem die Verweil- oder Kontaktzeit zwischen biologischer Komponente und dem Schadstoff optimiert werden. Dies kann durch eine *Erhöhung der aktiven Oberfläche* erreicht werden. Bei einer erhöhten Leistung ist jedoch auch ein erhöhter *Eintrag an Reduktionsequivalent*, meist in der Form von Sauerstoff erforderlich. Unter diesen beiden Gesichtspunkten kann die Struktur der biologischen Komponente durch die Struktur eines Trägers (Aufwuchskörper) oder durch geeignete Prozessführung zur Optimierung der Leistung beitragen.

Im Belebtschlammverfahren wird durch die Prozesssteuerung die Geometrie der Schlammflocke zu einem Kompromiss zwischen optimalen Versorgungseigenschaften und damit der Abbauleistung und optimalen Sedimentationseigenschaften in der Nachklärung geführt. In einem Festbettreaktor ist neben einem Verblockungspotential meist die Versorgung oder Entsorgung mit gasförmigen Komponenten problematisch. Diese gasförmigen Komponenten können in dieser Reaktorbauweise nur gelöst gehandhabt werden. Gelöste Komponenten verteilen sich durch Strömung und Diffusion. In der Biofilm-Matrix und in seiner unmittelbaren Umgebung ist der Stofftransport ausschließlich durch Diffusion möglich. Durch Verbrauch, Produktion und Diffusion entstehen im Biofilm Gradienten, die ein essentielles Merkmal des Biofilms darstellen.

Kompartiment	Limitierung	Vitalität
Freie Flüssigkeit	keine	toxisch
Boundary Layer	Diffusion	Hemmung
Biofilm	Diffusion und Verbrauch	vital
Substrat	impermeabel	

**Abb. 1** - Modell für Biofilme unter Bedingungen hoher/toxischer Substratkonzentrationen

*„Leben im Biofilm bedeutet Leben mit Gradienten“* - Michael Kühl

Der Biofilm kann durch diese besonderen Eigenschaften zum Beispiel den Abbau hoher Konzentrationen von Schadstoffen ermöglichen (). Generell ist er durch seine Eigenschaften eine, an schwierige Lebensbedingungen angepasste, spezialisierte Lebensform.

### 1.3 Biofilm

#### 1.3.1 Allgemeines

In der klassischen Mikrobiologie werden Bakterien in Suspension kultiviert und untersucht. Diese Lebensform ist in der Natur nur selten der Standard. Man kann vielmehr annehmen, dass die frei schwimmende, planktonische Form der Verbreitung, dem Wechsel von einer Oberfläche zu einer anderen, ähnlich der Verbreitung von Samenpflanzen, dient. Perfektioniert wurde das System in den evolutionär höheren phylogenetischen Gruppen der Bacteria, wie den Mycobionta.

Sind Lebensräume nährstoffreich und herrschen optimale Umgebungsparameter vor (Temperatur, Ionenstärke, pH-Wert, Wasseraktivität und die Verfügbarkeit von Reduktionsequivalent), muss sich die einzelne Spezies gegen eine Vielzahl von Konkurrenten durchsetzen. Dies erfolgt oft durch die Biosynthese von antibiotischen Substanzen (z.B. Streptomycin).

Die meisten natürlichen Umgebungen sind jedoch nährstoffarm und/oder lebensfeindlich. Hier sind Strategien wie Anpassung und Stresstoleranz erforderlich. Die bevorzugte mikrobielle Lebensform in diesen Bereichen ist eine Struktur, die als Biofilm bekannt ist.

Es ist nicht nur die strukturelle und chemische Architektur, die dem Organismus im Biofilm einen Selektionsvorteil bietet, sondern die Zusammensetzung des Konsortiums. Ein natürlicher Biofilm ist weniger wie ein Organ oder ein höher entwickelter Organismus, sondern mehr wie eine komplexe, hoch differenzierte, multikulturelle Gesellschaft, ähnlich einer Großstadt ([Watnick & Kolter, 2000](#)) zu interpretieren. Er stellt quasi einen Zusammenschluss von Zellen mit gleichen Bedürfnissen dar, die um sich zu schützen und erfolgreich zu sein ihre Ressourcen teilen und die Fähigkeiten einzelner Spezies gemeinsam nutzen.

So kann auch künstlich eine Lebensgemeinschaft für technische Anwendungen zusammengestellt werden ([Li \*et al.\*, 2008](#)). In diesem Beispiel übernimmt ein Partner die Biofilmkonstruktion (Expression von extrazellulären polymeren Substanzen -EPS) und damit den Schutz vor plötzlich veränderten Bedingungen (Schock). Der zweite Partner ist ein Abbauspezialist und stellt dem ersten Metabolite zu Verfügung, organisiert also die Versorgung.

### 1.3.2 Aufbau und Funktion

Der Biofilm besteht volumenmäßig zu einem Großteil aus hydratisierten extrazellulären polymeren Substanzen (EPS). Der Grad der Hydratisierung dieser Matrix beläuft sich auf ca. 97 % (Zhang *et al.*, 1998). Ein Hauptbestandteil der EPS sind Polysaccharide. Die Zusammensetzung dieser Matrix kann genauso komplex sein wie die artenmäßige Zusammensetzung des Biofilms (Branda *et al.*, 2005).

Die EPS werden nicht von allen Spezies in gleichem Maß sekretiert. Individuen der EPS<sup>+</sup> Arten<sup>1</sup> schieben sich damit im Verlauf der Generationen an höheren Positionen als EPS<sup>-</sup> Arten. Sie dringen damit in Bereiche besserer Sauerstoffversorgung ein, ähnlich den Pflanzen, die im Wald um Licht konkurrieren (Kraut- Strauch und Baumschicht (Xavier & Foster, 2007)). Diese Arten sind den Nährstoffen aber auch akuten Veränderungen der Umgebung (Antibiotika, pH-, Substrat-Schock) direkt ausgesetzt. Demgegenüber sind EPS<sup>-</sup> Arten durch die „fremden“ EPS am Substratgrund relativ geschützt.

Der Biofilm ist ein dreidimensionales Gebilde, das in das Strömungsfeld der ihn umgebenden Flüssigkeit eingewachsen ist. Seine Gestalt wird bestimmt durch Nähr- und Sauerstoffgradienten. Die Diffusion ist einer der wichtigsten Prozesse in dieser Umgebung (Stewart, 2003). Die Mikroorganismen wachsen an Positionen besserer Versorgung schneller und produzieren mehr Schleimstoffe. Diese Gestalt wiederum beeinflusst das Strömungsfeld (Taherzadeh *et al.*, 2010), wodurch eine Rückkopplung und Optimierung der Struktur und Bildung turbulenter Mikrobereiche erfolgt.

Diese Wachstumsform stellt einen evolutionären Vorteil für das mikrobielle Leben in nährstoffarmen Bereichen dar. Der Biofilm ist, in Abhängigkeit von seiner Dichte, eine mehr oder weniger starke Diffusionsbarriere, die je nach Strömungsgeschwindigkeit mehrere 100 µm oberhalb der Biofilm-Wassergrenzfläche beginnen kann (Glud *et al.*, 2007). Die "ungerührte Grenzschicht" zwischen Biofilm und Strömungskante wird als concentration boundary layer – CBL bezeichnet (de Beer *et al.*, 1994). Im Inneren der Biofilmmatrix wird ein maximaler Fluss von der Quelle zum Verbrauchsort induziert. Die Quelle kann für Nährstoffe und Sauerstoff an der Wassergrenzfläche oder für die Metabolite und Kohlendioxid im Inneren des Biofilms liegen. Durch die vergrößerte Oberfläche, die bereits oben beschriebenen Wirbel und die viskoelastischen Eigenschaf-

---

<sup>1</sup> EPS<sup>+</sup> Arten produzieren EPS beim Wachstum im Biofilm. EPS<sup>-</sup> Arten zeigen weniger oder keine Expression dieser Stoffe beim Wachstum im Biofilm.

ten hat diese Struktur die Möglichkeit eine Substanz (z.B. einen Schadstoff für den Menschen – einen Nährstoff für Mikroorganismen) erschöpfend aus der überströmenden Flüssigkeit zu extrahieren.

Die extrazellulären polymeren Substanzen des Biofilms dienen aber nicht nur als dreidimensionales Siedlungsgebiet, sondern gleichermaßen als Schutz vor unwirtlichen Bedingungen oder Schwankungen der Umgebungsparameter. Damit hilft dieses System Mikroorganismen ökologische Nischen zu erschließen, die für andere Organismen unzugänglich bleiben. So können Biofilme in Rohren mit sauren Grubenabwässern bei einem pH-Wert von 0,5 wachsen (Edwards *et al.*, 2000). Andere Bakterien besiedeln 74°C heiße Quellen (Ward *et al.*, 1998). Dem gegenüber leben Gemeinschaften von Mikroben auf -20°C kalten nährstoffarmen Gletschern der Antarktis (Paerl, 1998). Die EPS halten im pathogenen Biofilm Antikörper zurück indem sie sie binden (de Beer *et al.*, 1997). *Um einen Biofilm abzutöten, wird ungefähr 1500-mal mehr Antibiotika benötigt als für planktonische Mikroorganismen.* - William Costerton

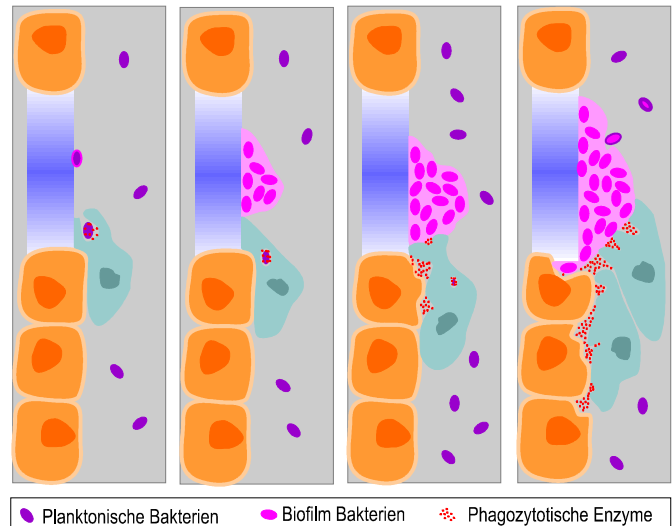
Aber auch Proteine wie Exoenzyme: Katalasen (Stewart *et al.*, 2000) und  $\beta$ -Lactamasen (Anderl *et al.*, 2000), Signalproteine (Nadell *et al.*, 2008; Xavier & Foster, 2007), Siderophore (Neilands, 1995) und DNA (Steinberger & Holden, 2005) sind Bestandteile des Biofilms. Weiterhin erhöhen verschiedene Eigenschaften, wie die verlangsamte Diffusion ins Innere des Biofilms, die Stresstoleranz einiger Spezies. Weitere Überlebensstrategien sind die Inaktivität des Stoffwechsels von Zellen schlecht versorgter Bereiche bis hin zu sogenannten „Persister“-Zellen (stoffwechsellinaktive Dauerstadien) am Grund des Biofilms (Chambless *et al.*, 2006).

### 1.3.3 Vorkommen

#### *Gesundheit und Medizin*

Der Biofilm hat immense Bedeutung bei der Pathogenese chronischer Krankheiten und Infektionen in Verbindung mit körperfremden Materialien (Implantate) (Costerton *et al.*, 1999; Fux *et al.*, 2005). Besondere Bedeutung kommt hier den oben erwähnten Exoenzymen zu, die den Biofilm vor oxidativem Stress durch die von den Makrophagen sezernierten Substanzen ( $H_2O_2$  und phagozytotischen Enzymen) schützen. Der generelle oxidative Schlag und die Verdauungsenzyme der Makrophagen können das Wirtsgewebe daher mehr schädigen als den Erreger (Abb. 2).

Ein prominenter Krankenhauskeim und Biofilmbildner aus der gleichen Gattung des in dieser Arbeit untersuchten Bakteriums ist *Pseudomonas aeruginosa*, der Erreger der Pneumonie und inneren Infektionskrankheiten nach Traumata oder Operationen. Seine EPS-Schicht besteht zum Großteil aus Alginate. Kombinations-therapien (Alginase/Leukozyten und Alginase/Antibiotika), die die EPS des Biofilms für Wirkstoffe oder das Immunsystem zugänglich machen wurden mit Erfolg getestet (Bayer *et al.*, 1992).



**Abb. 2** - Diagramm eines pathogenen Biofilms; Skizze (DM) nach (Costerton *et al.*, 1999)

Ein weiterer Schwerpunkt auf dem Gebiet des medizinisch relevanten Biofilms ist die dentale Plaque. In verschiedenen Arbeiten wird gezeigt, dass die Pathogenität oft ihre Ursache in einem Ungleichgewicht der ansässigen Normalflora hat. Dieser Zusammenhang ist auch für andere Biofilme an der Körpergrenzfläche gültig. Das Ungleichgewicht wird meist durch eine unnatürliche Verschiebung der Umgebungsparameter hervorgerufen (Dalwai *et al.*, 2006).

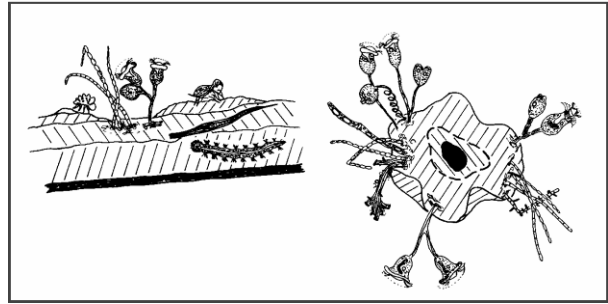
### Ökologie

Wie bereits erwähnt ist der Biofilm die grundsätzliche Form des mikrobiologischen Lebens und er ist ubiquitär vorhanden. Viele Pflanzen leben in Symbiose mit Biofilmen, zum Beispiel mit Pseudomonaden an der Calyptra (Wurzelhaarspitzen) (Münch *et al.*, 2007). Sie fungieren ähnlich der Normalflora unserer Epithelien, indem sie besser als potentielle Pathogene an den Mangel eines essentiellen Faktors (zum Beispiel Eisen) angepasst sind und diesen somit die Existenzgrundlage entziehen. Dieses Prinzip wird zunehmend für die menschliche Gesundheit genutzt und ist unter dem Schlagwort "probiotics" bekannt (van der Mei *et al.*, 2000).

### Industrie und Wirtschaft

Wirtschaftliche Bedeutung hat der Biofilm in zweierlei Hinsicht. Zum einen stellt er ein Problem für viele industrielle Prozesse, in Form von Materialschädigung (Biofouling, mikrobielle Korrosion), Reduktion von Volumenfluss durch Membranen und Leitungen,

Effektivitätsminderung bei Wärmetauschern und Kontamination von Produkten dar (Flemming & Schaule, 1994; Wong & Amy, 1998). Andererseits wird der Biofilm seit Jahrzehnten in der Abwasserreinigung benutzt (Lazarova & Manem, 1995). Damit hat er große ökologische Bedeutung im Zuge des Bevölkerungswachstums auf der Erde. Er wächst als "katalytische" Schicht in Rieselbettreaktoren auf dem Trägermaterial oder er besiedelt Submersreaktoren in Form von Schlammflocken, die einen sphärischen, frei schwimmenden Biofilm darstellen (Weber *et al.*, 2007) (Abb. 3). Diese Form bildet sich jedoch nur in Systemen aus, in denen sich Sauerstoff- und Nährstoffgradienten ausbilden können. Die Prozessführung, und dort speziell die räumliche oder zeitliche Festlegung aerober, anaerober und anoxischer Bereiche, spielt bei der effizienten Abwasserreinigung eine große Rolle. Auch für Luft (Zilli *et al.*, 2001) und Boden (Diels, 2004) können Biofilmprozesse Sanierungsarbeit leisten. Weitere technologische Anwendungen von Biofilmen in der Abwasserbehandlung sind unter Punkt 1.3.8 (Biofilmreaktoren) beschrieben.



**Abb. 3** - Biofilmformen (Quelle: Vorlesung "Limnologie des Abwassers und der belasteten Gewässer" TUM)

Bei der Fermentierung von Lebensmitteln und der Katalyse von chemischen Prozessen werden in der Regel keine Biofilm-Prozesse genutzt. Aufgrund seiner komplexen Vorgänge lässt sich das Verhalten des Biofilms nur schwer einschätzen. Eine Ausnahme bildet die Fermentierung von Essigsäure, bei der das Medium über Holzspäne geleitet wird auf dem Essigsäurebakterien siedeln. Für andere auch klassische biotechnologische Prozesse an Lebensmitteln oder zur Herstellung von komplexen Chemikalien wird meistens das Submersverfahren mit sterilem Fermenter und Reinkultur verwendet. Wie wenig sich ein natürlicher, spontan gebildeter, Biofilm kontrollieren lässt, zeigt die oben bereits angesprochene medizinische Problematik.

*Sonstige technische Biofilmanwendungen*

### *Sonstige technische Biofilmanwendungen*

Für die technische Nutzung wichtige Anwendungsgebiete des Biofilms (außer der Abwasserbehandlung) sind:

- Produktive Biofilme - Biofilm als katalytische Schicht in einem Reaktor
- Mikrobielles Erzlaugen - Nutzung biologischer Prozesse im Bergbau



- Mikrobielle Brennstoffzelle (MFC) (z.B. (Biffinger *et al.*, 2007))
- "microbial trap" – Biofilmfilter zur Immobilisierung von Pathogenen
- "microbial canaries" – Biofilmsensoren

Durch das Verständnis der Grundlagen seiner Überlebensstrategien, lässt sich der Biofilm in vielen für die menschliche Gesellschaft nützlichen Bereichen einsetzen.

### 1.3.4 Entstehung und Wachstum von Biofilmen

Die Theorie über die Struktur und Entwicklung des Biofilms wurde im Laufe der Jahre der Forschung fortschreitend modifiziert. Zu Beginn der Biofilmforschung in den 70er und 80er Jahren wurde angenommen, dass der Biofilm ein homogener Film (Abb.

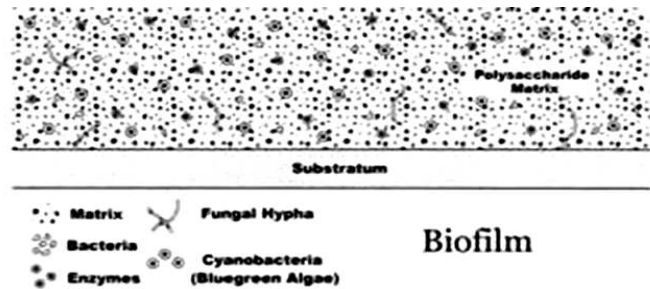


Abb. 4 - Homogener Biofilm (historisches Modell)

4) ist. In der Mitte der 90er Jahre wurde das "Mushroom"-Modell mit wassergefüllten Kanälen unter der Oberfläche des Biofilms von Costerton *et al.* (Costerton *et al.*, 1995) publiziert.

Der Lebenszyklus eines Biofilms kann in drei Phasen gegliedert werden (Abb. 5):

1. Anhaftung (Initialadhäsion; Oberflächeneigenschaften haben eine Schlüsselrolle)
2. Wachstum (Wachstumsrate  $\mu$  mit Limitierungen durch Substr.- oder  $O_2$ -Mangel)
3. Ablösung (Oberflächeneigenschaften und physikalische Biofilmeigenschaften)

Bei der Initialadhäsion erfolgt eine Interaktion zwischen den Oberflächenmolekülen des Substrats und denen des Bakteriums. Eine wichtige Rolle spielen hierbei wahrscheinlich Pili (syn. Fimbrien)

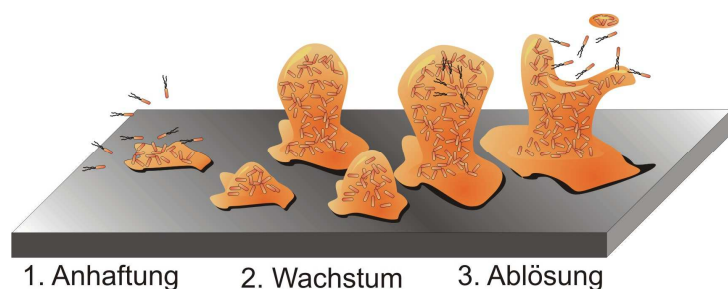


Abb. 5 - Lebenszyklus des Biofilms

(Mandlik *et al.*, 2008). Diese haarartigen Auswüchse aus Proteinen dienen nicht nur der Fortbewegung oder vermitteln die Interaktion zwischen verschiedene Spezies, sondern sind vermutlich auch wichtiger Bestandteil im Prozess der Initialadhäsion. Unter diesem Gesichtspunkt ist eine Oberfläche für verschiedene Spezies vermutlich unterschiedlich attraktiv.

Die Ablösung von der Materialoberfläche kann gezielt (Quorum Sensing, 1.3.6), ähnlich

den Vorgängen bei der Sporulation, erfolgen oder durch spontane Scherkräftspitzen an der Grenzfläche (z.B. an der Wasser-Luft-Phasengrenze). Somit ähnelt nicht nur die planktonische Form den Gameten der Mycobionta, sondern auch der restliche Lebenszyklus mit der Ausbildung von Hyphen und Fruchtkörpern.

### 1.3.5 Methoden zur Biofilmuntersuchung

#### Form und Struktur

Die verschiedenen Methoden der räumlichen Erfassung des Biofilms wurden in vielen Arbeiten diskutiert und bewertet. Eine Auswahl zeigt **Abb. 6**. Die Entwicklung der Biofilmforschung geht, wie bei anderen biologischen Fragestellungen, einher mit der Entwicklung von Mikroskopen. Der Biofilm wird nur noch selten und dann meist in medizinischen Arbeiten (*Adachi et al., 2007*), mit Kristallviolett gefärbt und mit einem Durchlichtmikroskop untersucht. Heute werden oft Vitalfarbstoffe oder rekombinante Fluoreszenzproteine verwendet, um die Zielbereiche (ROI – region of interest) in Biofilmen zu markieren (*Hu et al., 2005; Nancharaiah et al., 2003; Neu et al., 2001*).

Um die Vitalität eines Biofilmsystems zu quantifizieren hat sich das BaLight live/dead viability kit (Molecular Probes) etabliert (*Sharma et al., 2008*). Die dreidimensionale mikroskopische Erfassung des Biofilms mit dem CLSM stellt eine der wichtigsten Analysemethoden dar.

Neben der Gestalt des Biofilms kann die Gesamtheit des Systems durch Bestimmung der Biomasse (*Watson & Hobbie, 1979*) und Biofilmdichte (*Hoehn & Ray, 1973*) charakterisiert werden.

Mikroskopieart	CLSM	TPLSM	OCT	STXM	TEM, REM	Ultraschall	NMR	AFM
<b>Referenz</b>								
( <i>Neu et al., 2001</i> )	X							
( <i>Lawrence et al., 2003</i> )	X			X	X			
( <i>Nancharaiah et al., 2003</i> )	X							
( <i>Beyenal et al., 2004</i> )	X							
( <i>Hu et al., 2005</i> )		X						
( <i>Steinberger &amp; Holden, 2005</i> )		X						
( <i>Haisch &amp; Niessner, 2007</i> )			X					
( <i>Ivnitsky et al., 2007</i> )	X							X
( <i>Jones et al., 2007; Wang et al., 2007</i> )	X							
( <i>Parry et al., 2007; Wang et al., 2007</i> )						X		
( <i>Balestrino et al., 2008</i> )	X				X			
( <i>Wagner et al., 2010a</i> )							X	
( <i>Wagner et al., 2010b</i> )			X					

**Abb. 6** - Beispiele für mikroskopische Arbeiten an Biofilmen

### *Chemie des Biofilms*

Die äußerliche Gestalt, die Topographie und Dicke des Biofilms, gibt nur einen Teil seiner Zustandsparameter wieder. Im Laufe der Zeit wurden verschiedene Ansätze entwickelt um die Artenzusammensetzung zu detektieren (DGGE (Muyzer & Smalla, 1998), FAME (Haack *et al.*, 1994)). Darüber hinaus können Anteile an chemischen Stoffgruppen (Fette, Eiweiße, Kohlenhydrate, Nukleinsäuren, ...) und Schlüssel-moleküle für den Energiestoffwechsel (ATP, cAMP, NADP, FAD, ...) Auskünfte über die Aktivität zum Zeitpunkt der Präparation geben. Michael Kühl *et al.* (Kühl *et al.*, 2007) entwickelten eine Methode mit einem beschichteten Träger, der die normale CLSM-Untersuchung gleichzeitig mit einer Sauerstoff-Bildgebung kombiniert. Eine Reihe klassischer Methoden zur chemische Zusammensetzung und Aktivität des Biofilms wurde von (Lazarova & Manem, 1995) zusammengefasst und bewertet.

### **1.3.6 "Quorum Sensing" – interspezielle Kommunikation**

Als "Quorum Sensing" bezeichnet man den Prozess mit dem Bakterien ihre eigene Zelldichte überwachen (Williams, 2000). Das System besteht aus zwei Komponenten. Einem kleinen Signalmolekül (QSM), das sich in der Umgebung frei verteilt und einem Rezeptor im Zellinneren (QSP), der das Signal spezifisch bindet. Der daraus entstehende Komplex bindet direkt eine Sequenz auf dem bakteriellen Chromosom und fördert die Transkription der QS-Gene. Durch die Konzentration des Signals wird die Bindungswahrscheinlichkeit beeinflusst, sodass ab einer bestimmten Bakteriendichte bzw. QSM-Dichte der Signalweg ausgelöst wird.

Das System ist relativ komplex und gibt dem Biofilm die Möglichkeit als Ganzes zu agieren. Nadell *et al.* vergleichen in einer Wachstumssimulation die Stämme die durch ein QS-Signal EPS produzieren (EPS<sup>+</sup>) mit denen, die die Produktion bei diesem Signal einstellen (EPS<sup>-</sup>) (Nadell *et al.*, 2008). Diese Zellen bleiben im unteren Bereich und nutzen nur die Stoffwechselfase der EPS<sup>+</sup> Spezies. Durch den später verlangsamten Stoffwechsel haben sie eine gewisse Toleranz gegenüber widrigen Schwankungen der Umweltparameter (Persister).

Das Prinzip "Quorum Sensing" ist auch in anderen Arbeiten Ziel numerischer Simulationen (Ward *et al.*, 2003), weil nur wenige Parameter zur Beschreibung des Signalwegs notwendig sind (Diffusion, QSM/QSP – Stabilitätskonstante (Schwellenwert), Reaktion). Das Spektrum der Effektorgene ist jedoch umfangreich.

### 1.3.7 Simulationen – mathematische Modelle

Die Simulation im Bereich Biofilmforschung ist eines der wichtigsten Instrumente, um die Funktion von diversen Systemparametern (Stellschrauben) zu untersuchen. Sie gliedern sich hauptsächlich in folgende Bereiche:

1. Wachstum (Nährstoffe (Chang *et al.*, 2005; Picioreanu *et al.*, 1998) und Ablösung (Picioreanu *et al.*, 2001; Xavier Jde *et al.*, 2005)
2. Äußere Einflüsse: Antibiotika (Chambless *et al.*, 2006), Quorum Sensing (Nadell *et al.*, 2008), ...),
3. Stofftransport: Konvektion ( $\Delta p$ ) und Diffusion ( $\Delta c$ ) (Nähr- und Sauerstoffversorgung, Strömungsgeschwindigkeit (Stoodley, 1994; von der Schulenburg *et al.*, 2007)),
4. Reaktorleistung (Schadstoffabbau, Ausbeute (Saravanan & Sreekrishnan, 2008), ...) und
5. Kombinationen aus den oben genannten Bereichen (Alpkvist *et al.*, 2006).

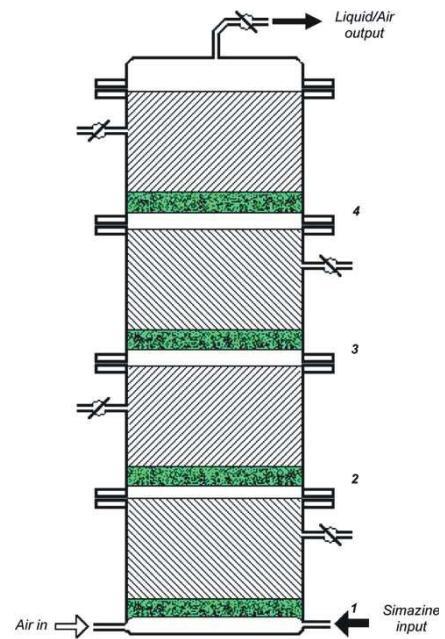
Ein wichtiges Simulationsmerkmal ist die Scala (mikro  $\rightarrow$  makro). Während die Untersuchung von ganzen Reaktorsystemen zur Makroskala zählen (z.B. (Koch *et al.*, 2001a; Koch *et al.*, 2001b)), sind die konventionellen Arbeiten (z.B. (Möhle, 2008)) meistens in der Mikroskala.

Vorteilhaft für die Untersuchungen eines Festbettreaktors und die schnelle Findung optimaler Strukturparameter einer synthetischen Aufwuchsfläche wäre eine Wachstumsimulation im mittleren Skalenbereich, die die Strömung und die Verblockung im Festbett analysiert. (von der Schulenburg *et al.*, 2007).

### 1.3.8 Biofilmreaktoren

Am weitesten verbreitet sind Biofilmanwendungen in der Abwasserreinigung. Dort ist der prominenteste Reaktortyp der Biofilter. Die meisten Arbeiten beschäftigen sich aus Gründen der Handhabung und Kontrolle der Parameter, mit geschlossenen Säulen. Diese Reaktortypen, wie zum Beispiel belüftete Membran-Reaktoren (Rishell *et al.*, 2004), Hohlfieberreaktoren (Downing & Nerenberg, 2007) oder Trommel-Reaktoren (Kwon *et al.*, 2008) sind speziell auf ihre Anwendung zugeschnitten. Generell werden Säulen in unterschiedlichen Maßstäben mit spezifischem Material gefüllt und im Aufstrom-Verfahren betrieben.

Den am besten zur Analyse von Kataboliten geeigneten Reaktoraufbau zeigten die Arbeitsgruppe um Mondragon-Parada (Mondragon-Parada *et al.*, 2008) (Abb. 7). Hier wird eine natürliche Population selektiert, konditioniert und zum Abbau eines Herbizids eingesetzt. Eine ähnliche Anwendung wurde von Massol-Deya untersucht (Massol-Deya *et al.*, 1995). Hierbei wurde jedoch die Artenzusammensetzung nicht spezifiziert. Die Kenntnis über die qualitative und quantitative Artenzusammensetzung kann ein Indiz für die Art und Konzentration des abzubauenen Schadstoffs sein (Komlos *et al.*, 2005; Komlos *et al.*, 2006). Im Zusammenhang



**Abb. 7** - Vier-Etappen-Säulenbioreaktor nach (Mondragon-Parada *et al.*, 2008)

der Verschiebung der Artenzusammensetzung ist auch der pH-Wert ein wichtiger Indikator für die Leistungsfähigkeit des Biofilm-Reaktors (Tarre *et al.*, 2007).

Die Biofilmfreundlichkeit einer Oberfläche misst sich an den Parametern einer schnellen und dichten Initialadhäsion und einem möglichst geringen Ablöseverhalten (Rauigkeit / Kontaktfläche / Physiko-Chemie). In speziellen Wirbelbettreaktoren wird ein Trägermaterial aus zwei unterschiedlich gut abbaubaren Substraten eingesetzt, sodass die Mikroorganismen bei der Kultivierung die Oberfläche und Rauigkeit selbst vergrößern (Hille *et al.*, 2008).

## 1.4 Besiedlungseigenschaften und Oberflächeneigenschaften

### 1.4.1 Besiedlung und Initialadhäsion

Die Biofilmentwicklung beginnt mit einem Prozess, der als Initialadhäsion bezeichnet wird. Oft diskutiert wird die umgebungsspezifische Möglichkeit eines oberflächenkonditionierenden Proteinfilms als Startpunkt für die Interaktion von Mikroorganismen und Materialoberfläche. In der Phase der mikrobiellen Adhäsion können einzelne Bakterien oder Konglomerate (Koaggregate) reversibel an die Oberfläche binden. Auch die reversible Bindung von Mikroorganismen an bereits adhärenzte Bakterien ist denkbar. Der Übergang von der reversiblen zur irreversiblen Adhäsion wird aktiv (QS)

von einigen Spezies durch die transkriptionelle Veränderung des Anabolismus und der Expression von extrazellulären polymeren Substanzen vollzogen. Nach diesem Schritt erfolgt das oberflächenassoziierte Wachstum, wie es im Abschnitt 1.3 (Biofilm) ausführlich beschrieben wurde.

Die Quantifizierung der Initialadhäsion und die Auswertung mithilfe einer exponentiellen Fit-Funktion ist ein Kernstück dieser Arbeit und ist im Abschnitt 2.7 (Charakterisierung der bakteriellen Adhäsion) ausführlich beschrieben.

### 1.4.2 Physiko-chemische Oberflächeneigenschaften

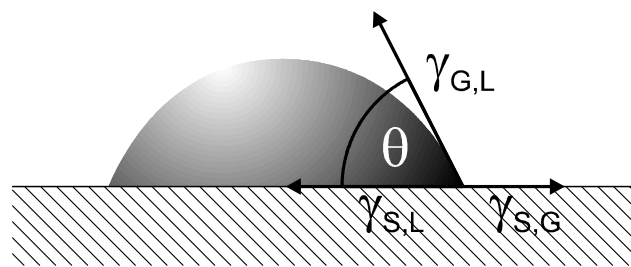
Insbesondere die primäre Adhäsion von Bakterien gilt als physiko-chemisch bestimmter Prozess (Busscher & Van der Mei, 1997). Eine Orientierung für die physiko-chemischen Eigenschaften und somit für die Stärke der Interaktion liefert der Kontaktwinkel zu einer polaren (z.B. Wasser) und einer unpolaren Flüssigkeit (z.B. Diiodmethan). Eine eingehende Analyse erfordert jedoch die Erfassung aller physiko-chemischen Parameter, die einen Einfluss auf die oberflächenassoziierten Kräfte haben.

In diesem Zusammenhang wird in der Literatur die Wirkung spezifischer und unspezifischer Adhäsionsmechanismen auf der Basis thermodynamischer Systemgrößen beschrieben. Beide Wechselwirkungsmechanismen gründen sich auf die Wirkung gleichartiger physikalischer Kräfte: den van der Waals Wechselwirkungen (Rijnaarts *et al.*, 1999), den elektrostatischen Interaktionen (Gottenbos *et al.*, 2001) und den Lewis-Säure-Base-Wechselwirkungen (Roosjen *et al.*, 2003). Der Vollständigkeit halber sei hier noch die temperaturabhängige „Brownsche Molekularbewegung“ als grundsätzliche physiko-chemische Kraft erwähnt, die als Diffusionswechselwirkung bezeichnet werden kann.

Die van der Waals-Wechselwirkungen nach W. H. Keesom kommen durch die Anziehung zwischen Dipolen zustande und sind somit elektrodynamische Orientierungskräfte. Nach P. Debye induzieren Moleküle mit permanenten Dipolen in benachbarten polaren und unpolaren Molekülen Dipolmomente, woraus wieder eine Anziehung resultiert. Die von F. London beschriebene Dispersionsenergie wird durch quantenmechanischen Wechselwirkung zwischen zwei neutralen Atomen oder Molekülen mit schnell wechselndem Dipolmoment verursacht. Die Wirkung dieser Wechselwirkung ist zwar in allen Molekülen vorhanden, klingt aber schon in relativ kurzer Entfernung stark ab.

Die in diesem Abschnitt beschriebenen Wechselwirkungskräfte zwischen biologischem System und Material stellen einen Beitrag zur Gibbs'schen Energie der Adhäsionsreaktion dar und dienen der thermodynamischen Beschreibung der Bioadhäsion. Die Arbeit, die durch diese Energie verrichtet wird, ist die Adhäsionsarbeit. Der experimentelle Zugang zu dieser Größe ist über das Benetzungsverhalten der Partner möglich, das durch die Oberflächenspannung beschrieben wird. Mit einer Kontaktwinkelmessung kann die Oberflächenspannung ermittelt werden.

Der Kontaktwinkel (Abb. 8) ist der Winkel zwischen den, aus der Oberflächenspannung resultierenden, Kraftvektoren der gasförmigen, flüssigen und festen Phase auf einer planaren Oberfläche. Er wird durch die Youngsche Gleichung beschrieben (Gleichung 1).



**Abb. 8** - Die resultierenden Kraftvektoren der Grenzflächen Spannungen  $\gamma$  an der Drei-Phasen-Grenze bilden den Kontaktwinkel.

Gleichung 1: 
$$\cos \theta = \frac{\gamma_{SG} - \gamma_{SL}}{\gamma_{GL}}$$

Die Youngsche Gleichung ist die Grundlage für die Berechnung der Oberflächenspannung nach van Oss/Good (Van Oss *et al.*, 1988), Owens/Wendt (Owens & Wendt, 1969) oder Zisman (Fox & Zisman, 1950). In dieser Arbeit beziehen sich die Berechnungen der Oberflächenspannung auf den Separationsansatz (theory of surface tension components). Van Oss teilt die Wechselwirkungsenergien in einen Lifshitz-van der Waals-Anteil, der alle entsprechenden Wechselwirkungen umfasst (London'sche-, Kleesom- und Debye-WW), und einen Säure-Basenanteil, der Wasserstoffbrücken und Lewis-Säure-Basen WW enthält, ein (Gleichung 2).

Gleichung 2: 
$$\gamma_s = \gamma_s^{LW} + \gamma_s^{AB} \quad \text{mit} \quad \gamma_s^{AB} = 2\sqrt{\gamma_s^+ \gamma_s^-}$$

Van Oss legte die WW-Anteile für Wasser als Messflüssigkeit mit  $21,8 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  für  $\gamma^{LW}$  und  $25,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  jeweils für  $\gamma^+$  und  $\gamma^-$  fest. Die WW-Anteile der berechneten Oberflächen zeigten ein Ungleichgewicht zum basischen Bereich. Von Della Volpe et al.

(Della Volpe & Siboni, 2000) wurden die theoretischen Werte für Wasser angepasst um eine homogene Verteilung zu erzielen ( $26,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  für  $\gamma^{\text{LW}}$ ,  $48,5 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  für  $\gamma^+$  und  $11,2 \text{ mN}\cdot\text{m}^{-1}$  für  $\gamma^-$ ). Diese Werte wurden für die Berechnungen in dieser Arbeit verwendet. (siehe auch 2.2.2 und Tabelle 2)

### 1.5 Exkurs - Dissoziationskonstante

Mit der Bestimmung von  $q_{\text{max}}$ ,  $\beta$  und  $j_0$  bei einer bestimmten Konzentration, kann das Verhalten der Bakterien im „natürlichen“ Prozess abgeschätzt werden und verschiedene Materialien verglichen werden. Während die einfache Messung einer Initialadhäsion ein zeitabhängiger Prozess ist, kann durch die Messung bei verschiedenen Zellkonzentrationen eine Binde- oder Dissoziationskonstante berechnet werden. Wird die initiale Adhäsionsgeschwindigkeit ( $j_0$ ) über der jeweiligen Konzentration der überströmenden Bakteriensuspension aufgetragen, ist es möglich, die kinetischen Parameter  $K_D$  und  $j_{0\text{max}}$  ( $v_{\text{max}}$ ) zu ermitteln, die unabhängig von der Konzentration sind. Mit diesem Versuchsteil soll das biochemische Prinzip von Ligandenbindung genutzt werden, um die Adhäsion von Bakterien zu beschreiben.

Die dynamische Gleichgewichtsbelegung kann thermodynamisch durch die Langmuir-Isotherme (Gleichung 3) beschrieben werden.

$$\text{Gleichung 3: } q = \frac{K_L \cdot q_{\text{max}} \cdot C_{\text{eq}}}{1 + K_L \cdot C_{\text{eq}}}$$

- 
- $q$  – Beladung des Sorbents (Masse Sorbat bezogen auf Masse Sorbent)
- $K_L$  – Langmuir-Sorptionskoeffizient
- $q_{\text{max}}$  – maximal sorbierbare Konzentration des Sorbats (Masse Sorbat bezogen auf Masse Sorbent)
- $C_{\text{eq}}$  – Konzentration des Sorbats in Lösung

In der Chemie wird für die Beschreibung von Adsorptionsprozessen die Langmuir-Isotherme verwendet. In der Biologie finden die Michaelis-Menten-Kinetik oder Monod-Kinetik als mathematisch analoge Beschreibung Anwendung (Gleichung 4).

$$\text{Gleichung 4: } v_0 = \frac{v_{\text{max}} \cdot [S]}{K_M + [S]}; \mu = \frac{\mu_{\text{max}} \cdot [S]}{K_S + [S]}$$

- $v_0$  – Reaktionsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration
- $v_{\text{max}}$  – maximalen Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung

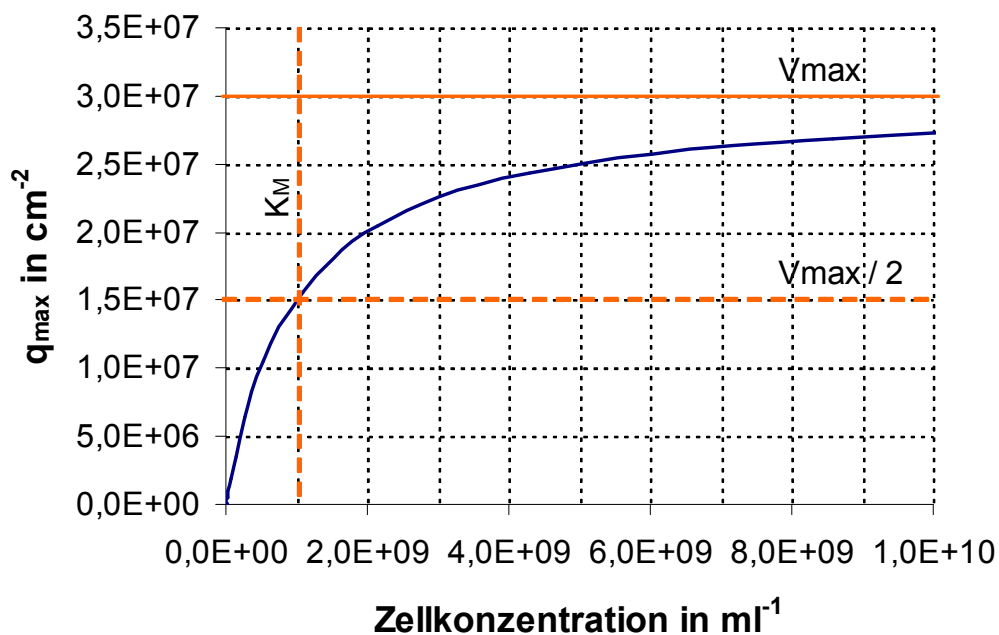


- $\mu$  – Wachstumsgeschwindigkeit als Funktion der Substratkonzentration
- $\mu_{\max}$  – maximalen Wachstumsgeschwindigkeit bei Substratoptimum
- $K_M$  – Michaelis-Konstante
- $K_S$  – Monod-Konstante
- $[S]$  – Substratkonzentration

Beide Funktionen (Gleichung 3 und Gleichung 4) sind Hyperbeln, die durch ihre Asymptoten entsprechend den Werten  $V_{\max}$  oder  $q_{\max}$  (realer Ast) und  $K_m$  (imaginärer Ast) beschrieben werden. Die Funktionen der Langmuir-Isotherme und der Monod-beziehungsweise Michaelis-Menten-Kinetik unterscheiden sich durch die Konstante  $K_L$  und  $K_M$ , welche ein Reziprokes der anderen darstellt (Gleichung 5).

$$\text{Gleichung 5:} \quad K_L = \frac{[C_{Ad.}]}{[C_{Des.}]}; \quad K_M = \frac{V_{rück}}{V_{hin}} \triangleq \frac{[C_{Des.}]}{[C_{Ad.}]}$$

Der Prozess der Initialadhäsion ist zwar ein Adsorptionsprozess, jedoch gibt die  $K_M$  bzw.  $K_S$  Konstante im Gegensatz zu  $K_L$  direkt eine Halbsättigungskonstante wieder. Diese Konstante wird in der Enzymkinetik definitionsgemäß für den Fall, dass der Umsatz in einem vernachlässigbarem Umfang stattfindet ( $k_2 \ll k_1$ ), als Dissoziationskonstante beschrieben. Sie kann somit in diesem System als Maß der Affinität zwischen Oberfläche und Bakterium betrachtet werden. Ist die Dissoziationskonstante klein so ist die Affinität der Bakterien zum Material groß, und umgekehrt.



**Abb. 9** - Mögliche bakterielle Adhäsionskinetik;  $v_{\max}=3 \cdot 10^7$ ;  $K_M=1 \cdot 10^9$

## 1.6 Polymere - künstliche Oberflächen

### 1.6.1 Allgemeines

Durch die Verfügbarkeit einer Vielzahl von Monomeren, ist es möglich verschiedene funktionelle Gruppen an die Oberfläche eines Polymers oder als Seitenkette des Netzwerks, zu synthetisieren. Dabei wirken an der Oberfläche unpolare, polare oder geladene Gruppen eigenschaftsbestimmend.

Polymere Werkstoffe haben aufgrund ihrer Herstellung an ihren Grenzflächen meist geringe Rauheiten. Darüber hinaus sind die häufigstverwendeten Polymere hydrophob. Eine Ausnahme bildet z.B. Nafion, ein sulfoniertes PTFE. Für die Erfordernisse einer hydrophilen Oberfläche wird jedoch in der Praxis meist auf Gläser oder Metalle zurückgegriffen.

### 1.6.2 Polymere in der Textiltechnologie

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Kunststoffe vorgestellt. Sie sind typische Vertreter für die Anwendung in der Textilindustrie.

#### *Polypropylen* (Schmenk et al., 2002)

Der Ausgangsstoff für die Herstellung von Polypropylen ist Propen ( $\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CH}_3$ ). Für die Polymerisation ist ein hoher Reinheitsgrad des Monomers nötig. Die Polymerisationsreaktion erfolgt mit einem heterogenen Ziegler-Natta-Katalysator und führt zu isotaktischem Polypropylen (iPP). Das Molekulargewicht des für die Faserherstellung verwendeten PP liegt zwischen 200.000 - 350.000. Die Textilfaser aus diesem Material wird vorwiegend mit dem Schmelzspinnverfahren hergestellt. Dabei wird das Polypropylen bei 160-175°C geschmolzen und homogenisiert. Bei diesem Prozessschritt erfolgt auch die Beimengung von funktionsbestimmenden Additiven, wie Farbstoffen, Weichmachern oder Stabilisatoren zur UV- und Hitzebeständigkeit. Die Schmelze wird durch eine Vielzahl von Spinndüsen extrudiert, sofort verstreckt und mit Luft abgekühlt. Je nach Herstellungsverfahren können die Filamente zu einem Multifilament verdrillt werden oder als Monofilament aufgefangen werden. Für die Anforderungen in dieser Arbeit wurde ein Monofilament verwendet, da dieses aufgrund seiner Größe besser für mikroskopische Analysen geeignet ist. Polypropylen ist einer der wenigen Kunststoffe, die mit einer Dichte von  $0,9 \text{ g/cm}^3$  leichter als Wasser sind. Polypropylen nimmt keine Feuchtigkeit auf und ist ausgezeichnet stabil gegenüber allen

organischen Lösungsmitteln, Säuren und Laugen. Die Beständigkeit gegenüber Mikroorganismen ist sehr gut.

### *Polyamid* (Saremba et al., 1997)

Als erstes Polyamid entwickelte W. H. Carothers 1935 das so genannte Nylon aus Hexamethyldiamin und Adipinsäure. Das in dieser Arbeit verwendete Polyamid 6 wurde zuerst von P. Schlack (1939) aus 6-Aminocapronsäure mit Aminocapronsäurehydrochlorid als Katalysator synthetisiert. Das entstandene Produkt wurde in der Textilindustrie unter dem Namen Perlon bekannt.

Die Spinn temperatur liegt zwischen 255 und 300°C. Nach dem Extrudieren ist beim PA-Garn eine Verstreckung notwendig, um die erforderlichen textiltechnischen Eigenschaften zu erreichen. Wichtige Bedingungen beim Spinnen des PA-Garns sind Luftfeuchtigkeit und Spulgeschwindigkeit. Aus Polyamid können unter anderem so genannte Mikrofasern mit einer Feinheit unter 1dtex<sup>2</sup> gesponnen werden.

Polyamid 6 ist nicht säurestabil (14% Salzsäure). Bei Raumtemperatur ist es jedoch stabil gegenüber organischen Lösungsmitteln. In Phenol und m-Cresol lösen sich die Fasern auf. Die Beständigkeit gegenüber Mikroorganismen und Insekten ist sehr gut. Die Fasern sind schimmelbeständig und können nicht verrotten oder verfaulen. Die Wetterbeständigkeit ist ausreichend jedoch ist die Beständigkeit gegenüber Licht ohne Aditive unbefriedigend. Die Dichte liegt je nach Kristallisierungsgrad um 1,14 g/cm<sup>3</sup>. Das Polymer kann ca. 5% Wasser aufnehmen.

### *Polyester* (Tetzlaff et al., 1993)

Ein Polyester (PET - Polyethylenterephthalat) ist ein lineares Makromolekül des Esters eines Diols und einer Terephthalsäure. Historisch hat die Polyesterfaser ihren Ursprung 1931. W. H. Carothers (Erfinder des Nylon 1935) und J. W. Hill synthetisierten aus Sebacinsäure und Ethylenglykol den ersten Polyester. Im Jahr 1939 ersetzten J. R. Whinfield und J. T. Dickson die aliphatischen durch eine Reihe aromatischer Dicarbonsäuren und konnten 1941 die erste brauchbare Polyesterfaser herstellen. Polyester wird heute vorwiegend mit dem AMOCO-Prozess<sup>3</sup> hergestellt. Die im Polykondensationsreaktor entstandene Schmelze wird direkt, wie bei den meisten Kunststofffasern mit dem Schmelzspinnverfahren, kontinuierlich ausgesponnen.

---

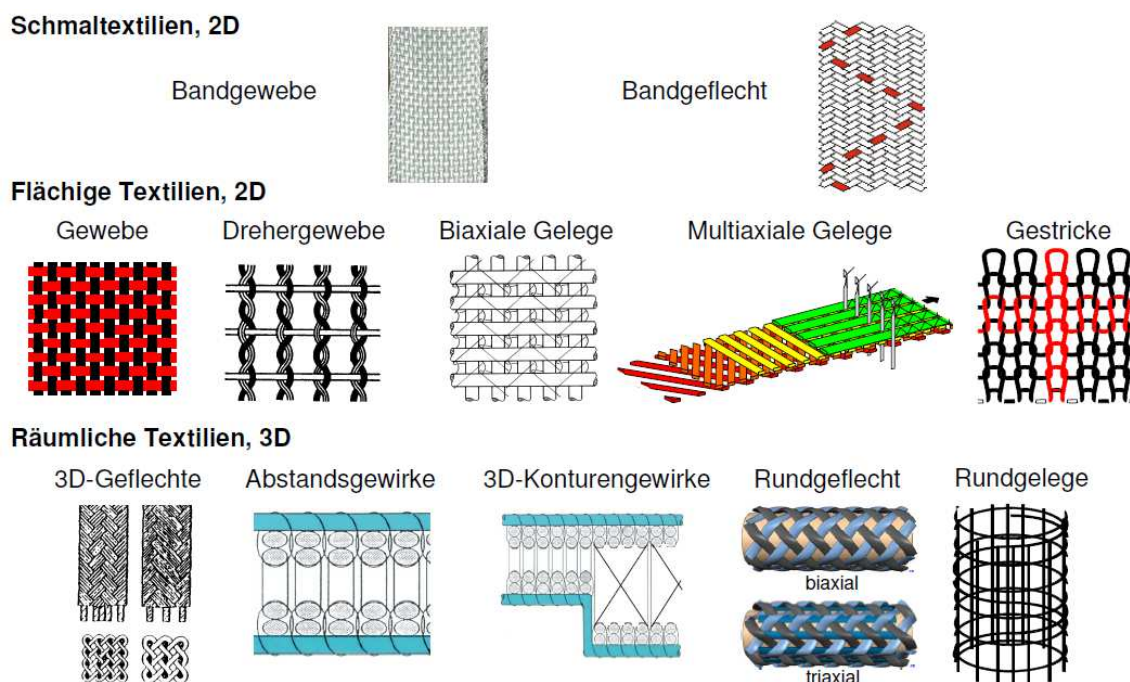
<sup>2</sup> 1dtex [Dezitetex] = 1g pro 10km

<sup>3</sup> radikalkatalysierte Flüssigphasenoxidation von *p*-Xylol in AcOH mittels Bromaktivierung

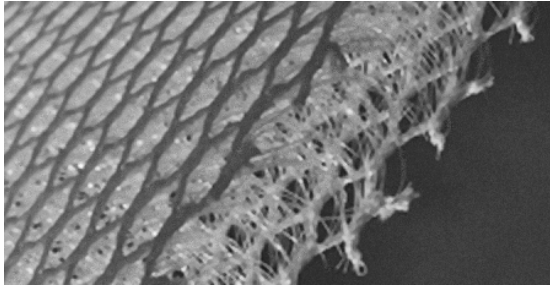
Die physikalischen Eigenschaften, wie Festigkeit, Elastizität und Färbefähigkeit lassen sich durch die Herstellung variieren. Normale Polyester besitzen eine Schmelztemperatur von 250-260°C und nehmen 0,3-0,4% Wasser (bei Normalklima) auf. Der hohe Elastizitätsmodul macht Polyester besonders geeignet für Textilien, die eine hohe Formstabilität aufweisen müssen. Dadurch wird es ideal für den Einsatz bei der Herstellung von dreidimensionalen Textilien. Die Dichte liegt zwischen 1,36 g/cm<sup>3</sup> und 1,41 g/cm<sup>3</sup>. Polyester sind somit schwerer als Wasser. Die chemische Beständigkeit gegenüber Mineralsäuren und organischen Lösungsmitteln ist bei Normaltemperatur sehr gut. Ausnahmen bilden Schwefelsäure, Tetrachlorkohlenwasserstoffe und Tetrachlorethan. Kochende organische Lösungsmittel und Laugen lösen die Faser. Auch in kochendem Wasser bzw. Wasserdampf wird die Faser hydrolytisch abgebaut.

### 1.6.3 3D-Textilien

Die Möglichkeiten der Textiltechnologie scheinen heute unerschöpflich (Abb. 10). Mit textilen Fasern aus Baumwolle, Wolle, Glas, Metall, Kohlenstoff und vielen organischen Polymeren kann nicht nur Bekleidung gefertigt werden. Die neuen Anwendungsgebiete reichen von der Architektur über den Maschinenbau bis hin zur Medizin. Aus den Anforderungen klassischer Anwendungen, wie der Bekleidungsindustrie, sind die Fertigungsverfahren auf Masse, Geschwindigkeit und Ökonomie ausgelegt.



**Abb. 10** - Textile Strukturen (aus Vorlesung Faserverbundwerkstoffe 2; Institut für Textiltechnik der RWTH Aachen)



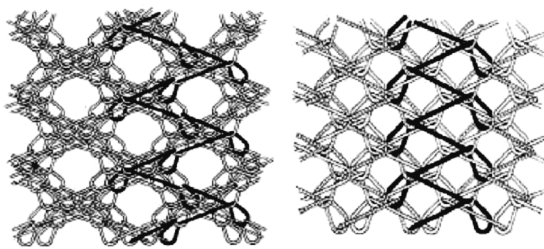
**Abb. 11** - Abstandsgewirk

Diese Eigenschaften machen die Textiltechnologie attraktiv für die oben genannten Beispiele und für viele andere Anwendungsgebiete, bei denen die konventionellen Methoden gerade schon wirtschaftlich etabliert sind. Dies gilt ebenfalls

für die Abwasserbehandlung. So kann das in dieser Arbeit verfolgte Ziel sich besonders ergänzend und spezialisiert an den Aufgaben der Abwasserbehandlung beteiligen.

Diese Eigenschaften machen die Textiltechnologie attraktiv für die oben genannten Beispiele und für viele andere Anwendungsgebiete, bei denen die konventionellen Methoden gerade schon wirtschaftlich etabliert sind. Dies gilt ebenfalls für die Abwasserbehandlung. So kann das in dieser Arbeit verfolgte Ziel sich besonders ergänzend und spezialisiert an den Aufgaben der Abwasserbehandlung beteiligen.

Durch die Auswahl des optimalen Materials kann der Träger mit der bestmöglichen Biokompatibilität verwendet werden. Dieses Merkmal wird durch die Biotechnologie bestimmt. Die Eigenschaft eines mikrobiologischen Trägersystems, die von der Textiltechnologie optimiert werden kann ist die Struktur. Optimal ist eine möglichst offene Struktur, die trotzdem ein Maximum an Aufwuchsfläche bietet.



**Abb. 12** - mögliche Deckschicht für ein Abstandsgewirk; (Bruer *et al.*, 2005)

Das Abstandsgewirk, dessen Gesamtporosität über 80% liegen kann (Abb. 11) und dessen Dimensionen einer industriellen Anwendung gewachsen sind, ist optimal geeignet. Es werden zum Beispiel Matratzen und Polster mit einer Höhe von bis zu 15 cm aus einer einzigen Lage des

Abstandsgewirks gefertigt. Die Deckschichten (Filetstruktur; Abb. 12) können dabei ebenso porös sein wie die Stützschrift (Polfäden, Abb. 11). Eine hohe Formstabilität in Richtung der Polfäden wird hier meist durch die Verwendung von PET-Filamenten gewährleistet.

Generell lässt sich die Perspektive für den Einsatz von textilen Strukturen im Bereich der Abwassertechnologie als exzellent bezeichnen.

### 1.7 Arbeitshypothesen und Forschungsziel

**1. Hypothese:** Zu Beginn der Biofilmentstehung wird die initiale Adhäsion von Bakterien in Maß und Geschwindigkeiten von physiko-chemischen Eigenschaften und hier im speziellen von der Oberflächenspannung, der Rauigkeit und den elektrostatischen Eigenschaften des Aufwuchsmaterials bestimmt.

Die physiko-chemischen Eigenschaften und Adhäsionsparametern werden in dieser Arbeit für ausgewählte Oberflächen quantifiziert. Die gewonnenen Daten werden durch Korrelation und Verwendung geeigneten Fit-Funktionen auf Zusammenhänge geprüft.

**2. Hypothese:** Die Biofilmstruktur (Porosität und Dichte) wird von der Dichte der ersten Zellschicht festgelegt.

Bei einer hohen Zelldichte an der Materialoberfläche als Startpunkt für das mikrobielle Wachstum entsteht eine großflächige zusammenhängende Mikrokolonie, die auch als dünner Biofilm bezeichnet werden kann. Umgekehrt entstehen bei dünner initialer Zellbelegung vereinzelte Mikrokolonien, die der Startpunkt für das Wachstum mit höhenabhängiger Konkurrenzsituation sind.

Diese Zusammenhänge werden mit Hilfe einer numerischen Simulation und korrelierenden Experimenten untersucht.

**3. Hypothese:** Die Struktur des Biofilms bedingt eine stärkere oder schwächere Abbauleistung von gelösten Stoffen im überströmenden Medium.

Die unterschiedlichen Biofilmformen werden ihren Abbauleistungen gegenübergestellt. Parallel werden die Porositäten des Aufwuchskörpers/Trägers mit der entsprechenden Abbauleistung korreliert.

#### **Fazit:**

Die physiko-chemischen Eigenschaften des Trägers könnten somit indirekt die Abbauleistung des aufgewachsenen Biofilms bestimmen.

Mit dieser Arbeit soll die Oberfläche beziehungsweise das Material, das den aktivsten Biofilmtyp für eine industrielle Anwendung (im Bereich der Abwasserreinigung) aufwachsen lässt, herausgestellt werden.

## 2 Materialien und Methoden

### 2.1 Beschichtungen

Ursprünglich wurde angenommen, dass die geringste Oberflächenspannung, aus thermodynamischer Sicht, die stärkste Interaktion zwischen Material und Mikroorganismus bewirkt. Die Oberflächenspannung der Bakterien ist kleiner als die des umgebenden Lösungsmittels (Wasser). Daraus ergibt sich mit abnehmender Oberflächenspannung des Materials eine kleiner werdende Adhäsionsarbeit, die eine Adhäsion wahrscheinlicher macht (Absolom *et al.*, 1983). Dadurch motiviert, wurden Beschichtungen ausgewählt, die die Oberflächenspannung gegenüber dem unbeschichteten Material verringern.

Eine zweite Motivation war, das Spektrum der Oberflächenspannungen der textiltechnisch relevanten Kunststoffe (PP, PET, PA6) von sehr niedriger bis sehr hoher Oberflächenspannung gleichmäßig abzudecken und im Bereich der niedrigen Oberflächenspannung zu erweitern. Dazu wurden maßgeblich eine Fluorkarbon-Dispersion (Tubiguard; CHT R. Beitlich GmbH, Tübingen, Deutschland) und eine Polysiloxan-Zubereitung (Tegophobe; Tego Chemie GmbH, Essen, Deutschland) eingesetzt. Durch die Silanisierung wird an der Oberfläche ein Kohlenhydratpolymer präsentiert, ähnlich einer Polypropylen- oder Polyethylenstruktur.

#### 2.1.1 Glasreinigung

Als Glassubstrat und als Grundlage für jede Beschichtung auf Glas wurde Borosilikatglas BOROFLOAT B33 (Firma Schott Jena, Jena, Deutschland) verwendet. Die Reinigungsprozedur erfolgt nach folgenden Schritten.

1. Die fabrikneuen Objektträger werden 10 min in 0,5% Lösung (in bidest. H<sub>2</sub>O) Blanchipon<sup>®</sup> (Lysoform Dr. Hans Rosemann GmbH, Berlin, Deutschland) eingelegt und mit KIMWIPES<sup>®</sup>-Reinigungstüchern abgerieben. Tensidreste werden durch Spülen mit bidest. H<sub>2</sub>O entfernt.
2. Nach der Grobreinigung werden die Gläser 10 min in eine 4% Lösung (in bidest. H<sub>2</sub>O) Optical<sup>®</sup> II (Firma Mineralöle, Albert, Göschwitzer Straße 20, 07745 Jena) im Ultraschallbad (Bandelin, Sonorex Super DK 102P) bei 100% Arbeitsleistung (120 Watt) gereinigt.

- Tensidreste werden durch Spülen mit der Spritzflasche mit bidest. H<sub>2</sub>O entfernt.
3. Um kleinste Tensid- und Fettreste zu entfernen werden die Gläser 10 min stehend in Reinstalkohol (99,95%) und anschließend 10 Minuten stehend in bidest. H<sub>2</sub>O eingelegt. Der Reinigungsprozess wird mit Ultraschall unterstützt.
  4. Abschließend werden die Proben gründlich mit Druckluft getrocknet und luftdicht verschlossen gelagert.

### 2.1.2 Nasschemische Beschichtungen

Als Beschichtungsmittel für die nasschemische Beschichtungsmethode kamen folgende Verbindungen zum Einsatz:

**Tabelle 1** - Beschichtungsmittel und Hersteller

Textilhilfsmittel	Chem. Charakteristik	Eigenschaften	Hersteller
Tubiguard 68	Fluorcarbon	Wasser- und ölabweisende Wirkung auf Synthese- und nativen Fasern und deren Mischungen. Wasch- und reinigungsbeständige Effekte.	CHT R. Beitlich
Oleophobol SLA neu	Fluorpolymer	Wasser- und ölabweisende Wirkung auf Synthefasern. Wasch-, chemisch- und reinigungsbeständig.	Huntsman
Evo Fin PSR	modifizierter Polyester	Hydrophilierungsmittel, Verbesserung der Saugfähigkeit und Feuchtigkeitsaufnahme von Textilien mit Polyester- und Zellulosefasern.	DyStar
Evo Soft HDS	Polysiloxan	Hydrophilierungsmittel, Verbesserung der Glätte und Dehnbarkeit von Textilien.	DyStar

Die Rezeptur der Flotte<sup>4</sup> für die Beschichtungen der Folien und Textilien erfolgte nach der Rezeptur des Herstellers (Tabelle 1) und wurde vom TITV in Greiz durchgeführt.

#### *Beschichtung auf Kunststoffflächen (Folien)*

1. Zur Qualitätskontrolle wird eine Kontaktwinkelmessung (Wasser) durchgeführt.
2. Die Lösung wird mit einem Rührer aufgeschäumt.
3. Der Schaum wird mit einem Rundrakel auf die Folie aufgetragen.
4. Die Flottenaufnahme wird bestimmt ( $M_{\text{Beschichtungsmittel}}/M_{\text{Textil}}$ ).
5. Das Textil wird in der Wärme getrocknet.
6. Die Fixierung erfolgt für 90 sek. bei 150°C.
7. Als Beschichtungsnachweis wird eine Kontaktwinkelmessung durchgeführt.

<sup>4</sup> Flotte bezeichnet hier das wässrige Bad in dem die Textilhilfsmittel gelöst sind.



### *Beschichtung auf Textilien (Foulard<sup>5</sup>)*

Das Foulardverfahren bezeichnet ein Verfahren zur Veredlung von Textilien, bei dem das Textil in eine Flotte getaucht und anschließend von einem Walzensystem ein- bzw. abgepresst wird.

1. Zur Qualitätskontrolle wird eine Kontaktwinkelmessung (Wasser) durchgeführt.
2. Das Textil wird durch Tauchen im Foulard mit der Flotte benetzt.
3. Überschüssige Flotte wird durch gasketische Entwässerung abgesaugt.
4. Die Flottenaufnahme wird bestimmt ( $M_{\text{Beschichtungsmittel}}/M_{\text{Textil}}$ ).
5. Das Textil wird in der Wärme getrocknet.
6. Die Fixierung erfolgt für 90 sek. bei 150°C.
7. Als Beschichtungsnachweis wird eine Kontaktwinkelmessung durchgeführt.

### **2.1.3 Tegophobe<sup>®</sup> - Beschichtung**

Als hydrophobe Referenz wird ein beschichtetes Glas eingesetzt. Die chemische Natur der Beschichtung ist ein Siloxan. An der Grenzfläche sind vermutlich Ethylgruppen für die spezifische physiko-chemische Interaktion maßgeblich.

### *Beschichtung auf B33-Glas*

1. Die Proben werden nach der materialüblichen Reinigungsprozedur gereinigt.
2. Zur Qualitätskontrolle wird eine Kontaktwinkelmessung (Wasser) durchgeführt und die Proben danach gründlich mit Druckluft getrocknet.
3. Die Proben werden 4 min im Plasmacleaner aktiviert.
4. Nach der Aktivierung werden die Proben stehend in einer Lösung 10%V TEGO-Phobe<sup>®</sup> (LM – Hexadekan) bei RT 60 min inkubiert.
5. Das LM wird dreifach unter leichtem schütteln in Hexan entfernt.
6. Die beschichteten Proben werden mit Druckluft getrocknet.
7. Als Beschichtungsnachweis wird eine Kontaktwinkelmessung durchgeführt.

### **2.1.4 Andere Beschichtungsverfahren**

Im Rahmen von Vortests und einer validierenden Materialbestimmung wurden auch andere Beschichtungsmethoden getestet. Zum Einsatz kamen Niederdruckplasmaverfahren mit unterschiedlichen Reaktionsgasen (z.B. O<sub>2</sub> und Cl<sub>2</sub>) und

---

<sup>5</sup> Foulard: franz. für Tuch

Reaktionszeiten (Sekunden bis Stunden). Ein weiteres Verfahren, das unter dem Namen Pyrosil<sup>®</sup> bekannt ist, wurde auf Eignung geprüft aber wegen schlechter Beständigkeit verworfen. (Siehe dazu 3.1!)

## 2.2 Physiko-chemische Charakterisierung

### 2.2.1 Physiko-chemische Beständigkeit

Die Bestimmung eines geeigneten textiltechnologischen Beschichtungsverfahrens setzt eine adäquate Schichtstabilität essentiell voraus. Um festzustellen, ob eine Oberflächenbeschichtung stabil auf einer Polymerfolie aufgebracht wurde, sind die jeweiligen Proben in den direkten mikrobiologischen Kontakt gebracht worden. Vor und nach dem Versuch wurden die physiko-chemischen Eigenschaften bestimmt. Die mikrobiologische Testprozedur wurde für die Screening-Phase durch einen dreifach wiederholte Autoklavierung (121°C, 1,4 bar) ersetzt. Das Verfahren wird, im Bezug auf die Beanspruchung, als mindestens gleichwertig eingeschätzt, verglichen mit der Spülung mit einer Zellsuspension. Die Ergebnisse der Behandlung mit feuchter Hitze geben einen guten Hinweis auf das Verhalten der Beschichtung im langfristigen Einsatz. Nach jedem Autoklavierschritt wurden der Wasserkontaktwinkel (polare Flüssigkeit) und der Diiodmethankontaktwinkel (unpolare Flüssigkeit) gemessen, um Veränderungen der Oberflächenspannung zu detektieren. Weiterhin wurden ATR-FTIR-Spektren aufgenommen um eine chemische Veränderungen festzustellen. Stichprobenartig wurde die Topographie aufgenommen, um den Einfluss des Beschichtungsverfahrens auf die Rauigkeit zu prüfen.

Oberflächenbeschichtungen, die den beschriebenen Test positiv durchliefen, wurden unter realistischen Bedingungen im Zellkontakt analysiert. Nach einem siebentägigen Spülen mit einer wachsenden Kultur wurden die Proben mit destilliertem Wasser und Ultraschall (10min, 3 Schritte) gereinigt. Als Nachweis für die physiko-chemische Beständigkeit wird der Wasserkontaktwinkel gemessen und mit den Messwerten vor dem Versuch verglichen.

### 2.2.2 Kontaktwinkel / Oberflächenspannung

Der Kontaktwinkel wurde mit dem Contact Angle System OCA von DataPhysics Instruments gemessen und mit der Software SCA202 aufgenommen. Die Kontaktwinkelmessung erfolgte mit folgenden Spezifikationen: statisch, tangent leaning,

sessile drop, 3  $\mu\text{l}$ , 15 Werte. Es wurden pro Oberfläche drei Tropfen gesetzt und vermessen. Die gewonnenen Messwerte sind mit Microsoft Excel aufbereitet und zusammengefasst worden.

Gleichung 6: 
$$\gamma_S = \gamma_S^{LW} + \gamma_S^{AB} \quad \text{mit} \quad \gamma_S^{AB} = 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_S^-}$$

Gleichung 7: 
$$\gamma_L (\cos \theta + 1) = 2\sqrt{\gamma_S^{LW} \gamma_L^{LW}} + 2\sqrt{\gamma_S^+ \gamma_L^-} + 2\sqrt{\gamma_L^+ \gamma_S^-}$$

Aus dem mittleren Kontaktwinkel von mehreren Flüssigkeiten wurde die Oberflächenspannung auf der Grundlage der Gleichungen von Della Volpe und Siboni (Della Volpe & Siboni, 2000) (Gleichung 6 und Gleichung 7) berechnet. Mit Hilfe eines im iba entwickelten Energiekalkulators (auf MAHTLAB<sup>®</sup>-Basis) wurde das überbestimmte Gleichungssystem für zehn Flüssigkeiten (Tabelle 2) numerisch gelöst.

**Tabelle 2** - Eingesetzte Flüssigkeiten zur Berechnung der Oberflächenspannung mit Hinweis auf die energetische Charakteristik (+ basisch, - sauer, LW dispers)

Flüssigkeit	Oberflächenspannung [ $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ]				Charakteristischer Schwerpunkt
	$\gamma^{LW}$	$\gamma^+$	$\gamma^-$	$\gamma_L$	
Wasser	26,20	48,50	11,20	72,81	mix / +
Glycerin	35,00	27,80	7,33	63,55	mix / +
Ethylenglycol	33,90	0,97	51,60	48,02	-
DMSO	32,30	0,04	763,00	42,97	-
Bromoform	28,10	19,90	2,24	41,45	+
Pyrol	25,90	10,80	2,66	36,62	+
Diiodmethan	50,80	0,00	0,00	50,80	LW
Brom-Naphtalen	44,40	0,00	0,00	44,40	LW
Hexadecan	27,60	0,00	0,00	27,60	LW
Formamid	35,50	11,30	11,30	58,10	mix

Werte aus (Della Volpe & Siboni, 2000).

### 2.2.3 Zetapotential

Das Zetapotential gehört zu den Grenzflächen-Parametern und wird von der Festkörperoberfläche beeinflusst (Werner *et al.*, 1998). Es wird als Indiz für die Stärke des Oberflächenpotentials, verknüpft über die Potentiale der adsorbierten Schicht und der inneren und äußeren Helmholtz-Schicht, herangezogen. Für Polymerfolien kann das Zetapotential aus dem Strömungspotential abgeleitet werden, das durch einen Elektrolytfluss zwischen zwei Platten erzeugt wird. Für die Messung wird die Innenseite eines rechtwinkligen Kanals ausgekleidet (l/w/h: 25/5/0,15mm, clamping cell, SurPASS, Anton Paar GmbH Graz/Österreich). Das Strömungspotential  $\Delta U$  [mV] wird mit Hilfe der

Smoluchowski Gleichung (Gleichung 8) in das Zetapotential  $\zeta$  [mV] umgerechnet (Buksek *et al.*, 2010).

Gleichung 8: 
$$\zeta = \frac{\Delta U}{\Delta p} \frac{\eta \kappa}{\varepsilon \varepsilon_0}$$

Der Parameter  $\Delta p$  bezeichnet dabei die Druckdifferenz entlang des Strömungskanal,  $\eta$  die dynamische Viskosität des Elektrolyten,  $\varepsilon_0$  die elektrophoretische Mobilität,  $\varepsilon$  die Dielektrizitätskonstante des Materials und  $\kappa$  die Leitfähigkeit des Elektrolyten. Die Messungen wurden in 1mM NaCl-Lösung bei einer maximalen Druckdifferenz von 300 mbar in beide Fließrichtungen durchgeführt. Das Zetapotential wird automatisiert von der Herstellersoftware berechnet und in einem standardisierten Protokoll ausgegeben.

#### 2.2.4 Attenuated total reflectant Fourier transformed infrared spektroskopie

Die ATR-FTIR Messung wurde durchgeführt um eine chemische Veränderung der Beschichtungen (2.1) auf den Folien während der Beständigkeitstests zu detektieren.

Für die Untersuchungen wurde das FTIR-Spektrometer Equinox 55 (Bruker Optics, Ettlingen) sowie die zugehörige ATR-Einheit benutzt. Die Messung in der ATR-Einheit A537 (6 Reflexionen) erfolgte auf einem Germanium-Kristall. Die Spektren werden von 4000-1000 WZ aufgezeichnet. Es erfolgen eine atmosphärische Kompensation, die das CO<sub>2</sub> und Wasser Signal minimiert, und eine Grundlinienkorrektur. Die Spektren werden mit den Referenzspektren der Materialien und untereinander zwischen den einzelnen Autoklavierschritten verglichen.

#### 2.2.5 X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) – Tiefenprofil

Die Tubiguard-beschichteten PA6- und PET-Folien wurden zur Prüfung der Beschichtung zusätzlich mit der XPS-Methode untersucht. Ein Tiefenprofil wurde mit einem Scanning X-ray Photoelectron Spectroscopy Microscope (PHI Quantum 2000; Physical Electronics, Inc.) von der Firma SGS Institut Fresenius GmbH (Dresden, Germany) aufgezeichnet. Vor Beginn der Aufzeichnung wurde die Oberfläche durch sanftes Sputtern (Argon - Ionen – Beschuss) gereinigt. Das Tiefenprofil wurde über eine Fläche mit einem Durchmesser von 100  $\mu\text{m}$  gemessen. Die Abtraggeschwindigkeit betrug 3 nm pro Minute.

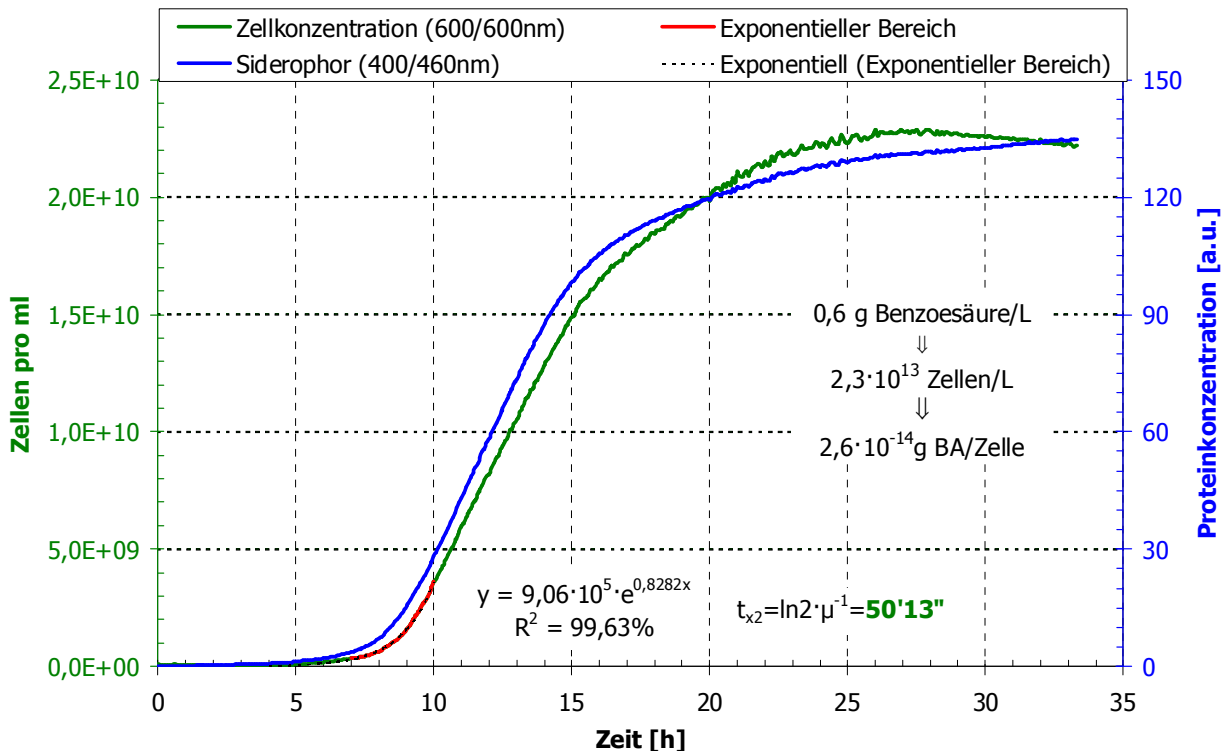
### 2.3 Zellkultur und Aufbewahrung

Als Mikroorganismen werden *Pseudomonas putida* mt2 vom DSMZ (Braunschweig) benutzt (DSM 3931). Die Mikroorganismen werden bei -20°C in 1,5 ml Dunkelglas-Probengefäßen gelagert. Als Kryoprotektivum wird 20%Vol. Glycerin (300 µl Glycerin/1200 µl Zellkultur) in einer Kultur der exponentiellen Wachstumsphase (Abb. 13; 12h) benutzt.

Die Kultur erfolgte in Anlehnung an das vom DSMZ empfohlene Mineralmedium M442. Das Kulturmedium setzte sich wie folgt zusammen  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$   $2,25 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$   $1,0 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   $0,75 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$   $0,1 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Nitritotriessigsäure (NTA)  $5,0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$   $1,5 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$   $0,1 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Ammonium Eisen Citrat (AEC)  $25,0 \text{ µg} \cdot \text{l}^{-1}$ ;  $\text{CoSO}_4$   $5,0 \text{ µg} \cdot \text{l}^{-1}$ ; Toluol  $0,45 \text{ g} \cdot \text{l}^{-1}$ .

Als Spül- und Verdünnungspuffer wird dieses Medium ohne AEC, NTA und Toluol eingesetzt.

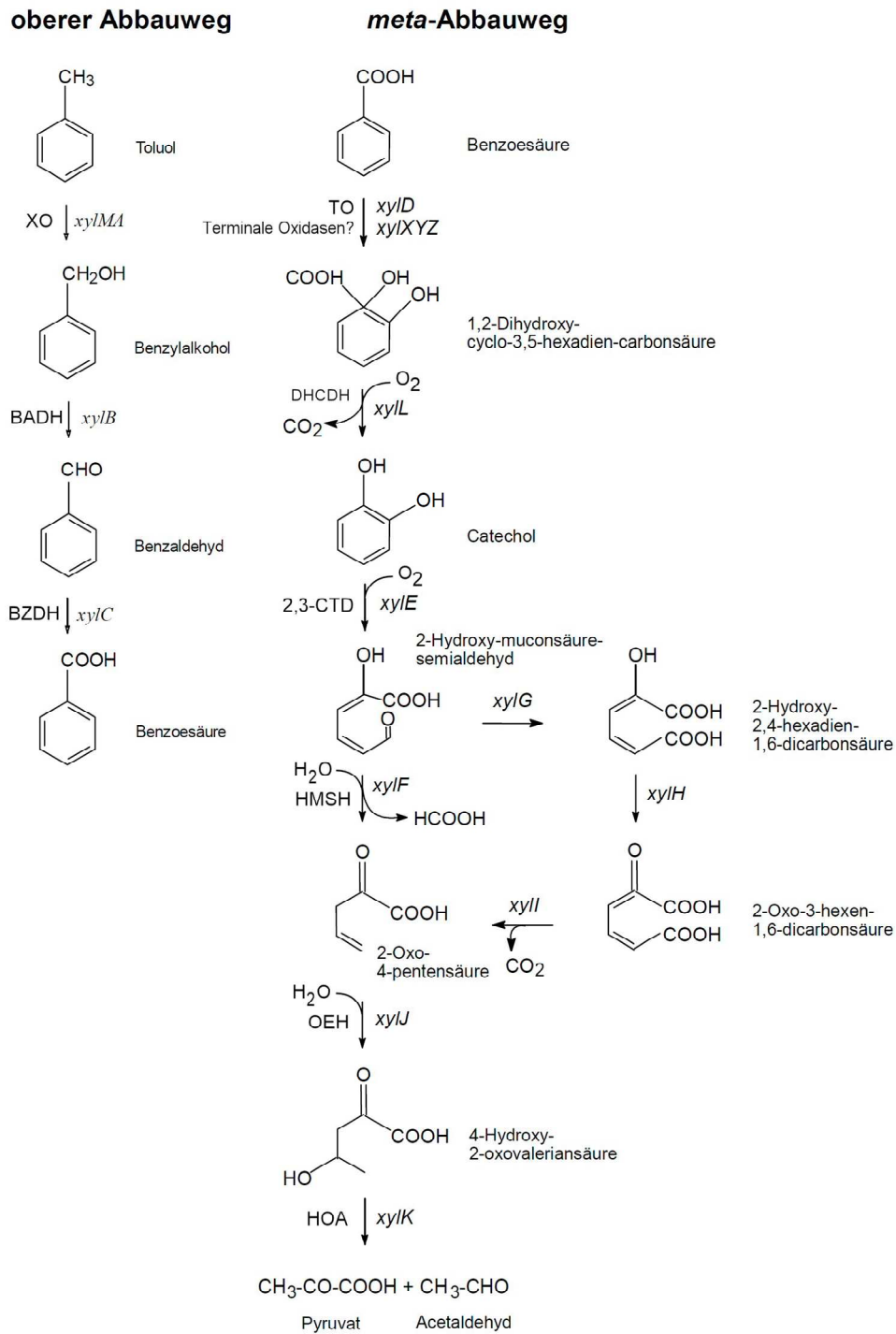
Die Bakterien werden bei 30°C und 175UPM in Schikanekolben im Schüttler kultiviert.



**Abb. 13** - Wachstumskurve von *Pseudomonas Putida* mt2; Messung mit Fluoreszenzspektrometer; 600 mg/l Benzoessäure

## 2.4 Pseudomonas putida mt2 - Metabolismus

Der Stamm *Pseudomonas putida* mt2 besitzt neben seinem natürlichen Chromosom ein Plasmid (pWW0), auf dem die Enzyme für den Abbau von Toluol und die Eingliederung der Katabolite in den chromosomalen Stoffwechselweg kodiert sind (Abb. 14).



**Abb. 14** - Verbindungen des speziellen Abbauwegs von Toluol in *P.putida* mt2; nach: (Burlage *et al.*, 1989)

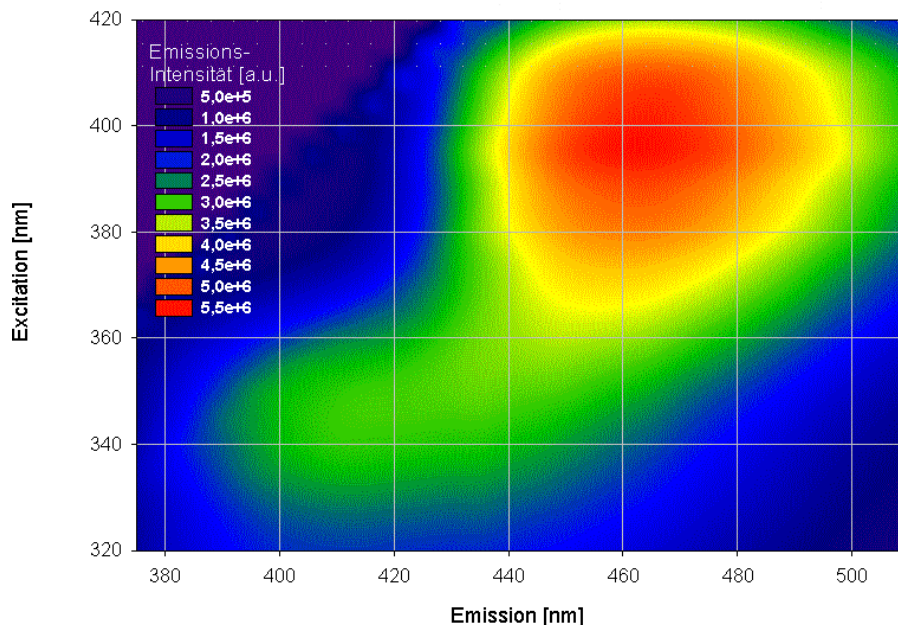
## 2.5 Bildgebung

### 2.5.1 Phasenkontrastmikroskopie

Die Phasenkontrastmikroskopie (PhKM) ist die Methode der Wahl, um die dünne initiale Zellschicht auf den verschiedenen Materialien zu detektieren. Die Experimente wurden in einer Fließzelle (2.6 Fließzellaufbauten) durchgeführt. Der optische Weg zwischen Objekt und Objektiv (Zellen-Folie-Objektträger-Luft) konnte durch ein spezielles Objektiv überbrückt werden. Den Erfordernissen der Anwendung entsprach ausschließlich das LUCPLFLN60x/0,7 LWD (long range working distance) von Olympus.

### 2.5.2 Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie (CLSM)

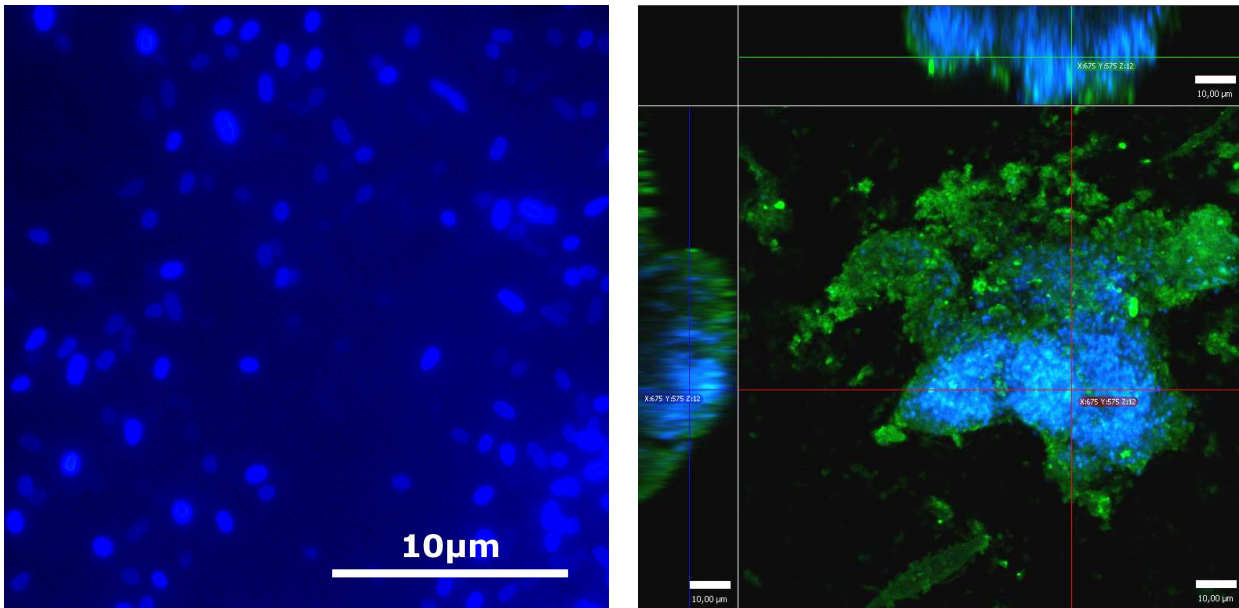
Um die räumliche Gestalt von Biofilmen möglichst genau zu erfassen, hat sich die Rekonstruktion aus optischen Schnitten mit der konfokalen Laser-Scanning-Mikroskopie bewährt. Die Methode nutzt neben dem konfokalen Abrastern verschiedener Schichten die Prinzipien der Fluoreszenzmikroskopie, um verschiedene Zielobjektklassen (region of interest) zu separieren. Das verwendete Mikroskop (Leica TSP SP) verfügt über vollständig variable Emissionsfilter. Für eine optimale Untersuchung wurde das Fluoreszenzverhalten des verwendeten Stammes untersucht.



**Abb. 15** - Anregungs-Emissions-Spektrum des Siderophor von *P. putida mt2*

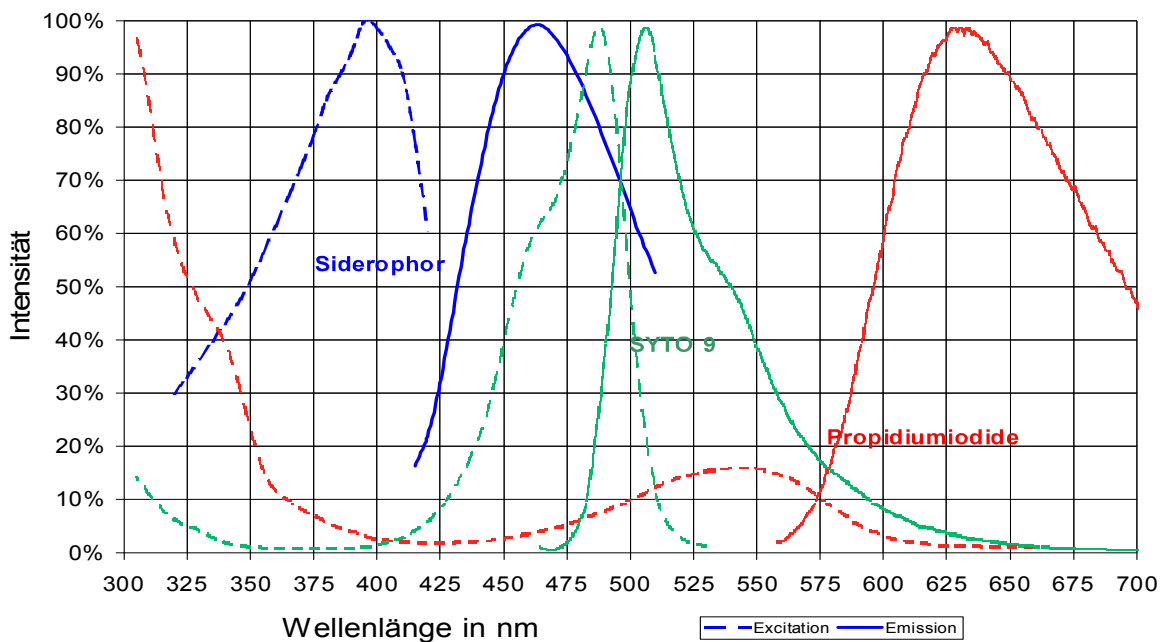
Drei sinnvolle Fluorophore stellten sich zur Analyse heraus. Zur Lebend-Tot-Analyse wurden Syto9 und Propidiumiodid aus dem BacLight™ - Live/Dead® staining kit von Molecular Probes

verwendet. Die Färbung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Zusätzlich wurde das Siderophor des Mikroorganismus für eine Autofluoreszenzanalyse untersucht (Abb. 15). Es ist vorwiegend in der Zellwand des Bakteriums lokalisiert (Abb. 16).



**Abb. 16** - links: Fluoreszenzbild von *P. putida*; 200fach; Filter: Ex 330-385nm; Em >420; rechts: XYZ-Schnitt von Mikrokolonie; EPS-Lektin-HAA-FITC (grün), Siderophor (blau), alle Balken 10 µm (linke Aufnahme mit Unterstützung von Thomas Neu UFZ-Magdeburg)

Mit der Analyse der Autofluoreszenz stehen die erforderlichen Parameter für die Filtereinstellungen am CLSM zur Verfügung, um so genannte cross talk events zu minimieren (Abb. 17).



**Abb. 17** - Anregungs-Emissions-Spektrum der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und des Siderophors



### **2.5.3 Raster-Kraft-Mikroskop (AFM)**

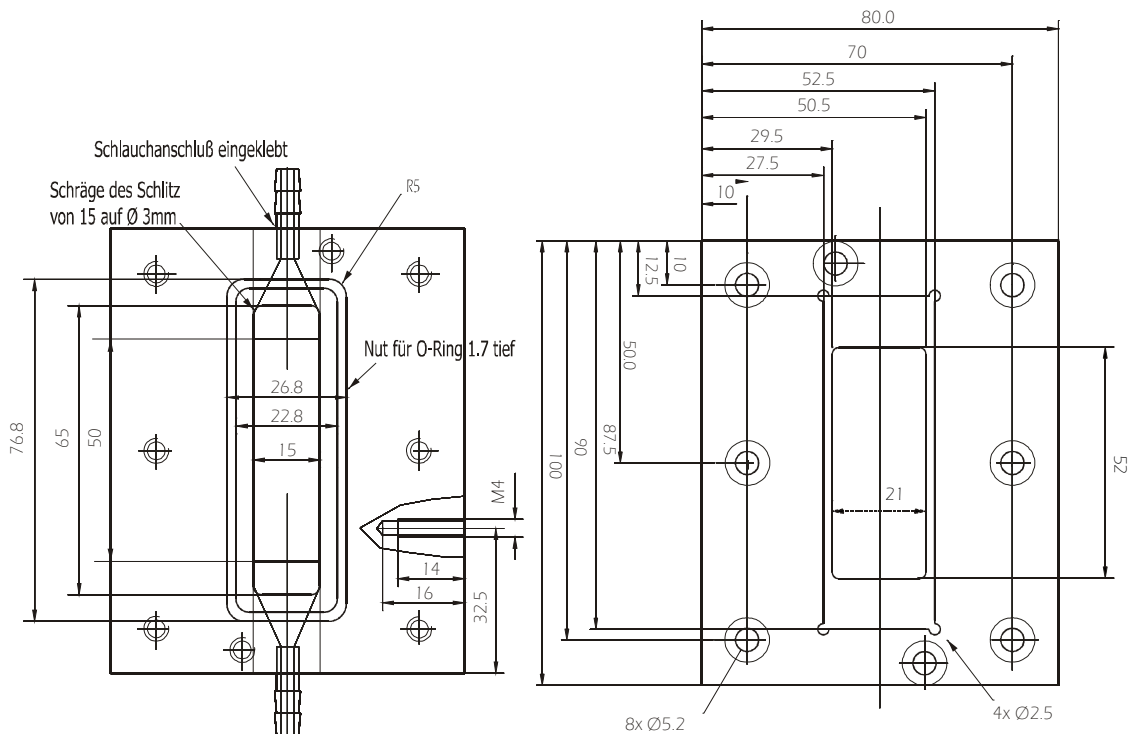
Die Analyse der Topographie ist eine Standardmethode zur physiko-chemischen Charakterisierung von Oberflächen. Sie fand in dieser Untersuchung Anwendung, um das Maß des Einflusses dieser Größe im Bezug zu anderen relevanten Parametern zu ermitteln. Die Messung der Topographie erfolgte im Kontakt - Modus mit dem Nanowizard I Atomic Force Microscope (jpk Instruments AG - Berlin). Der Set-Point-Wert für den constant force - Modus (für alle Substrate) betrug 1Volt, was ungefähr 12 nN entspricht. In diesem Modus wird die erwähnte Andruckkraft konstant gehalten und der Weg (Höhe des Cantilevers) nachgeregelt. Drei Bilder mit der Kantenlänge von 10 x 10 µm wurden pro Oberfläche aufgezeichnet. Von diesen drei Bildern wurde die RMS - Rauigkeit berechnet. Diese Rauigkeit ist das quadratische Mittel der Höhe über die angegebene Fläche.

### **2.5.4 Raster-Elektronen-Mikroskopie (REM)**

Die Proben mit adhäriertem biologischem Material wurden vor der REM - Untersuchung mit Glutaraldehyd-Lösung präpariert, getrocknet (Kritisch-Punkt-Trockner, Polaron Range CPD 7501) und mit einer etwa 5-10 nm Goldschicht besputtert (Sputter Coater Edwards S150B). Die Proben wurden im Hochvakuum an einem EVO LS10 Scanning Electron Microscope von Zeiss mikroskopiert.

## 2.6 Fließzellaufbauten

### Konstruktion



**Abb. 18** - Dimensionierung der Fließzelle (Ang. in mm); links: Oberteil; rechts: Unterteil

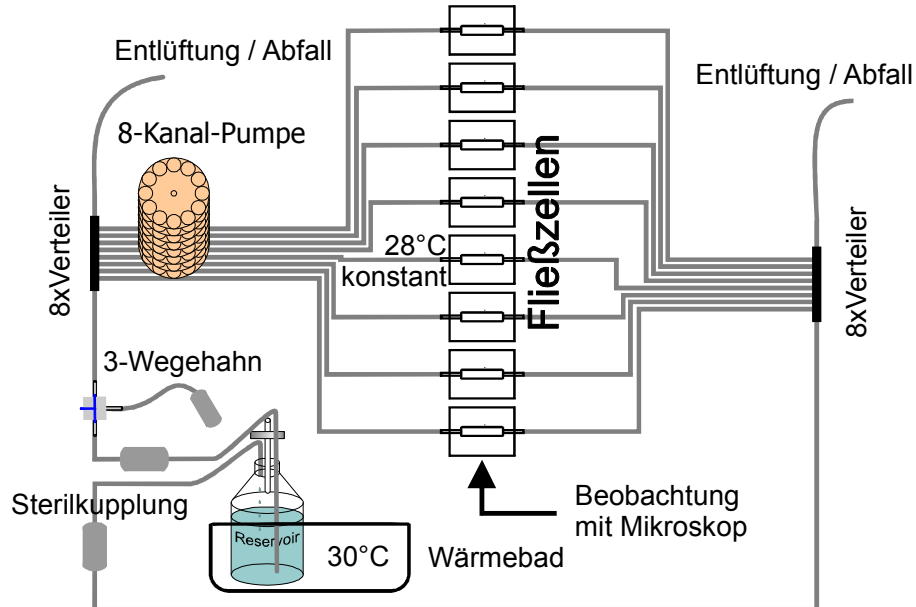
Die Fließzellen werden aus dem chemisch inerten Material TK-PEEK (teilkristallines Polyetheretherketon; Fa. Max Wirth, Braunschweig) gefertigt. Die Fenster für die Mikroskopie haben eine Dicke von 0,7 und 1 mm. Der Fließkanal zwischen den Glas-scheiben hat eine Größe von 65/15/1mm (l/w/h) (Abb. 18). Die Probenebene liegt direkt über dem 1 mm-starken Objektträger. Die hydraulischen Verbindungen werden mit Silikonschläuchen aus platinvernetztem, gering proteinbindenden Tygon 3350 3,2/6,4 mm (ID/AD) realisiert. Die Pumpenschläuche bestehen aus dem gleichen Material und haben einen Innendurchmesser von 2,79 mm.

Eine Fließzelle ermöglicht die Beobachtung des wachsenden Biofilms ohne die Veränderung der hydraulischen Bedingungen. Selbst für die Färbung muss das Material nicht entnommen und somit unnötigem Scherstress ausgesetzt werden. Nachteil ist, dass man durch die erforderlichen druckarmen Verhältnisse an laminare Strömungsbedingungen gebunden ist.

Die Versorgung des wachsenden aeroben Biofilms mit gelöstem Sauerstoff stellte sich als ein weiterer kritischer Punkt heraus. Damit wurde eine prozesstechnische Optimierung der Fließzellmethode für den Modellorganismus notwendig.

*Initialadhäsion*

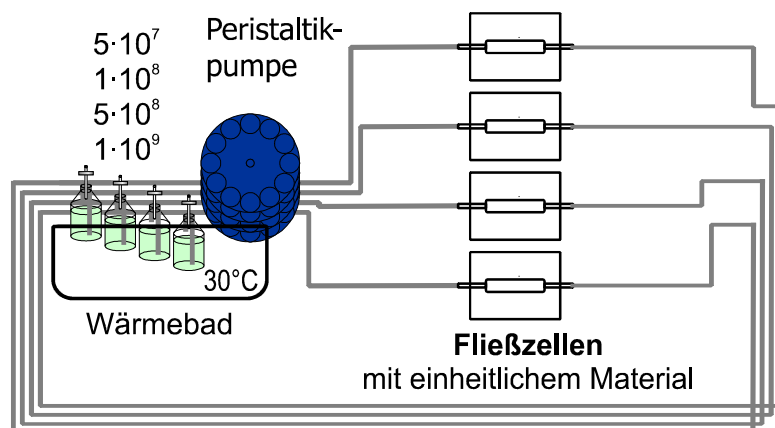
Die **Abb. 19** zeigt schematisch den Aufbau für die Messung der Initialadhäsion im zeitlichen Verlauf. Durch die Messung mit gleichen Zellkonzentrationen lassen sich verschiedene Materialien vergleichen.



**Abb. 19** - Versuchsaufbau zur Untersuchung der Initialadhäsion auf planarer Geometrie (Folie oder Platte)

*Exkurs - Dissoziationskonstante*

Legt man in einem System verschiedene Mikroorganismenkonzentrationen und das gleiche Material vor, kann die Dissoziationskonstante (1.4.2) und die Halbsättigungskonzentration in Anlehnung an die Michaelis-Menten-Kinetik ermittelt werden (**Abb. 20**).

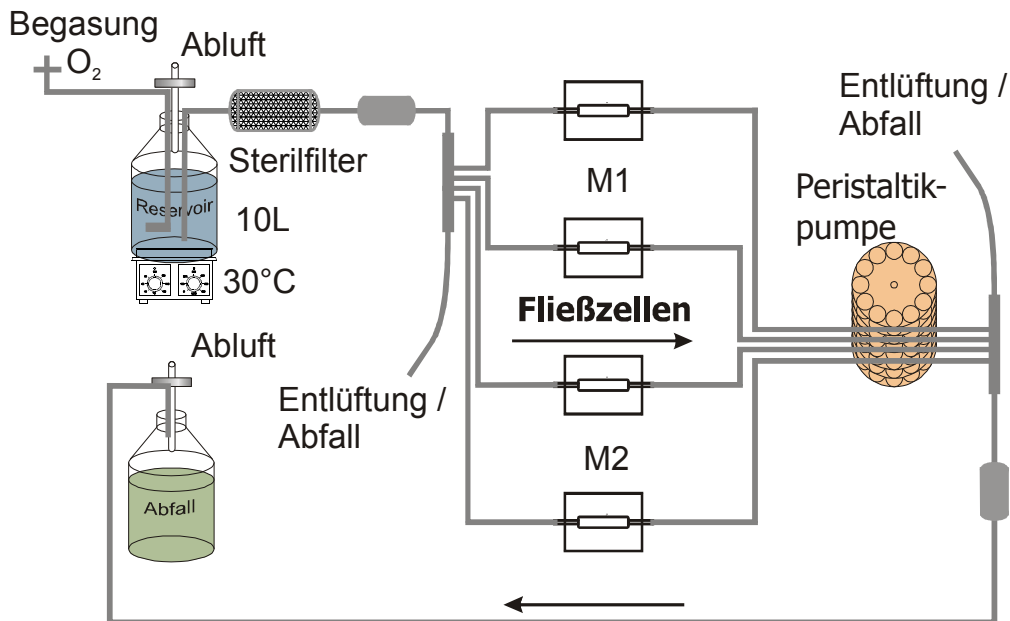


**Abb. 20** - Versuchsaufbau zur Untersuchung der Initialadhäsion mit Dissoziationskonstante auf planarer Geometrie (Folie oder Platte)

Für die Versuche zur Initialadhäsion wird die stabilisierte Zellsuspension im Kreislauf geführt. Das Medium verfügt über keine verwertbare Energiequelle (C, N, ...), womit ein Wachstum und eine Änderung der Zellkonzentration ausgeschlossen sind ( $OD_{600}$ ).

### *Für das Wachstum und die Biofilmbildung*

Für das Wachstum der Bakterien wurden die Fließzellen nach der Initialadhäsion kontinuierlich mit sauerstoffangereicherter Nährlösung gespült (Abb. 21). Das Volumen (Schläuche, Filter) vor der Fließzelle wurde so klein wie möglich gehalten.



**Abb. 21** - Versuchsaufbau zur Untersuchung des Wachstums und der Biofilmstruktur auf planarer Geometrie (Folie oder Platte)

## 2.7 Charakterisierung der bakteriellen Adhäsion

### *Allgemeines*

Die Messung der Initialadhäsion orientiert sich an den Experimenten von Gottenbos (Gottenbos, 2001). Abweichend von den dort verwendeten Methoden wurde kein Ultraschall und destilliertes Wasser zum Waschen eingesetzt, sondern wie unten beschrieben, eine Modifikation des Mineralmediums M442. Die Zellkonzentration wurde in der vorliegenden Arbeit auf  $5 \cdot 10^8$  Zellen pro ml eingestellt. Gegenüber dieser Literaturstelle variieren die Flussbedingungen aufgrund der abweichenden Geometrie der verwendeten Fließzelle. Um den Biofilm unter möglichst realistischen hydrodynamischen Bedingungen entstehen zu lassen, wurde die Flussrate so hoch wie möglich gewählt. Die Scherrate  $\sigma$  [ $s^{-1}$ ] wurde für Vergleiche mit anderen Arbeiten aus Gleichung 9 (Busscher & van der Mei, 2006) berechnen und beträgt  $41,7 s^{-1}$ .

Gleichung 9: 
$$\sigma = \frac{3Q}{2 \cdot \left(\frac{h_0}{2}\right)^2 \times w_0}$$

Dabei ist Q die volumetrische Fließgeschwindigkeit [ $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ ] und  $h_0$  und  $w_0$  beschreiben die Form des Querschnitts des Fließkanals [m].

### 2.7.1 Organismen und Medium

Als Mikroorganismen werden *Pseudomonas putida* mt2 vom DSMZ (Braunschweig) benutzt. Die Kultur erfolgte in Anlehnung an das vom DSMZ empfohlene Mineralmedium M442 mit Toluol. Die genaue Zusammensetzung ist im Teil 2.3 beschrieben.

#### *Kultur und Ernte*

- Die Zellen werden in 3 Kolben mit jeweils 150 ml Medium 4 Tage kultiviert (75  $\mu\text{l}$  Toluolzugabe am ersten und vorletzten Tag).
- Kontrolle der Zell und Proteindichte ( $\text{OD}_{600}$ ,  $\text{Abs}_{260}$ ).
- Die Kultur wird in einer Kühlzentrifuge bei 2500xg (6700UPM) für 5min, 10°C zentrifugiert. Der Überstand wird separat gesammelt und zur Kontrolle vermessen ( $\text{OD}_{600}$ ,  $\text{Abs}_{400}$ ,  $\text{Abs}_{260}$ ).

#### *Waschen*

- Das Pellet wird mit sterilem Puffer (M442 ohne C-Quelle) zweimal gewaschen.
- Nach dem Waschschrift wird das Pellet in 150 ml Puffer aufgenommen und gut resuspendiert.

#### *Stammlösung*

- Die Zentrifugenröhrchen werden einmal mit Puffer gespült und diese Suspension zu der Zellsuspension gegeben (insgesamt 300 ml).  $\text{OD}_{600}$ ,  $\text{Abs}_{260}$  werden gemessen!

#### *Versuchsvorbereitung*

- Die Stammlösung wird benutzt, um 1500 ml Zellsuspension mit genau einzustellender Konzentration ( $5 \cdot 10^8$ ) herzustellen. Das Verdünnungsmedium ist auf 30°C vorgewärmt.
- Die 8 Fließzellen werden mit 4 Materialien bestückt (Bsp.: 1,2 PP; 3,4 PET; usw.)
- Nach dem Anschluss der Flasche mit der Zellsuspension wird der komplette Aufbau geflutet und gründlich von Luftblasen befreit. (Pumpgeschwindigkeit 6,25 ml/min;  $10,4 \cdot 10^{-3} \text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ )

- Für die Phasenkontrastmikroskopie (BX50-F) wird ein spezielles Objektiv verwendet, das eine Untersuchung in der geschlossenen Fließzelle ermöglicht. Das 60x Universal C-Planfluorit-Objektiv mit großem, variablem Arbeitsabstand 1,5 bis 2,2 mm besitzt eine variable Deckglaskorrektur 0,1 bis 1,3 mm mittels semifokusfreier Korrekturfassung. Das Phasenkontrastobjektiv hat eine numerische Apertur von 0,7.
- Das Einschalten der Pumpe bezeichnet den Startzeitpunkt.

### Messung

- Von jeder Fließzelle (1-8) werden zu jedem Zeitpunkt (1, 3, 5, 8, 24, 32, 48 h) zwei repräsentative Bilder der adhärenierten Bakterien (links und rechts längs des Kanals) aufgenommen (Bilder: 117,2 x 87,0  $\mu\text{m}$ ). Zwei Fließzellen enthalten jeweils die gleichen Materialien. Somit stehen 4 Messwerte pro Zeitpunkt zur Verfügung (2 Parallelkontrollen; 2 Homogenitätskontrollen).
- Nach Beendigung der Messung werden 3 Proben aus dem Reservoir entnommen und abschließend mit dem UV-Vis-Spektrometer vermessen (OD600, Abs260). Hierdurch sollen Störungen der Zellkonzentration (Wachstum, Absterben) überwacht werden.

### Auswertung

- Die Auszählung der Bakterien erfolgt mit dem Programm AnalySIS von Olympus. Die ausgezählten Bakterien pro Bild wurden für das 60x Objektiv mit dem entsprechenden Faktor multipliziert, um die Anzahl der Zellen  $\cdot\text{cm}^{-1}$  zu erhalten.

$$\text{Gleichung 10:} \quad q(t) = q_{\max} \cdot (1 - e^{-\beta \cdot t})$$

- Die flächenbezogene Zelldichte  $q$  [ $\text{cm}^{-2}$ ] wird über der Zeit aufgetragen und eine exponentielle Regression (Gleichung 10) verwendet, um die benötigten kinetischen Parameter ( $q_{\max}$ ,  $\beta$ ,  $j_0$ ) zu ermitteln.

Die Adhäsionsgeschwindigkeit  $j$  ist der Anstieg dieser Funktion im Zeitpunkt  $t$  und kann aus der ersten Ableitung nach  $t$  (Gleichung 11) berechnet werden.

$$\text{Gleichung 11:} \quad j_t = q'(t) = \frac{\partial q(t)}{\partial t} = q_{\max} \cdot \beta \cdot e^{-\beta \cdot t}$$

Für  $t=0$ , die initiale Adhäsionsgeschwindigkeit, ist Gleichung 11 vereinfacht zu:

$$\text{Gleichung 12:} \quad j_0 = q'(0) = q_{\max} \cdot \beta$$

Die kinetischen Parameter werden mit dem Programm SigmaPlot (Systat Software) berechnet.

- Für die statistische Sicherheit wurden folgende Kontrollen durchgeführt:

Jedes Experiment wurde dreifach wiederholt.

Pro Experiment wurde eine Parallelkontrolle des eingesetzten Materials durchgeführt.

Pro Zeitpunkt und Fließzelle wurden zwei repräsentative Bilder aufgenommen und analysiert (Homogenitätskontrolle).

Die entstandenen Messwerte wurden mit dem „Students t-Test“ ausgewertet.

## 2.8 Biofilmwachstum und Wachstumssimulation

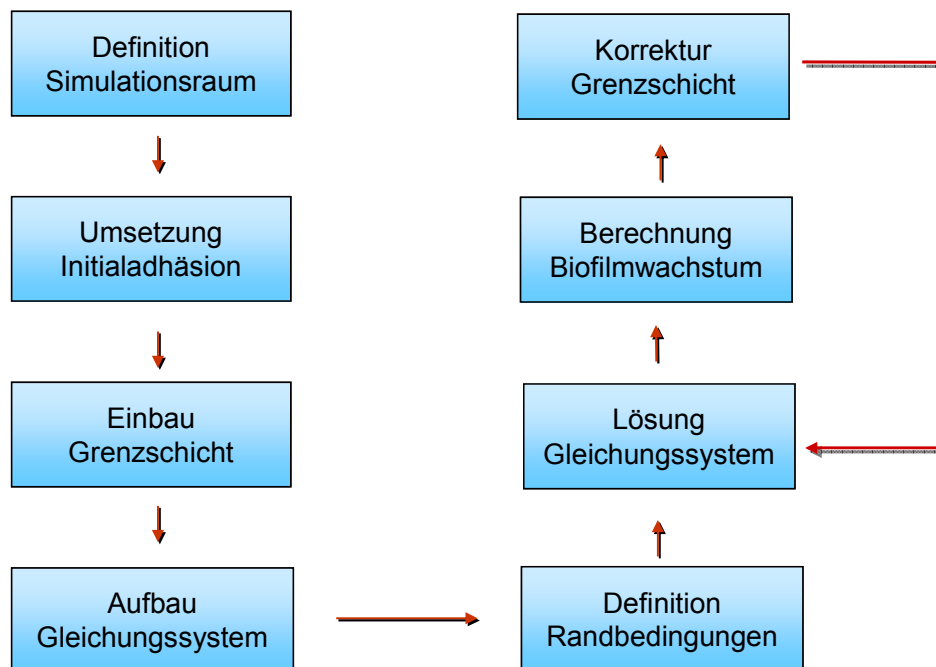
Der Wachstumsversuch eines aeroben Biofilms gestaltet sich in der Fließzelle äußerst schwierig. Da keine Begasung der Fließzellen möglich ist, muss die Konzentration des gelösten Sauerstoffs, bestimmt durch die Temperatur und den Partialdruck, in der Medium-Vorlageflasche ausreichen, um den Biofilm in der Fließzelle wachsen zu lassen.

Es ist jedoch wichtig die Lücke in der Biofilmentwicklung zwischen Initialadhäsion und maturiertem, produktivem Biofilm zu schließen. Um schnell Zugang zum Wachstumsprozess zu bekommen, wurde eine numerische Simulation verwendet. Der Aufbau der Algorithmen sowie die Umsetzung in eine Software erfolgte in Anlehnung an publizierte Methoden, wie sie schon in den Arbeiten von Christian Piciooreanu ([Piciooreanu et al., 1998](#); [Piciooreanu et al., 2000](#); [Piciooreanu et al., 2004](#)) erfolgreich eingesetzt wurden.

Die Startbedingungen der Simulation waren identisch mit den Startbedingungen des Wachstumsexperiments. Ausgangspunkt für die Bildung eines Biofilms ist stets die Adhäsion von Organismen auf einer Oberfläche, welche durch die nicht-kovalenten Interaktionsenergien zwischen Organismus und Oberfläche bestimmt wird. Damit ist durch die Initialadhäsion die wesentliche Anfangsbedingung für eine numerische Simulation gegeben. Sie ist in Form einer Zellmenge pro Fläche ( $q_{\max}$  auf dem entsprechenden Materials) definiert. Dieser Wert wurde aus den experimentell ermittelten Daten für eine hydrophobe (PP) und eine hydrophile (B33) Oberfläche entnommen. Die weitere Entwicklung des Biofilms ist diffusionsgesteuert. Das heißt die

benötigten Nährstoffe können lediglich infolge dieses Transportmechanismus an die Zellen herangetragen werden (keine Konvektion). Numerisch erfolgt dieser Vorgang durch das Lösen einer Diffusionsgleichung für den "nicht strömenden Bereich" oberhalb des Biofilms (CBL, Concentration Boundary Layer) sowie einer Diffusions-Reaktionsgleichung im Biofilm selbst auf Basis der Finite Differenzen Methode (FDM) (Picioeanu *et al.*, 2000). Die Kinetik des Biofilmwachstums kann mittels der Methode der zellulären Automaten (CA) simuliert werden und ist streng an experimentell gewonnene Parameter gekoppelt (Reproduktionszeit, Nährstoffverbrauch,... siehe 2.3 Zellkultur).

Das Ergebnis der Simulation ist ein Gittermodell, das sich direkt mit der 3D-Rekonstruktion der CLSM Ergebnisse vergleichen lässt.



**Abb. 22** - Umsetzung des numerischen Modells

Die Umsetzung des numerischen Modells in eine Software mit Ein- und Ausgabe-schnittstellen erfolgte im Rahmen einer modularen Systemarchitektur (Abb. 22) und ist im iba Heiligenstadt verfügbar.



## 2.9 HPLC

### *Probenentnahme und Vorbereitung für die HPLC*

In 4 Eppendorf-Reaktionsgefäße (2 ml) wird 1 ml Acetonitril vorgelegt.

Zur Zeit der Probenentnahme werden aus jedem Kolben oder jeder Säule 1 ml Medium zu 1 ml Acetonitril gegeben, gemischt und bei 10'000 UPM (8000xg) in einer Tischzentrifuge 5 min zentrifugiert. Vom Überstand wird 1,5 ml in ein mit Teflon-Septum verschlossenes HPLC-Vial gefüllt und verschlossen und kühl gelagert.

### *HPLC - Gerät*

Entgaser:	Jasco DG-1580-53	Autosampler:	Jasco 851-AS
Mischer:	Jasco LG1580-02	Säulenofen:	Jasco JetstreamerPlus
Pumpe:	Jasco PU-1580	Detektor:	Jasco MD-2010plus
Säule:	Lichrospher 100 RP-18 5 µm 250 x 4mm von Merck		

Wasser und Acetonitril für die HPLC wurden von der Firma AppliChem GmbH bezogen.

500 ml Wasser wurde mit 1ml Phosphorsäure 85% angesäuert (pH 2,2), um Benzoessäure zu protonieren (pH 2,2).

### *HPLC - Untersuchung (Laufbedingungen)*

isokratisch

Pufferverhältnis: 35/65 (Acetonitril/Wasser)

pH 2,2 (2ml 80% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> pro Liter)

Flussrate: 1,5 ml/min

Temperatur des Säulenofens: 40°C

Detektor: 215nm; 0,32 PMT

Laufzeit: 17 min

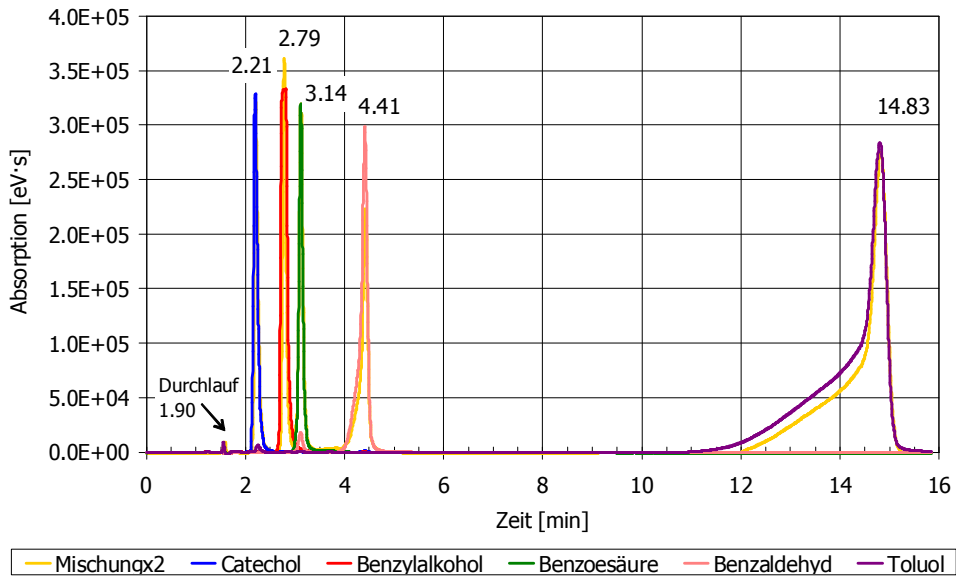
Probenentnahme: 18 min

Proben Volumen: 20 µl

Die Säule wird mindestens 1h vorgeheizt und mit den Laufbedingungen gespült.

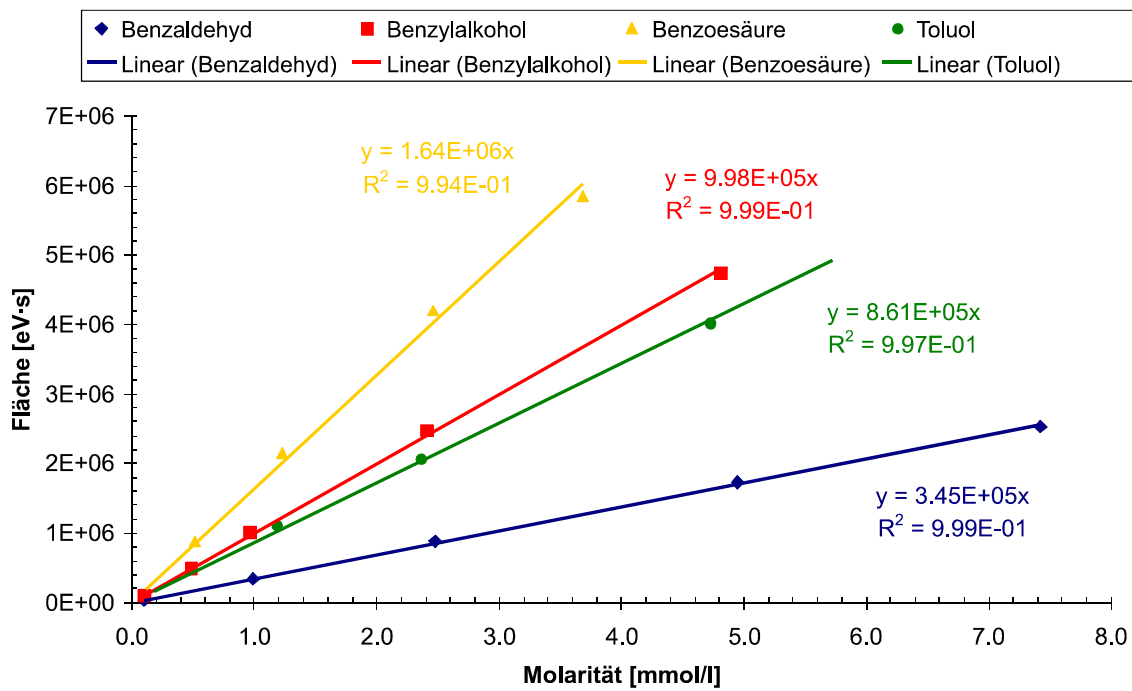
Als Spülmittel für den Autosampler werden 50/50 Acetonitril/Wasser pH 7 benutzt.

Dieses Flussmittel wird auch zum finalen Spülen und zur Konservierung der Säule benutzt. Die Laufbedingungen wurden für optimale Retentionszeiten von Toluol und dessen Metabolite entwickelt (Abb. 23).



**Abb. 23** - HPLC-Chromatogramm mit Retentionszeiten der Einzelkomponenten und der Stoffmischung

*HPLC – Kalibrierung / Auswertung*

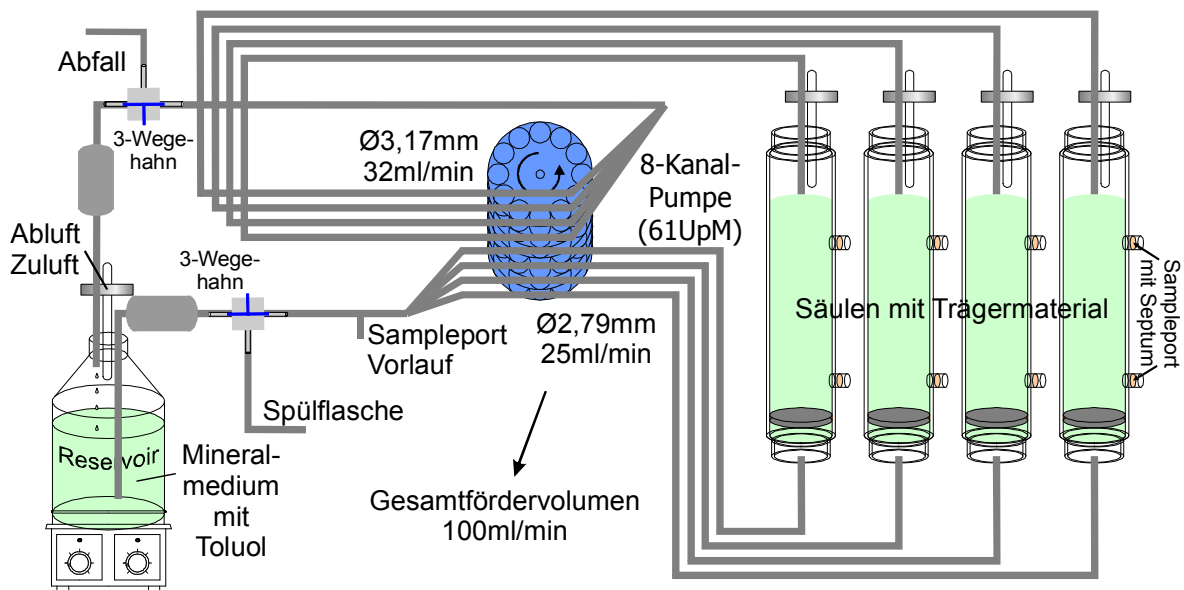


**Abb. 24** - Kalibriergeraden für Toluol und die vier wichtigsten Metabolite

Die HPLC-Chromatogramme werden mit der geräteinternen Software von Jasco ausgewertet. Dabei wird die Grundlinie, der Beginn und das Ende eines Peaks mit einem Algorithmus festgelegt und die dazugehörige Fläche berechnet. Die Fläche ist direkt proportional zur Stoffmenge. Mit einer Kalibrierung kann der molare Extinktionskoeffizient für jede Substanz ermittelt werden (Abb. 24).

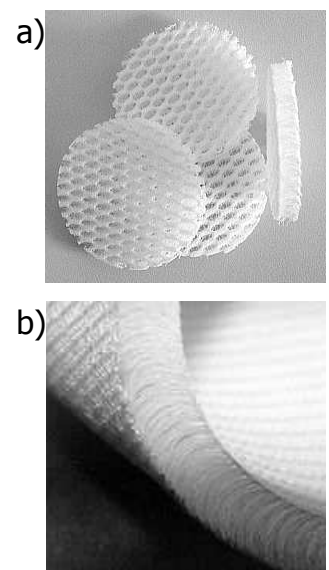
## 2.10 Labor-Säulen-Bioreaktor

Als Übergangsform zwischen den Untersuchungen in der Fließzelle an Folien und dem Demonstrator wurde ein Labor-Säulen-Bioreaktor (0,21) zur Wachstums- und Abbauanalyse eingesetzt. Der Aufbau wurde den speziellen Versuchsbedingungen angepasst (Abb. 25). Der Strom innerhalb der Säule wird gegen die Schwerkraft (aufsteigend) geführt, um ein Verblocken durch abgelöste sedimentierende Teile des Biofilms zu vermeiden. Die Probenentnahme ist an drei strategischen Positionen realisiert. Die erste Probe kann direkt vor der Aufteilung des Vorlaufs entnommen werden.



**Abb. 25** - Flussschema am Labor-Säulen-Bioreaktor

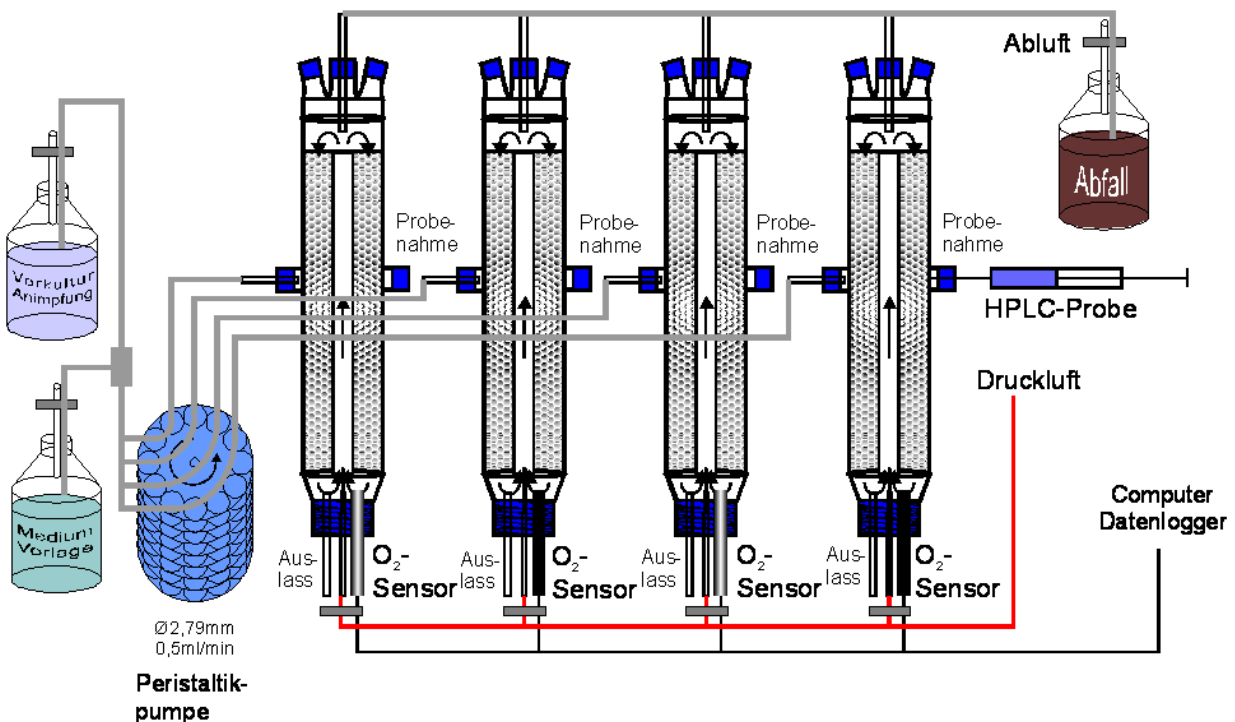
Der Fluss wird laminar durch eine Peristaltikpumpe (Ismatec IPC-N) angetrieben. Der Vorlauf ist hierbei mit einem kleineren Transportvolumen als der Rücklauf bemessen, sodass zusätzlich sterile Luft aus jeder Säule angesaugt und in der Sammelflasche eingeblasen wird. Damit wird das Medium mit Luftsauerstoff angereichert und gleichzeitig der Füllstand auf dem maximalen Level gehalten. Probenentnahmestellen (Sampleports) im Vorlauf und an den Säulen ermöglichen die Probenentnahme für die HPLC. Die an der Säulenseite angebrachten Ports ermöglichen die Entnahme auf einem Reaktionsweg von 10 cm entlang des Reaktionsweges über das Festbett. Die Säulen wurden mit dem dreidimensionalen Textilträger als Festbett in verschiedenen Ausrichtungen (Abb. 26) betrieben.



**Abb. 26** - 3D-Textilien

## 2.11 Demonstrator (Aufbau)

Als praxisnahes Modell wurde der Demonstrator (1,0 l) entwickelt. In die Konstruktion flossen die Erkenntnisse aus den Versuchen mit dem Labor-Säulen-Bioreaktor und den Fließzellen ein. Als einer der wichtigsten Aspekte stellte sich hierbei die Sauerstoffversorgung des immobilisierten Biofilms heraus. Als aerober Bioreaktor mit hoher Leistung wird in der Abwasserreinigung gelegentlich das Wirbelbett-Verfahren eingesetzt. Für die textilen Träger ist es aus mechanischen Gründen ungeeignet. Eine der frühesten Festbett-Anwendungen, besonders in der Abwasserbehandlung, ist der Rieselbett-Reaktor. Das Rieselbettverfahren wurde, im Hinblick auf die Erfordernisse dieser Arbeit, als bevorzugtes System für eine Abluftreinigung eingestuft, da der abzubauenen Schadstoff sich optimal im rieselnden Wasser lösen kann und durch den Biofilm abgebaut wird. Beim Einsatz des Schadstoffes in der wässrigen Phase ist ein Austreiben des flüchtigen Schadstoffes zu erwarten.



**Abb. 27** - Fließschema mit vier parallel betriebenen Airliftreaktoren

Bei der Verfahrensweise mit getauchtem Festbett, wie beim Labor-Säulen-Bioreaktor, kann nicht ausreichend Sauerstoff eingetragen werden. Deshalb wurde eine Begasungszone in die Konstruktion des Demonstrators eingebracht, die getrennt vom Festbettbereich betrieben wird. Die aufsteigende Luft erzeugt eine Zwangskonvektion, wie bei einem Airliftreaktor und treibt somit gleichzeitig den Fluss über das Festbett an.

Somit ist der entstandene Reaktortyp ein Hybrid zwischen Airlift-Reaktor und Biofilter (Abb. 27).

Das System arbeitet mit vier parallel angeordneten Reaktorsäulen. Die Demonstrator-Säulen werden durch eine Ismatec MCP Pumpe beschickt. Auch diese Säulen regulieren ihren Füllstand automatisch, da Abluft und Abwasser über einen Ausgang realisiert sind und der Kopfbereich luftdicht verschlossen ist. Generell wurde auch dieses Experiment so konzipiert, dass der komplette Aufbau autoklaviert und von außen steril abgeschlossen betrieben werden kann.

Als Sauerstoffsensoren wurden kurze, gewinkelte 12 mm (Durchmesser) Clarkzell-Elektroden (InPro 6800 G) der Firma Mettler-Toledo eingesetzt. Die Elektroden wurden vor dem Versuch mit Stickstoff- (0%) beziehungsweise luftsauerstoffgesättigtem (100%) Medium kalibriert. Während des Versuches erfolgte eine Nachkalibrierung des 100%-Wertes bei verbrauchter C-Quelle.

### 2.11.1 Festbetteinbauten

Im Demonstrator wurden die Abstandsgewirke (Abb. 26) (PET, PET+TG, PP) um eine 2 cm (Außendurchmesser) dicke, dünnwandige PE Röhre gewickelt, durch die die Begasung und der aufsteigende Strom (riser) realisiert wurde. Die Abstandsgewirke im Mantel wurden quer zu den Polfäden im abfallenden Strom (down comer) durchströmt.

Polyamid 6 und die modifizierte Variante dieses Materials wurden in Form eines Effektgarns gefertigt. Um aus der Eindimensionalität des Garns gut durchströmbar angeordnete Flächen zu gestalten, wurde ein Spulkörper mit einer Höhe von 30 cm gefertigt (Abb. 28). Durch die Anordnung der Wickelebenen ( $20^\circ$  zum aufsteigenden Rohr) wird der abfallende Strom durch fünf Flächen des PA6-Effektgarns gezwungen.



**Abb. 28** - Reaktoreinbau zum Aufwickeln von PA6-Effektgarn

### 2.12 Demonstrator (Versuche)

Der Versuch wird vorbereitet, indem der sterilisierte Aufbau mit einer Vorkultur geflutet und mit Medium aufgefüllt wird. Die Begasung erfolgt über Druckluft, die vor dem Einlass sterilfiltriert wird. Nach 24 Stunden wird eine kontinuierliche Mediumzufuhr zugeschaltet. Als Nährmedium wird das oben beschriebene Medium M442 mit  $1 \text{ ml} \cdot \text{l}^{-1}$  Benzylalkohol verwendet. Die Förderrate beträgt 2 ml pro Minute. Neben diesem Zulauf an frischem Medium wird täglich 1 ml Benzylalkohol direkt in den Bioreaktor injiziert. Um die als Biofilm wachsenden Bakterien zu begünstigen wird alle 3 Tage das Medium komplett abgelassen und mit frischem Medium aufgefüllt und somit die submers gewachsenen Zellen ausgewaschen. Nach zwei Wochen ist der Bioreaktor in einem Gleichgewichtszustand, der reproduzierbare Abbauprobungen ermöglicht.

Zu Versuchsbeginn wird das Medium abgelassen und der Biofilmträger mit einer Säulenfüllung frischem Medium gespült. Nach dem zweiten Ablassen werden die Säulen bis zum maximalen Füllstand befüllt. Der Demonstrator-Versuch wird als Batchprozess durchgeführt. Das heißt, es wird im Verlauf des Experiments kein Medium zugeführt. Es wird sofort (Zeitpunkt 0) eine HPLC-Probe am Probenport genommen und präpariert (2.9 - Probenentnahme und Vorbereitung für die HPLC). Weitere Proben werden jede Stunde genommen. Die Proben werden analysiert und der CSB der Einzelkomponenten wird summiert. Die Abnahme der Schadstoffkonzentration (Abbauleistung) wird auf die Oberfläche des jeweils eingesetzten Trägers bezogen.

### 3 Ergebnisse und Diskussionen

#### 3.1 Beschichtungen und Beständigkeit

Beschichtungen sowie Grundmaterialien wurden mit Hilfe der physiko-chemischen Charakterisierung auf ihre Beständigkeit überprüft (Tabelle 3). Dabei zeigten PP, PET, und B33 als unbeschichtete Materialien ein hohes Maß an Stabilität. Die auf PA6 gemessenen Kontaktwinkel unterlagen gewissen Abweichungen, die durch die vom Polymer mehr oder weniger aufgenommene Feuchtigkeit begründet sein kann. Auch Alterungsprozesse des Materials (oxidativ, photooxidativ) können zu einer leichten Veränderung der physiko-chemischen Eigenschaften geführt haben. (1.6.2 - Polymere in der Textiltechnologie)

Die Wirkung von Plasmabehandlungen auf Polymeren ist in der Literatur gut beschrieben und konnte an den modifizierten Proben (Diener-PLASMA GmbH & Co. KG) bestätigt werden. Im Einzelnen führte die Plasmabehandlungen bei geringer Wirkungsdauer oder Leistung erwartungsgemäß kaum zu Veränderungen in Bezug auf das Grundmaterial. Bei stärkerem Einfluss des Plasmas wurde die Oberfläche stark angegriffen, was einerseits zu der gewünschten Veränderung der Oberflächenspannung aber gleichzeitig auch zu einer Erhöhung der Rauigkeit führte. Der Effekt auf die Topographie scheint ebenfalls in gewissem Maß in der Tiefe des Materials zu wirken. Bei der Sterilisierung der Proben kam es häufig zu einem teilweisen Zusammenbruch oder einer Ablösung der porösen Schicht, was zu einer Erhöhung der Rauigkeit führt. Die plasmamodifizierten Oberflächen zeigten keine permanenten und keine reproduzierbaren Eigenschaften und sind damit für weitere Versuche als ungeeignet bewertet worden.

Die Textilhilfsmittel EvoSoft und EvoFin zeigen ebenfalls keine gute Beständigkeit. Vom Hersteller sind Pflegehinweise von 60°C beziehungsweise 40°C angegeben. Eine thermische Sterilisation ist jedoch für die mikrobiologischen Experimente unumgänglich. Diese Beschichtungen schieden darauf hin ebenfalls aus. Auch die Pyrosilbeschichtung lässt sich durch kräftiges Spülen mit Wasser entfernen und ist damit für die Applikation ungeeignet.

Vielversprechende Ergebnisse zeigten die nass-chemischen Behandlungen mit Oleophobol und Tubiguard. Da jedoch die 5% Oleophobolbeschichtung eine Oberflächenspannung ähnlich der von PP oder B33+TP zeigt, wurde auch diese von den weiteren Versuchen ausgeschlossen. Tubiguard als stark hydrophobe Oberflächenbeschichtung bewirkte eine stabile Modifikation der Oberflächeneigenschaften.

**Tabelle 3a** - Übersicht der Beschichtungsverfahren und ihrer Beständigkeit nach 3-facher Autoklavierung (**Rote Kästchen markieren Ausschlusskriterien.**)

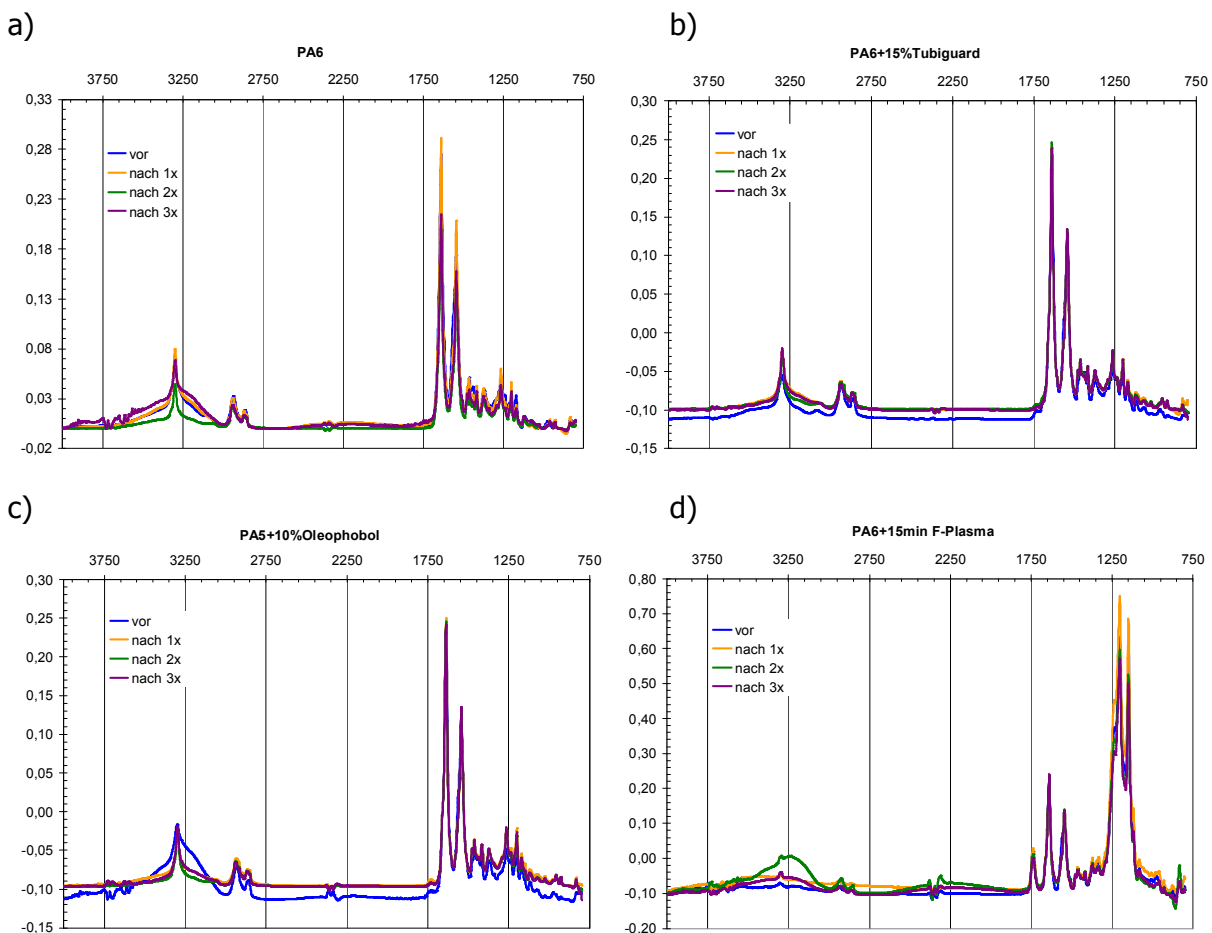
Verfügbarkeit	Methode:	H <sub>2</sub> O-KW° (polare Flüssigkeit)				DIM KW° (disperse Flüssigkeit)				AFM Rauigkeit				ATR-FTRI		Oberfläche geeignet?																		
		Material				Material				Material				Material																				
Anzahl	Probenbezeichnung	1	2	3	4	SA	1	2	3	4	SA	1	2	3	4	SA	1	2	3	4	SA	1	2	3	4	Grundmaterial	Auto-klavier-schritt							
Typ	Probenbezeichnung	(nativ)	(1xakt.)	(2xakt.)	(3xakt.)	(1-4)	(nativ)	(1xakt.)	(2xakt.)	(3xakt.)	(1-4)	(nativ)	(1xakt.)	(2xakt.)	(3xakt.)	(1-4)	(nativ)	(1xakt.)	(2xakt.)	(3xakt.)	(1-4)	(nativ)	(1xakt.)	(2xakt.)	(3xakt.)	(1-4)	(nativ)	(1xakt.)	(2xakt.)	(3xakt.)	(1-4)			
ab 01.08.2008	0 B33 Glas	<5°	20°	19°	22°	±8°	36°	32°	42°	36°	±4°	1	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein		
	1 PA6 innen	47°	52°	52°	49°	±2°	49°	49°	32°	42°	±8°	23	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein		
4	2 PA6 außen	68°	62°	54°	46°	±10°	33°	45°	32°	36°	±6°	23	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein		
	3 PP innen	106°	102°	101°	103°	±2°	69°	63°	60°	66°	±4°	5	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein		
	4 PP außen	105°	103°	102°	100°	±2°	68°	64°	54°	60°	±6°	5	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
ab 16.10.2008	versch. Varianten Plasmabehandlung																																	
	5 V7PPa 5min	87°	87°	96°	104°	±8°	53°	59°	51°	57°	±4°	8	✓	ja	✓	nein	✓	ja	✓	nein	✓	ja	✓	nein	✓	ja	✓	nein	✓	ja	✓	nein	✓	ja
	7 V1PPa 3sek	90°	95°	95°	97°	±3°	62°	64°	56°	62°	±3°	7	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
5	9 V8PP 60min	103°	117°	110°	98°	±8°	97°	93°	100°	96°	±3°	11	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	10 V11PPa 5min	103°	117°	105°	111°	±6°	97°	93°	90°	99°	±4°	53	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	12 V10PP 15min	114°	111°	118°	115°	±3°	101°	102°	103°	100°	±1°	20	✓	ja	✓	nein	✓	ja	✓	nein	✓	ja	✓	nein	✓	ja	✓	nein	✓	ja	✓	nein	✓	ja
	13 V2PA6a 60sek	79°	65°	56°	60°	±10°	48°	40°	49°	46°	±4°	22	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	15 V3PA6a 6sek	64°	73°	73°	64°	±5°	44°	49°	47°	43°	±3°	20	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	17 V5PA6a 2h	84°	83°	84°	86°	±1°	15°	32°	34°	42°	±11°	14	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
7	19 V8PA6 60min	93°	92°	92°	94°	±1°	87°	91°	81°	90°	±4°	37	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	20 V11PA6 5min	119°	102°	88°	78°	±18°	102°	104°	97°	83°	±9°	13	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	21 V10PA6 15min	133°	117°	119°	119°	±7°	106°	115°	103°	101°	±6°	17	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	22 V9PA6 30min	138°	116°	129°	120°	±10°	103°	102°	102°	110°	±4°	60	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	PG2																																	
ab 12.11.2008	versch. Varianten																																	
	PA6+																																	
	Hydrophil.	61°	93°	68°	52°	±18°	41°	52°	40°	45°	±6°	19	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	Fouillard	64°	90°	83°	62°	±13°	36°	38°	33°	37°	±2°	23	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein
	Polyester	59°	93°	76°	70°	±14°	38°	46°	38°	30°	±7°	21	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein	✓	nein



**Tabelle 3b** - Übersicht der Beschichtungsverfahren und ihrer Beständigkeit nach 3-facher Autoklavierung (**Rote Kästchen markieren Ausschlusskriterien.**)

<b>PA6+</b>	26	HM+2%EvoSoft	61°	85°	81°	69°	±11°	46°	52°	56°	41°	±7°	17	18	22	23	±3	nein	X
<b>Hydrophil.</b>	27	HM+4%EvoSoft	77°	94°	91°	72°	±10°	68°	67°	66°	46°	±10°	18	21	19	20	±1	nein	X
<b>Fouillard</b>	28	HM+6%EvoSoft	79°	88°	90°	83°	±5°	67°	68°	66°	43°	±12°	16	16	19	20	±2	nein	X
<b>Polysiloxan</b>	29	HM+8%EvoSoft	77°	88°	84°	84°	±4°	54°	61°	69°	51°	±8°	18	21	19	21	±1	nein	✓
	30	HM+0%Oleoph.	75°	86°	79°	65°	±8°	46°	51°	50°	45°	±3°	22	20	19	20	±1	nein	NK
<b>PA6+</b>	31	HM+0,5%Oleoph.	82°	80°	93°	79°	±7°	59°	55°	70°	50°	±9°	21	20	18	21	±1	nein	✓
<b>Hydrophob.</b>	32	HM+1%Oleoph.	88°	121°	86°	116°	±18°	71°	89°	79°	79°	±8°	16	19	21	20	±2	nein	X
<b>Fouillard</b>	33	HM+1,5%Oleoph.	80°	92°	82°	76°	±7°	58°	56°	68°	49°	±8°	18	23	20	23	±2	nein	✓
<b>Fluorpolymer</b>	34	HM+3%Oleoph.	91°	95°	98°	95°	±3°	62°	68°	64°	50°	±8°	18	19	21	21	±1	nein	✓
	35	HM+4,5%Oleoph.	101°	95°	95°	89°	±5°	60°	66°	62°	63°	±3°	18	18	19	22	±2	nein	✓
<b>PG3</b>																			
<b>ab 30.01.2009</b>		(Bulk: PA6)																	
<b>PA6+</b>	36	15% Tubigard	115°	121°	112°	121°	±5°	91°	95°	99°	83°	±7°	✓				✓	nein	✓
<b>Fluorpolymer</b>	37	15% Tubigard	121°	116°	118°	116°	±2°	100°	99°	85°	92°	±7°	✓				✓	nein	✓
	38	0% Oleophobol	65°	73°	74°	62°	±6°	42°	31°	31°	29°	±6°	✓				✓	nein	NK
	39	5% Oleophobol	105°	118°	117°	105°	±7°	85°	84°	79°	67°	±8°	✓				✓	nein	✓
<b>PA6+</b>	40	10% Oleophobol	114°	114°	106°	112°	±4°	89°	79°	69°	77°	±8°	✓				✓	nein	✓
<b>Fluorpolymer</b>	41	0% Oleophobol	74°	68°	67°	60°	±6°	34°	44°	39°	38°	±4°	✓				✓	nein	NK
<b>Schaum</b>	42	0% Oleophobol	74°	70°	74°	60°	±6°	38°	46°	34°	32°	±6°	✓				✓	nein	NK
	43	5% Oleophobol	108°	116°	92°	99°	±11°	69°	73°	65°	55°	±8°	21	20	±1	✓	nein	X	
	44	5% Oleophobol	100°	105°	98°	101°	±3°	60°	71°	52°	69°	±9°	✓				✓	nein	✓
	45	10% Oleophobol	100°	105°	92°	86°	±8°	62°	69°	76°	45°	±13°	✓				✓	nein	X
	46	10% Oleophobol	96°	100°	88°	77°	±10°	56°	62°	43°	49°	±8°	✓				✓	nein	X
<b>PG4</b>																			
<b>ab 11.03.09</b>	47	PP-pyrosiliert	61°	80°	81°	88°	±11°	47°	44°	51°	43°	±4°	-				-	-	X
<b>Silikatasche</b>	48	Rückseite	85°	69°	69°	75°	±8°	60°	59°	53°	57°	±3°	-				-	-	X
<b>PG5</b>																			
<b>ab 13.05.09</b>	49	PET 23µm	82°	82°	77°	86°	±4°	30°	27°	35°	42°	±6°	4	✓			✓	nein	✓
<b>Grundmaterial</b>	50	PET 36µm	83°	85°	78°	78°	±3°	30°	37°	33°	28°	±4°	7	✓			✓	nein	✓
<b>PG6</b>																			

Bei den nass-chemischen Beschichtungen konnte die veränderte Chemie aufgrund der geringen optischen Schichtdicken des jeweiligen Beschichtungsmittels nicht mit der ATR-FTIR-Methode nachgewiesen werden (Abb. 29a, b, c). Die Schwingungen der CF<sub>2</sub>-Bindung (z.B. 1149 WZ) gehen vermutlich im Signal des Grundmaterials unter. Bei der Plasmabehandlung wird ein stark verändertes Signal detektiert (Abb. 29 d; Skala/ Banden), das auch beim Autoklavieren stabil bleibt. Jedoch sind es hier andere Parameter, die sich während der Sterilisation stark verändern (inhomogene Rauigkeiten und Kontaktwinkel), und die damit eine Verwendung dieser Modifikation ausschließen.



**Abb. 29** - Beispielhafte FTIR-Spektren vor und nach Autoklavierung; a)PA6; b)PA6+TG; c)PA6+Ole; d) plasmabehandeltes PA6

Aus den Screening-Experimenten zur Beständigkeit konnten sieben Oberflächen für weitere, intensivere Experimente bestimmt werden. Dazu zählen drei textiltechnologisch relevante Grundmaterialien (PP, PA6, PET) und eine Modifikationen auf zwei Polymeren (PA6+Tubiguard, PET+Tubiguard). Zusätzlich wurden zwei Referenzen (B33 - hydrophil, B33+Tegophob - hydrophob) in die Untersuchungen aufgenommen.

*Mikrobiologische Beständigkeit - Dauertest*

Bei der Überprüfung der mikrobiologischen Beständigkeit der Tubiguard beschichteten Polymerfolien wurden leichte Unterschiede der Wasserkontaktwinkel vor und nach dem Test festgestellt (Tabelle 4). Die Reduzierung des Wasserkontaktwinkels erfolgt für jedes der beiden Materialien um einen charakteristischen Betrag. Da dieselbe Verschiebung bei der jeweils unbeschichteten Probe vorliegt, kann davon ausgegangen werden, dass eventuell kleinere organische Rückstände (Proteine, EPS, ...) an der gereinigten Probe für die Veränderung verantwortlich sind. Diese organischen Rückstände besitzen vermutlich eine gewisse Polarität und beeinflussen damit die Hydrophilie im detektierten Sinne.

**Tabelle 4** - Beständigkeit der Beschichtung gegenüber Mikroorganismen (WKW)

	PET	PET+TG	$\Delta$	PA6	PA6+TG	$\Delta$
neu	80,1°	117,5°	37,4°	85,6°	114,9°	29,3°
7 Tage biologischer Kontakt	72,9°	111,8°	38,9°	71,3°	100,9°	29,6°
$\Delta$	-7,2°	-5,7°		-14,3°	-14,0°	

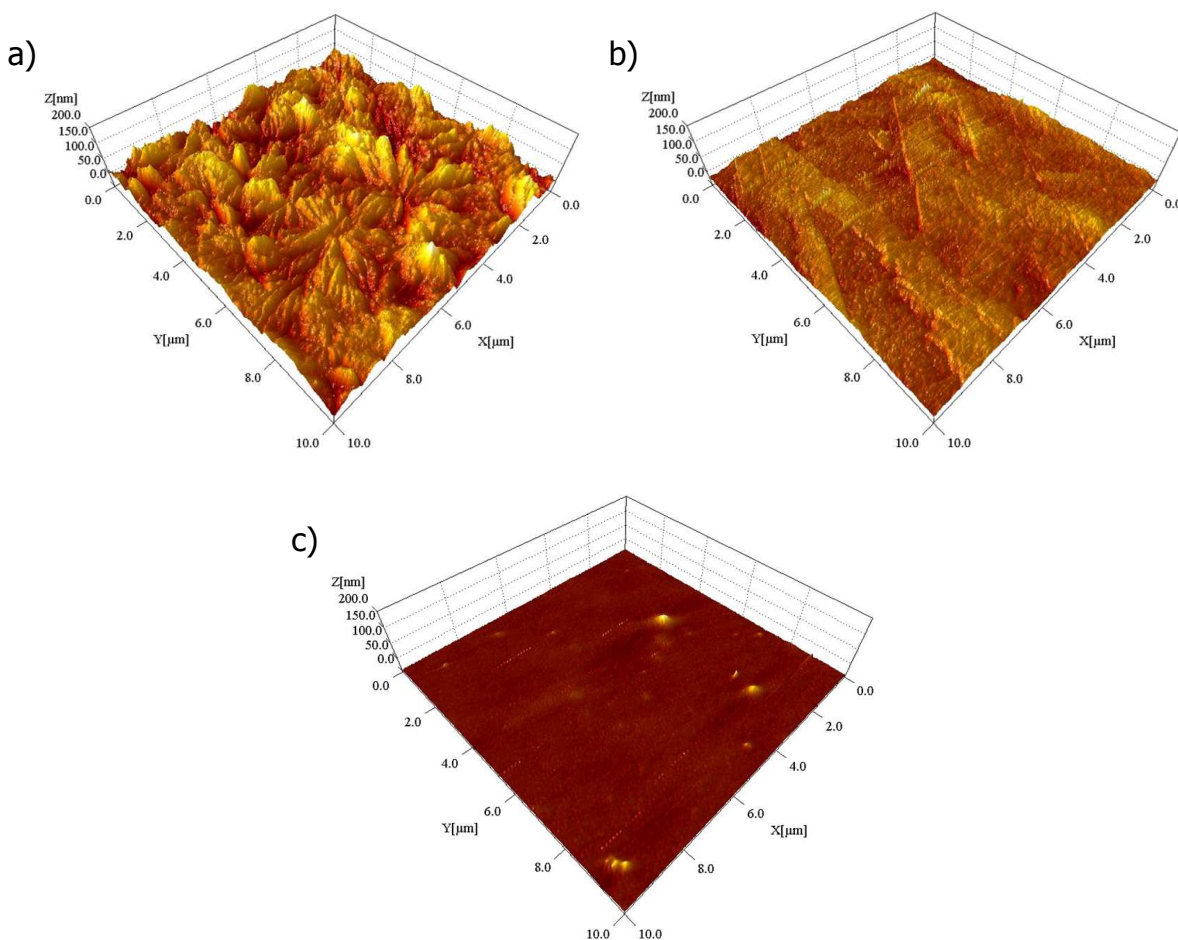
Die Differenz des Wasserkontaktwinkels zwischen beschichteter und unbeschichteter Probe blieb nach der biologischen Behandlung konstant (PET→PET+TG ~38° und PA6→PA6+TG ~29° WKW). Die Beschichtung mit Tubiguard® wird daher als äußerst stabil gegenüber mikrobiologischen Einflüssen bewertet.

## 3.2 Physiko-chemische Charakterisierung

### 3.2.1 AFM - Messungen

Die RMS-Rauigkeiten der Polymermaterialien lagen zwischen 3,9 (PET) und 23 nm (PA6) (Abb. 30). Die nasschemischen Beschichtungen (Topographie nicht abgebildet) zeigten keine signifikanten Abweichungen von den unbeschichteten Materialien.

Ein Effekt auf die Bioadhäsion wird in der Literatur im Wesentlichen bei einer Rauigkeit im Maßstab der Mikroorganismen ( $\sim 1 \mu\text{m}$ ) beschrieben (Taylor *et al.*, 1998). Kleinere Rauigkeiten (zwischen 0 und 20 nm) zeigen keinen signifikanten Einfluss auf die bakterielle Adhäsion (Li & Logan, 2004). Demzufolge kann geschlossen werden, dass die Topographie der untersuchten Polymerfolien vermutlich nur untergeordnete Bedeutung für die Wechselwirkung mit den Mikroorganismen hat.

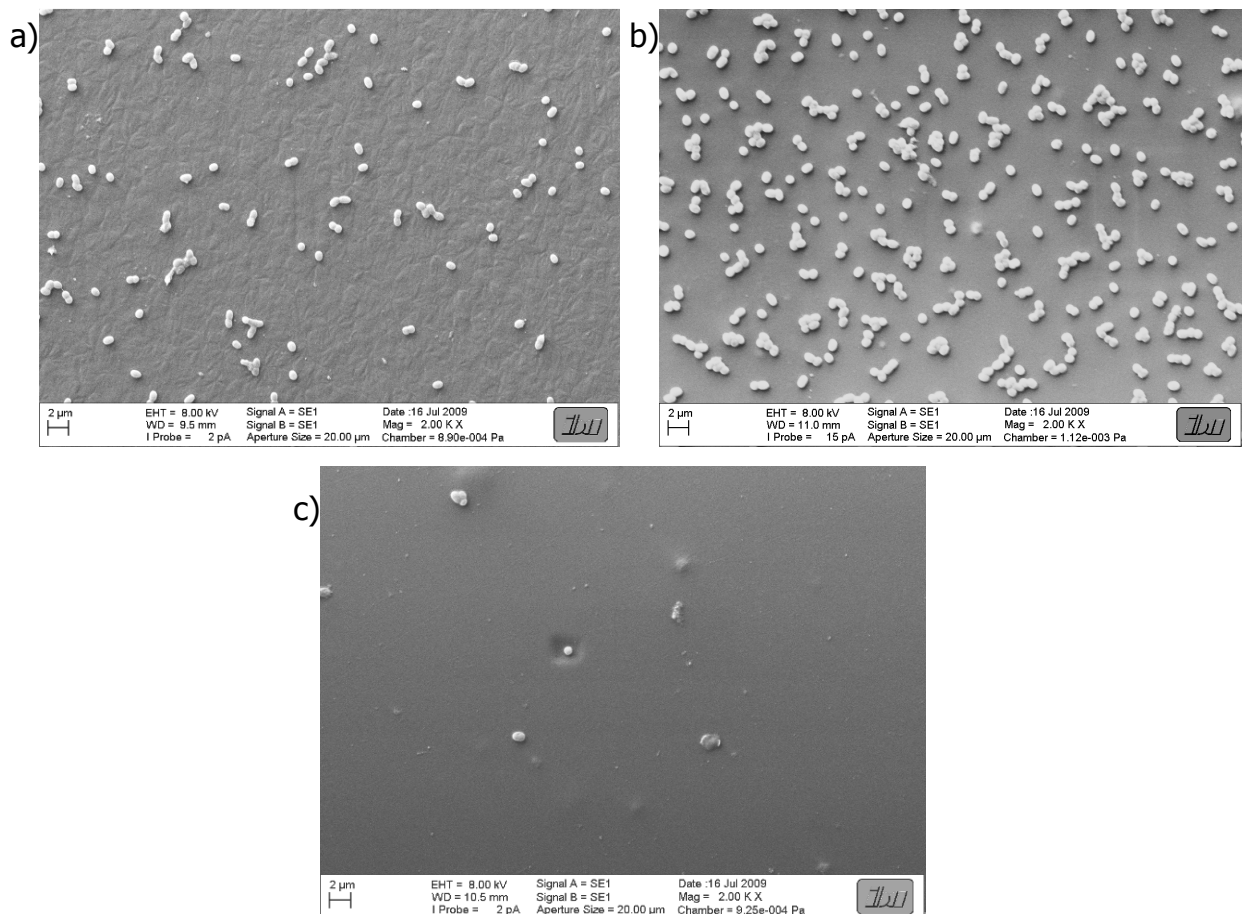


**Abb. 30** - 3D-Oberflächenprofile (Länge/Weite/Höhe =  $10 \mu\text{m}/10 \mu\text{m}/0,2 \mu\text{m}$ ) a) PA6 (RMS=23,2 nm); b) PP (RMS=4,65 nm); c) PET (RMS=3,93 nm); Die Z-Achse ist 10-fach überhöht.

### 3.2.2 REM - Aufnahmen

Die Rasterelektronenaufnahmen (Abb. 31) stützen die Aussage über die Rauigkeit und ihren Einfluss auf die Adhäsion. Während der Präparation für die Raster-Elektronen-Mikroskopie zeigte sich, dass die Mikroorganismen auf PET sehr schwach adhärirt waren. Ein Großteil der Bakterien löste sich schon durch vorsichtiges Eintauchen in die Fixierlösungen. Wohingegen bei PP mit ähnlicher Rauigkeit eine stärkere und dichtere Adhäsion beobachtet werden konnte. Bei PA6 mit der höchsten Rauigkeit kann eine mittlere Dichte adhärirter Bakterien festgestellt werden, die relativ stabil gebunden sind. Es ist also im Bezug auf die Rauigkeit kein eindeutiger Trend festzustellen.

Anzunehmen ist, dass die elektrodynamischen van der Waals Wechselwirkungen (3.2.4) und die elektrostatischen Eigenschaften der Materialien (3.2.5) die größten Anteile hinsichtlich der physiko-chemischen Wechselwirkungen darstellen.



**Abb. 31** - REM-Aufnahmen von adhärirten Zellen (nach 48h) auf a) PA6 (RMS 23,2nm), b) PP (RMS 4,65nm) und c) PET (RMS 3,93nm)

### 3.2.3 XPS - Tiefenprofil

Das aufgenommene Tiefenprofil für die Fluoratomkonzentration lässt auf eine hohe Konzentration von 35,3 At.-% (PA6) und 38,6 At.-% (PET) an der Oberfläche schließen, die dann in einer Tiefe von 2 nm auf 0% abfällt (Abb. 32). Die hohe Oberflächenkonzentration ist ein Indiz für die erfolgreiche Beschichtung mit Tubiguard. Die rasche Abnahme des Fluorsignals in der Tiefe zusammen mit der kaum veränderten RMS-Rauheit nach der Beschichtung zeigen, dass die Schichtdicke der Fluorverbindung im unteren nm – Bereich liegt. Wahrscheinlich liegt die Schicht als Monolayer des Beschichtungsmittels vor. Auf der PET-Folie konnte im Vergleich zur PA6-Folie eine geringfügig höhere Konzentration an Fluor gemessen werden.

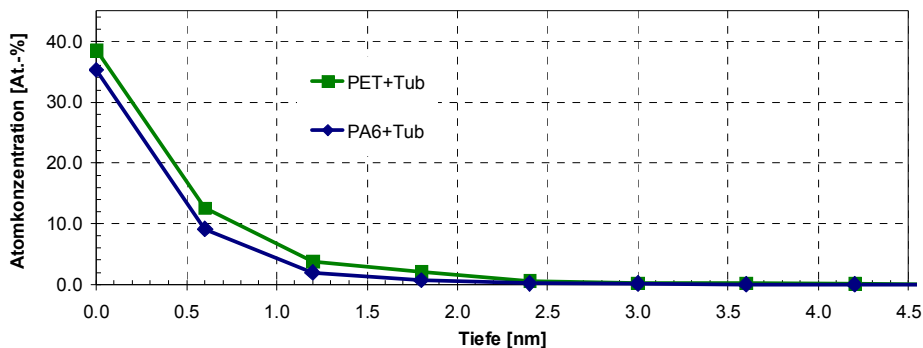


Abb. 32 - XPS-Tiefenprofil (Fluorsignal)

### 3.2.4 Kontaktwinkel und Oberflächenspannung

Glas (B33) diente bei allen Versuchen als hydrophile Referenz. Der Wasserkontaktwinkel (WKW) auf dieser Oberfläche ist nicht messbar. Die Flüssigkeit benetzt das Material durch die die starken Lewis-Säure-Basen-Wechselwirkungen vollständig. Die weiteren Oberflächen (drei polymere Substrate, zwei Fluorcarbonbeschichtungen und ein siloxanbeschichtetes Glas als hydrophobe Referenz) stellen ein nahezu gleichmäßig verteiltes Spektrum von mäßig-hydrophilen ( $80^\circ$ WKW) bis hydrophoben ( $118^\circ$ WKW) Oberflächeneigenschaften dar (Tabelle 5; Wasser). Der Wert des jeweiligen Kontaktwinkels erklärt sich aus dem Wechselspiel der quantenmechanisch bedingten Dispersionswechselwirkungen und den Elektronen-Donor bzw. -Akzeptorfunktionalitäten in Folge der Lewis-Säure-Basen-Wechselwirkungen.

Die aus allen zehn Flüssigkeiten berechnete Oberflächenspannung eröffnet ein umfassenderes Parameterfeld. Die Oberflächenspannungen, der mit Fluorverbindungen beschichteten Materialien, zeigen sehr gute Übereinstimmungen mit den Literaturwerten (Clint & Wicks, 2001).

Während der Wasserkontaktwinkel, abgesehen von Glas, einen mehr hydrophoben Bereich beschreibt, sind die Werte der Oberflächenspannung näherungsweise gleichmäßig verteilt. Dies ist darin begründet, das Wasser als polare Flüssigkeit die polaren Wechselwirkungsenergien einer Oberfläche anspricht. Die Polymerfolien haben nahezu keine polare Charakteristik. Die Oberflächenspannung hingegen ist ein Summenparameter, der die Wechselwirkungseigenschaften mit mehreren Flüssigkeiten wiedergibt.

**Tabelle 5** - Kontaktwinkel und resultierende Oberflächenspannungen der analysierten Materialien (Werte  $<5^\circ$  stehen für komplett benetzende Flüssigkeiten)

Flüssigkeit	Material / Kontaktwinkel [°]							
	B33	B33+TP	PA6	PA6+TG	PET	PET+TG	PP	P. putida
Wasser	<5,0	100,5	85,6	114,9	80,1	117,5	106,3	65,1
Glycerin	7,5	92,0	75,3	110,2	65,9	111,6	98,2	
Ethylenglycol	<5,0	86,2	61,3	101,9	55,3	99,2	79,4	46,4
Diiodmethan	35,8	76,5	48,5	90,3	27,2	97,6	72,6	50,3
DMSO	<5,0	75,8	47,0	75,5	32,2	85,4	46,0	
Bromoform	9,1	57,7	26,9	73,1	10,0	87,5	22,7	
Pyrol	<5,0	61,8	27,5	70,1	<5,0	94,9	44,0	
Brom-Naphtalen	10,7	64,1	35,0	73,0	<5,0	93,6	60,3	
Hexadecan	<5,0	32,1	56,5	63,3	<5,0	74,9	40,3	
Formamid	<5,0	91,9	20,8	95,1	59,8	106,1	93,0	57,8
Wechselwirkungsanteil	Oberflächenspannung [ $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$ ]							
dispers $\gamma_s^{\text{LW}}$	42,20	22,20	36,70	15,30	42,40	10,20	24,10	33,90
Lewis-Säure-Anteil $\gamma_s^+$	31,60	0,90	3,40	0,14	2,50	0,33	0,32	20,50
Lewis-Base-Anteil $\gamma_s^-$	0,05	0,00	0,01	0,01	0,01	0,01	0,03	0,10
polar $\gamma_s^{\text{AB}}$	2,51	0,00	0,35	0,07	0,30	0,11	0,20	2,86
relative Polarität $\gamma_s^{\text{LW}}/\gamma_s^{\text{AB}}$	5,96%	0,00%	0,95%	0,44%	0,71%	1,13%	0,81%	8,45%
Oberflächenspannung $\gamma_s$	<b>44,7</b>	<b>22,2</b>	<b>37,0</b>	<b>15,4</b>	<b>42,7</b>	<b>10,3</b>	<b>24,3</b>	<b>36,8</b>

Die Kontaktwinkel der einzelnen Flüssigkeiten auf den verschiedenen Materialien sind ein Hinweis auf die Art und Stärke der nicht-kovalenten Bindung an der Grenzfläche (siehe dazu auch [Tabelle 2](#); Abschnitt 2.2.2). Hierbei weist ein niedriger Kontaktwinkel auf eine hohe Affinität zwischen Messflüssigkeit und gemessenem Material hin.

Anhand der Wechselwirkungsanteile ([Tabelle 5](#); dispersiv, polar, sauer, basisch) wird deutlich, wie stark der Lewis-Säuren-Wechselwirkungsanteil und somit die Polarität von Glas (B33) ist. Die Gesamtpolarität dieser hydrophilen Referenz ist im Vergleich zu den Polymerfolien relativ hoch, hat aber für die totale Oberflächenspannung nur untergeordnete Bedeutung. Für die untersuchten Materialien fallen im Wesentlichen quantenmechanisch bedingte Dispersionswechselwirkungen ins Gewicht. Elektronen-donor- und Akzeptorwechselwirkungen spielen hier nur eine untergeordnete Rolle.

### 3.2.5 Zetapotential

In **Tabelle 6** sind die Ergebnisse der Analyse der Oberflächenladung zusammengefasst. Das gemessene Zetapotential auf der PET-Oberfläche zeigt eine gute Übereinstimmung mit den Referenzwerten (Anwendungsbeschreibung des Geräteherstellers Anton Paar). Wie erwartet, zeigte das gereinigte Borosilikatglas die stärkste Oberflächenladung, verursacht durch eine hohe Anzahl negativ geladener dissoziierbarer Oberflächengruppen. Dem gegenüber ist PP, im Vergleich zu den anderen Grundmaterialien (PA6, PET), die am wenigsten negativ geladene unbeschichtete Oberfläche. Die Fluorbeschichtung bedingt nur eine geringe Reduzierung der Oberflächenladung. Andererseits bewirkt die Silanisierung eine starke Verschiebung des Zetapotentials in positive Richtung (isoelektrischer Punkt). Dieses Ergebnis zeigt, dass diese Beschichtung eine noch geringer polare Oberfläche bewirkt.

**Tabelle 6** - Zetapotential der Materialien

Material	B33	B33+TP	PA6	PA6+TG	PET	PET+TG	PP
Zeta potential [mV]							
Mittelwert	-74.8	-28.33	-59.61	-52.16	-61.89	-59.2	-45.07
Standartabweichung	±2.3	±0.9	±0.5	±4.5	±6.6	±1.8	±1.5

In **Tabelle 7** ist das Zetapotential von vitalen und sterilisierten (15 min, Lysoformin) *P. putida* Zellen dargestellt. Das Zetapotential ist mit -20,8 mV leicht negativ. Die Hülle der sterilisierten Zellen ist mit einem Zetapotential von -50 mV mehr als doppelt so stark negativ. Verantwortlich dafür ist das Membranpotential, von ca. -100 mV bei Bakterien (Guffanti *et al.*, 1979; Van Kessel & Russell, 1992), das die tatsächlichen Ladungen maskiert.

**Tabelle 7** - Zetapotential der Bakterien

<i>P.putida</i> mt2	lebend	inaktiviert
Zetapotential [mV]	-20,8	-49,3
Durchmesser [µm]	1,089	1,569

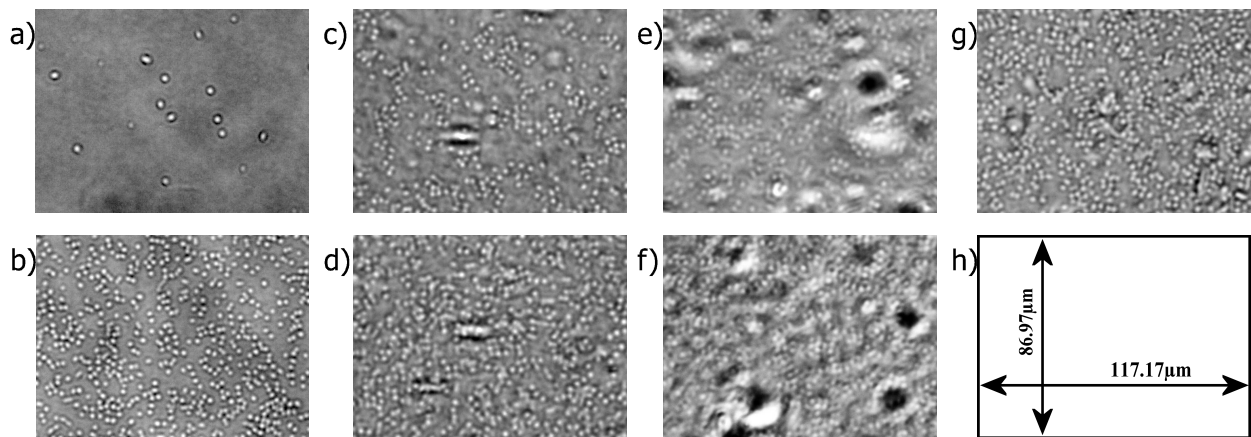
Während der Messung des Zetapotentials wird ebenfalls der Durchmesser der Organismen erfasst. Für die lebenden Zellen liegt der Durchmesser bei ungefähr 1 µm, für die inaktivierten bei 1,6 µm. Das Anschwellen der Zellwand wird durch den Verlust der Funktionalität des Zytoskeletts und den Zusammenbruch der Zellmembran verursacht.



### 3.3 Charakterisierung der bakteriellen Adhäsion

Nach der Analyse der physiko-chemischen Eigenschaften der Materialien wurde die Interaktion mit der biologischen Komponente, den Mikroorganismen, quantifiziert. Als Schlüsselprozess wird die Bindung der durch Strömung, Sedimentation und Diffusion an die Grenzfläche getragenen Bakterien angesehen. Dieser Prozess, die Initialadhäsion, wurde über einen Zeitraum von bis zu 48 Stunden untersucht.

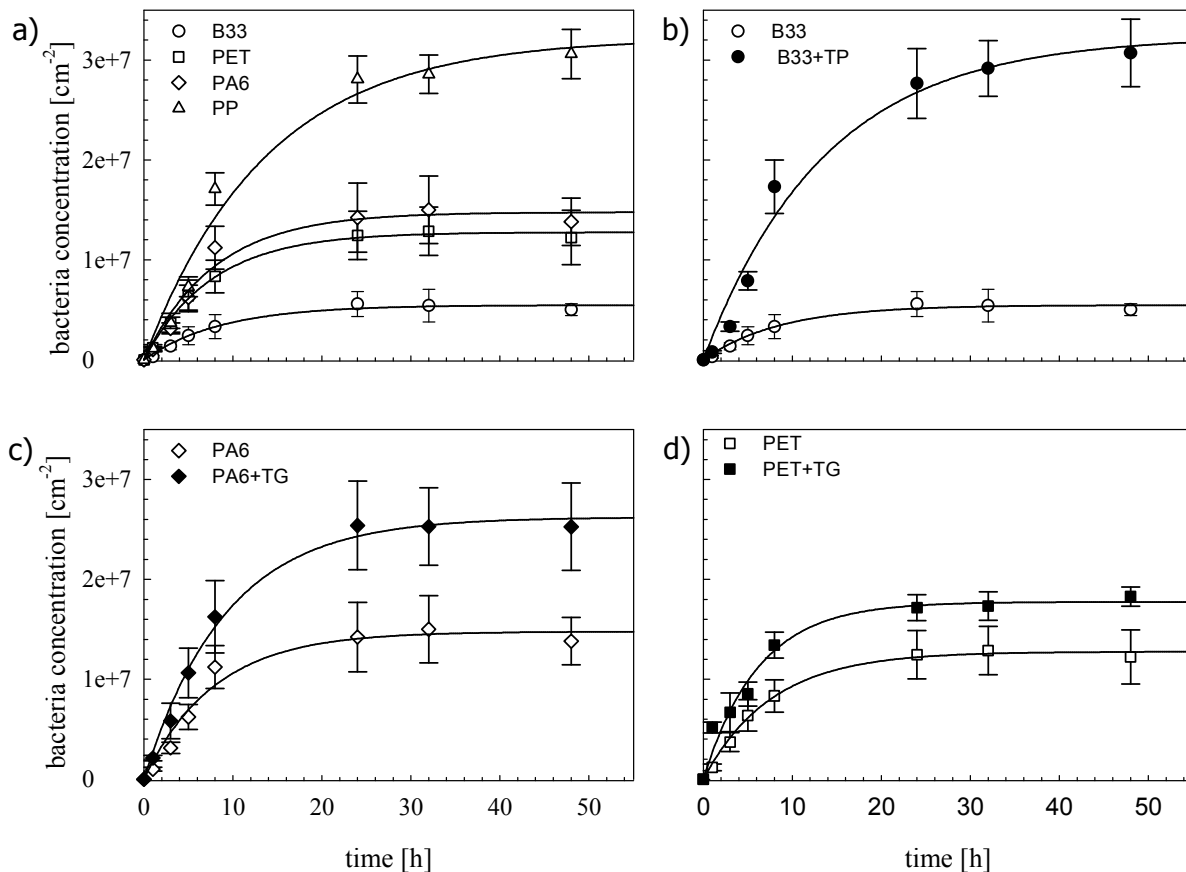
Die Phasenkontrastbilder nach 24 Stunden zeigen an die Materialoberfläche adhärenierte Bakterien in Form eines homogen verteilten, mehr oder weniger dichten Monolayers (Abb. 33). Grundsätzlich lässt sich auf den beschichteten Proben eine höhere Zelldichte beobachten, verglichen mit den unbeschichteten Proben.



**Abb. 33** - Repräsentative Phasenkontrastbilder nach 24 h. a) B33; b) B33+TP; c) PA6; d) PA6+TG; e) PET; f) PET+TG; g) PP; h) Maßstab; In den Polymerfolien können typische Einschlüsse beobachtet werden. (Objektivvergrößerung 60x; Okularvergrößerung 2x)

Während auf dem gereinigten Glas nur ein paar vereinzelte Bakterien Kontakt mit der Oberfläche haben, ist die modifizierte Variante (Tegophobe<sup>®</sup>) zu ungefähr zwei Dritteln belegt. Eine ähnlich dichte Zellschicht etablierte sich auf PP. Die ähnliche Chemie (Methyl- bzw. Ethylgruppen) der Oberfläche ließ dieses Ergebnis erwarten. Die Abb. 33 c und e zeigen mittlere Bedeckungsgrade auf PA6 und PET. Auf den modifizierten Flächen dieser Polymere adhärenierten geringfügig mehr Bakterien. Die extrem unterschiedlichen Zelldichten auf Glas im Vergleich zu einer Oberfläche mit Fluorcharakteristik wurden von Jucker ([Jucker et al., 1996](#)) ebenfalls beobachtet. In dieser Arbeit zeigten die Autoren eine höhere Bindeeffizienz von *P. putida* auf Teflon verglichen mit Glas. Die in Abb. 33 dargestellten mikroskopischen Befunde zeigen speziell für hydrophobe Oberflächen (PP, B33+TP) einen noch nicht abgeschlossenen Vorgang. Ein Vergleich ist nur trendweise möglich. Der vollständige Prozess des

Adhäsionsexperimente über 48 Stunden ist in **Abb. 34** dargestellt. Dabei wird die geometrisch maximal mögliche Zelldichte ( $3,3 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-2}$ ) an der Materialoberfläche, mit einer Zellkonzentration von  $5 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$  im überströmenden Medium, nicht erreicht. Mit diesem Befund konnte eine Limitierung durch die Fläche als Bindungspartner ausgeschlossen werden. Die kinetischen Parameter wurden also im messbaren Bereich erfasst. Die Zeit in der die maximale Zelldichte der Oberfläche ( $q_{\text{max}}$ ) erreicht wird, wird durch  $\beta$  ausgedrückt. Materialien mit einer geringeren Zelldichte im stationären Zustand, wie B33, erreichen diese Zelldichte in kürzerer Zeit (größere Akkumulationsrate;  $\beta$ ) und umgekehrt. Ob dieser stationäre Zustand ein dynamisches Gleichgewicht (Equilibrium) darstellt, wurde bisher noch nicht abschließend geklärt (Bos *et al.*, 1999) (Siehe Abschnitt 3.5.1).



**Abb. 34** – Zeitabhängige Akkumulation von Zellen an der Oberfläche mit konstanter Zellkonzentration in der überströmenden Flüssigkeit; leere Symbole sind unbeschichtete Grundmaterialien, gefüllte Symbole Beschichtungen, Linien zeigen die Fit-Funktion für das Experiment (Gleichung 10)

**Abb. 34 a** zeigt die Entwicklung der Zellakkumulation an der Oberfläche für unbeschichtete Materialien. Auf PP erreichen die Zellen verglichen mit den anderen Materialien dabei die höchste Dichte (PA6>PET>B33). Während der Adhäsionsprozess

auf Glas schon nach 24h abgeschlossen ist, wird der stationäre Zustand auf dem beschichteten Glas erst nach 48h erreicht **Abb. 34 b**. Die Zellzahl auf Tegophobe beschichtetem Glas nach 48h ist vierfach höher, als auf gereinigtem unbeschichtetem Glas. Vergleichbar mit den Bildern in **Abb. 33** zeigt sich die Situation für die beschichteten Polymerfolien und die dazugehörigen Grundmaterialien (PA6, PET; **Abb. 34 c** und **d**). PA6 und PET zeigen mittlere Zelldichten an der Grenzfläche. Auf den beschichteten Folien konnte eine etwas stärkere Material-Mikroorganismen-Interaktion beobachtet werden. Die Ergebnisse für die unbeschichteten Materialien liegen im Bereich von Literaturwerten (**Gottenbos, 2001**). Die Beschichtung mit einer chemisch identischen Verbindung (Tubiguard®68) führt zu unterschiedlichen biologischen Befunden, die weder mit der Fluorkonzentration an der Oberfläche noch mit der Oberflächenspannung in einem linearen Verhältnis stehen. Ein Hinweis auf die Ursache gibt das, unter 3.4.2 diskutierte, unterschiedlich starke Zetapotential. In **Tabelle 8** sind die kinetischen Parameter für alle untersuchten Materialien zusammengefasst.

**Tabelle 8** - Zusammenfassung der kinetischen Parameter der Initialadhäsion auf Materialien und Beschichtungen; Die Oberflächenenergie ist zur Orientierung angegeben.

	B33	B33+TP	PA6	PA6+TG	PET	PET+TG	PP
$\gamma_s$ [mN·m <sup>-1</sup> ]	44.7	22.3	37.0	15.4	42.7	10.3	24.3
$q_{max}$ [10 <sup>6</sup> ·cm <sup>-2</sup> ]	6.6 ±1.5	24.5 ±7.3	15.7 ±1.8	22.2 ±3.5	13.4 ±2.3	16.9 ±2.7	28.1 ±3.0
$\beta$ [h <sup>-1</sup> ]	0.15 ±0.03	0.07 ±0.02	0.12 ±0.02	0.10 ±0.01	0.13 ±0.07	0.12 ±0.04	0.06 ±0.01
$j_0$ [cm <sup>-2</sup> ·s <sup>-1</sup> ]	273	500	519	624	484	548	505

Die generell höchste Zellbelegung ( $q_{max}$ ) wird mit ungefähr  $28 \cdot 10^6$  cm<sup>-2</sup> auf PP erreicht. Auf einem ähnlich hohen Level ist die Zelldichte auf dem beschichteten Glas (B33+TP) mit ca.  $25 \cdot 10^6$  cm<sup>-2</sup>. Wie oben schon ausgeführt, ist die chemische Natur von PP mit der der Beschichtung (Tegophobe®) vergleichbar (Methyl-, Ethylgruppen), worin die gleichartige Affinität der Mikroorganismen zur Oberfläche begründet ist. Diese hohe Zelldichte entspricht dem drei- bis vierfachen des niedrigsten gemessenen Wertes  $6,6 \cdot 10^6$  cm<sup>-2</sup> auf dem unbeschichteten Glas (B33).

Der Zusammenhang zwischen hohem  $q_{max}$  und niedrigem  $\beta$ , verknüpft durch den Parameter  $j_0$ , kann wieder sehr deutlich beobachtet werden.

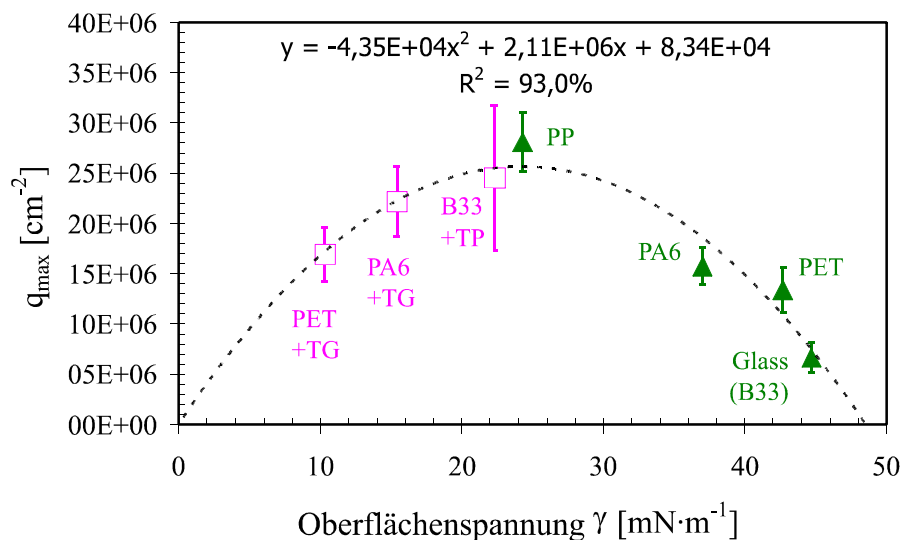
Zusammenfassend deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl die quantenmechanisch bedingten, dispersiven van der Waals-Wechselwirkungen als auch die elektrostatischen Wechselwirkungen die Initialadhäsion maßgeblich beeinflussen.

Gottenbos (Gottenbos, 2001) analysierte auf ähnliche Art und Weise die kinetischen Parameter der Adhäsion von *Pseudomonas aeruginosa*. Die Zellkonzentration im Überstand war bei seinen Experimenten  $3 \cdot 10^8 \text{ ml}^{-1}$ . In dieser Arbeit wurden initiale Adhäsionsgeschwindigkeiten ( $j_0$ ) von  $360 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  für PP,  $320 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  für PET und  $260 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  für Glas bestimmt. Somit liegen die gemessenen Werte dieser Arbeit im Bereich der publizierten Daten.

### 3.4 Korrelation der bakteriellen Adhäsion mit der Physiko-Chemie der Oberfläche

#### 3.4.1 Korrelation der Parameter der Initialadhäsion mit der Oberflächenspannung

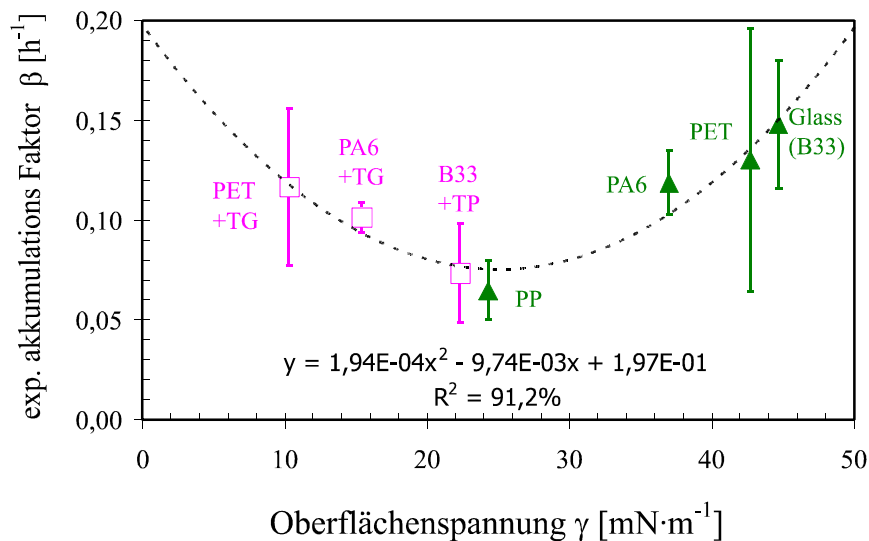
Die maximale Anzahl adhärierter Zellen ( $q_{\text{max}}$ ) ist auf hoch-energetischen Oberflächen (hohe Oberflächenspannung; B33, PET, PA6) überwiegend niedriger als auf niedrig-energetischen Oberflächen. Dabei stellt sich ein Maximum im Bereich um PP und B33+TP ein. Höhere und niedrigere Oberflächenspannung der Substrate bedingen eine geringere Zelldichte an der Oberfläche (Abb. 35).



**Abb. 35** - Korrelation zwischen Oberflächenspannung und der Zelldichte im Gleichgewicht  $q_{\text{max}}$ ; Dreiecke sind Grundmaterialien, Vierecke Beschichtungen, Die gestrichelte Linie repräsentiert ein mögliche Fit-Funktion.

Um diesen Befund mathematisch zu beschreiben, ist eine symmetrische Funktion mit einem Maximum am besten geeignet. Die einfachste Form dieser Art ist eine quadratische Funktion zweiten Grades, die Parabel. Der Parameter  $j_0$  ist ein Proportionalitätsfaktor zwischen  $q_{\text{max}}$  und  $\beta$  (Gleichung 12), was die umgekehrte, nach oben

geöffnete Form für  $\beta$  erklärt (Abb. 36). Ebenfalls aus diesem Zusammenhang ist vorstellbar, dass die Symmetrieachse der Parabel durch die linearen Funktion von  $j_0$  (Abb. 38) repräsentiert wird.



**Abb. 36** - Korrelation zwischen Oberflächenspannung und dem exponentiellen Akkumulationsfaktor  $\beta$ ; Dreiecke sind Grundmaterialien, Vierecke Beschichtungen, Die gestrichelte Linie repräsentiert ein mögliche Fit-Funktion.

Die Parameter für diese Fit-Funktion wurden für die aufgetragenen Datenbereiche jeweils für die  $q_{\max}$ - und  $\beta$ -Daten ermittelt. Das Maximum der Funktion von  $q_{\max}$  liegt bei 24,3 mN·m<sup>-1</sup>. Für  $\beta$  liegt das Minimum bei 25,1 mN·m<sup>-1</sup>. Der Mittelwert ist 24,7 mN·m<sup>-1</sup>. Das Material, das am nächsten an diesem Wert liegt ist PP 24,3 mN·m<sup>-1</sup>.

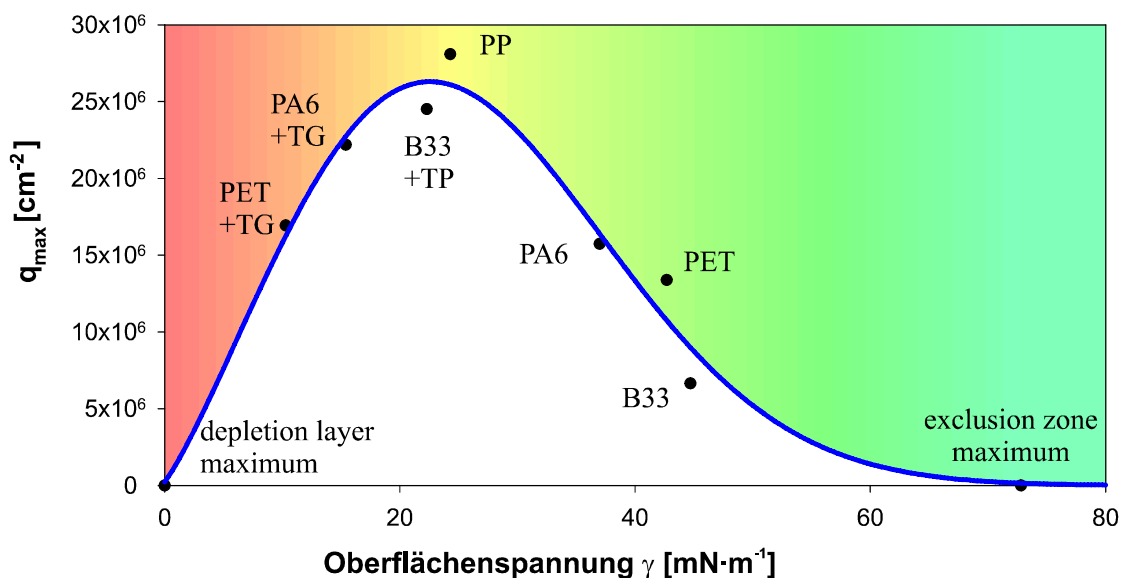
Die Möglichkeit eines Optimums wurde in einem Review-Artikel von Vogler (Vogler, 1999) erstmals erwähnt. Die Barriere-Wirkung hydrophiler, hochenergetischer Oberflächen ist eingehend beschrieben. Die verminderte Adhäsion wird durch die Bildung eines hoch geordneten Wassernetzwerkes nahe der Grenzfläche begründet. Dieses Wassernetzwerk erstreckt sich relativ weit in die überstehende Flüssigkeit und bildet eine sogenannte „exclusion zone“, durch die nicht nur Ionen und Farbstoffmoleküle, sondern auch Bakterien ausgegrenzt werden können (Zheng *et al.*, 2006). Auch werden Mechanismen beschrieben, bei denen die Abstoßung auf entropische Effekte an der ersten Wasserschicht über der Oberfläche zurückgeführt wird (Israelachvili, 1996).

Für niedrigenergetische Oberflächen ist die Erklärung der beobachteten Phänomene schwieriger. An hydrophoben Oberflächen wird eine weniger dichte, sehr dünne Wasserstruktur beschrieben (Tarasevich, 2011). Die abnehmende Dichte des „depletion layers“ (0,4 g·cm<sup>-3</sup> bei 0,5 nm) ist gleichzusetzen mit einer gasähnlichen Schicht direkt

über der hydrophoben Grenzfläche. Die Ergebnisse einiger Arbeiten ließen deren Autoren sogar vermuten, dass diese Ausdünnung direkt an der Grenzfläche zu einem kavitätartigem Film, einem „dry layer“ führen könnte (Lum *et al.*, 1999). Indiz für eine vakuumähnliche Sperrschicht ist die Beobachtung einer thermischen Isolierung (Ge *et al.*, 2006).

*Hypothese des Autors über die hydrophobe Barriere*

An Oberflächen, an denen die Grenzflächenspannung viel niedriger ist als die Oberflächenspannung der überstehenden Flüssigkeit (hydrophobe Fläche), besitzen die Flüssigkeitsmoleküle nach der (erzwungenen) Adhäsionsreaktion mehr Energie, die durch Wärme aus dem System abgezogen wurde. Die Moleküle nehmen dabei, analog zum hydrophilen Gitter (exclusion zone), die Konfiguration mit möglichst niedrigster Energie ein. Unter der Annahme, dass es für Wasser nur EIN Minimum gibt, sind alle Wassermoleküle der Grenzschicht in gleicher Weise ausgerichtet. Die nachfolgenden Wassermoleküle richten sich an den fest ausgerichteten Grenzflächenmolekülen, verknüpft durch Wasserstoffbrückenbindungen, aus und bilden damit ähnlich dem hydrophilen Wassernetzwerk eine Matrix mit erhöhter Ordnung, die ebenfalls als Barriere fungieren könnte.

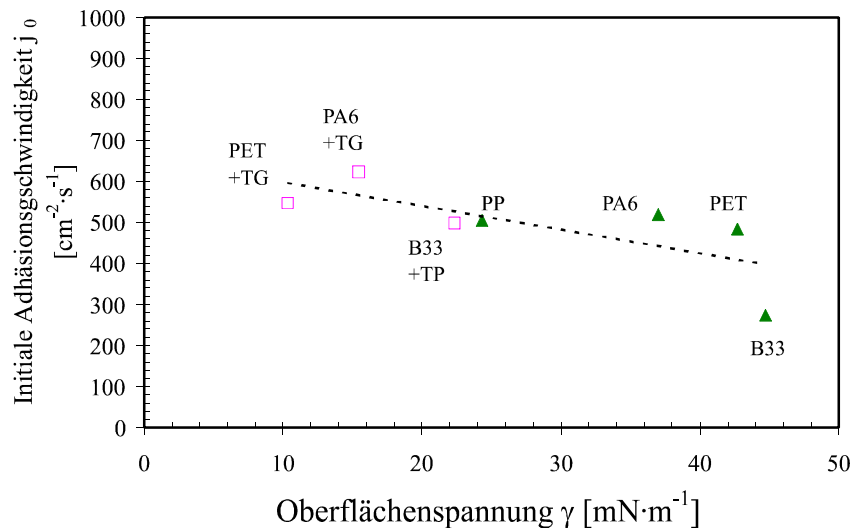


**Abb. 37** - Korrelation von  $q_{max}$  mit der Oberflächenspannung; mit zwei theoretischen Nullpunkten (0 und 72,8mN/m); rot: Einfluss des „Depletion layers“; grün: Einfluss der „Exclusion zone“

Die hydrophobe Barriere wird umso stabiler, je höher der Unterschied zwischen der Grenzflächenspannung des Materials und der Oberflächenspannung der Flüssigkeit ist.

Die Parabel wurde als geeignete Funktion wegen ihrer wenigen Parameter und der Eigenschaft des einen Extremums verwendet. Das tatsächliche Modell setzt sich vermutlich aus den Barrierefunktionen von depletion layer und exclusion zone zusammen (Abb. 37). In diese Skizze wurden zwei zusätzliche theoretische Passpunkte (0 mN/m; 72,8 mN/m als Oberflächenspannung des Wasser) verwendet, bei denen die Wirkungen der Barrieren maximal werden. Ein Indiz für dieses Modell ist der Zusammenhang der Funktionsform und der abnehmenden Dichte der hydrophilen exclusion zone bei zunehmender Dicke der exclusion zone (rechter Bereich).

### 3.4.1 Korrelation der Parameter der Initialadhäsion mit der Oberflächenspannung



**Abb. 38** - Korrelation zwischen Oberflächenspannung und der initialen Adhäsionsgeschwindigkeit  $j_0$ ; Dreiecke sind Grundmaterialien, Vierecke Beschichtungen, Die gestrichelte Linie repräsentiert ein mögliche Fit-Funktion.

Die initiale Adhäsionsgeschwindigkeit ( $j_0$ ) steht mit der Oberflächenspannung in linearem Verhältnis (Abb. 38). Je niedriger die Oberflächenspannung, desto höher die initiale Adhäsionsgeschwindigkeit. Literaturdaten (Gottenbos, 2001) lassen vermuten, dass  $j_0$  eine spezies-spezifische Konstante ist, welche größtenteils abhängig von der Partikelgröße, Form und Motilität ist. *P. aeruginosa* hat, wie oben beschrieben, Adhäsionsgeschwindigkeiten im ähnlichen Bereich wie *P. putida*. *Staphylococcus epidermidis* hat eine 10-fach höhere initiale Adhäsionsgeschwindigkeit unter gleichen sonstigen Bedingungen. Eigene Beobachtungen aus Vorexperimenten zeigen, dass außerdem Temperatur, Fließgeschwindigkeit, extrazelluläre Proteine und natürlich die Partikelkonzentration (Abb. 42) einen großen Einfluss haben. Für ein lineares Verhältnis von  $j_0$  und der Oberflächenspannung ergeben sich ein Schnittpunkt mit der Y-Achse bei

$656 \text{ cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$  und ein Schnittpunkt mit der X-Achse bei  $106 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  (Abb. 38). Theoretische Oberflächen mit einer Oberflächenspannung  $>106 \text{ mN} \cdot \text{m}^{-1}$  würden keine Adhäsion mehr zulassen.

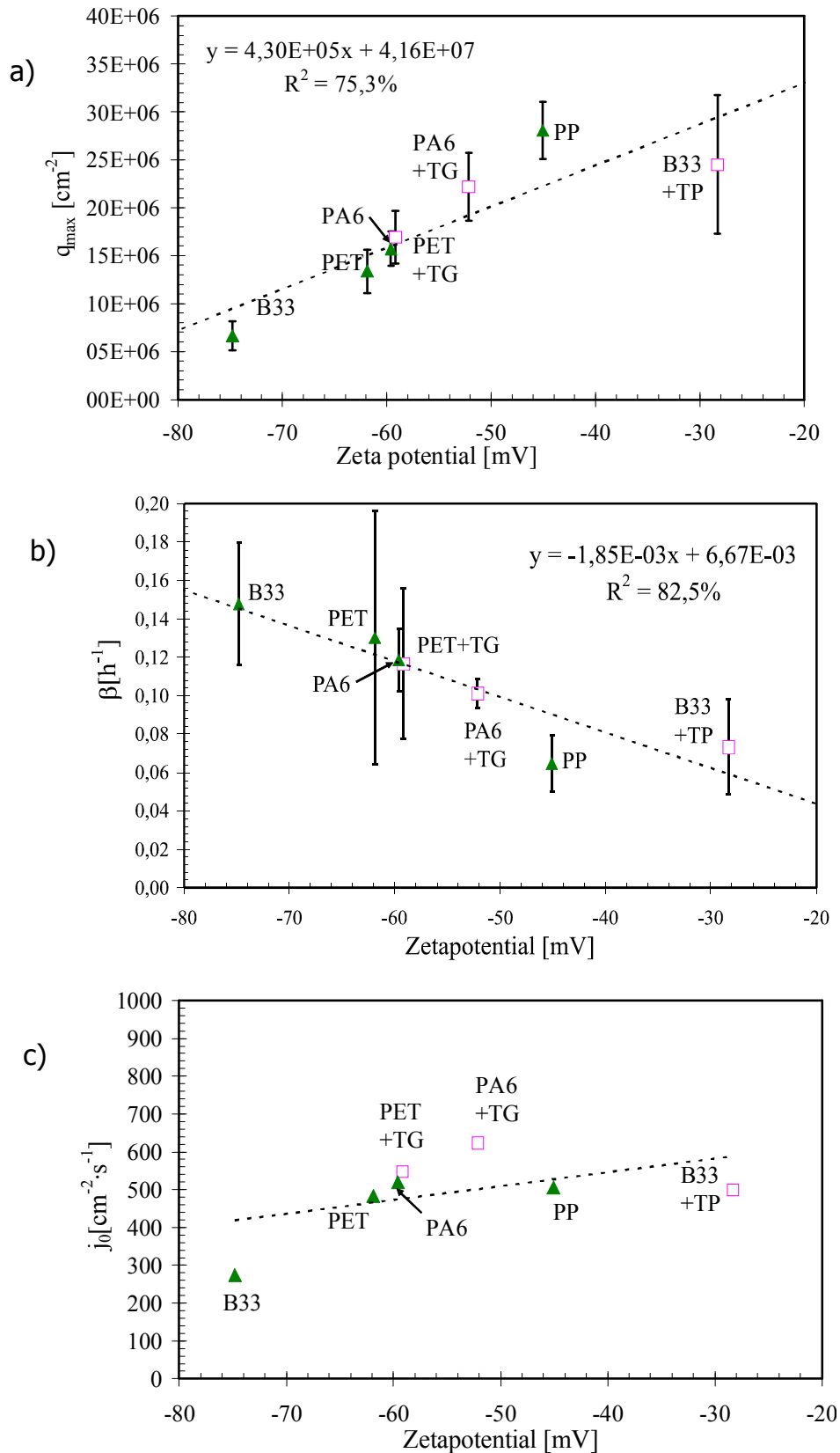
Eine der wichtigsten Erkenntnisse aus diesen Experimenten ist die Einordnung der Bedeutung der Parameter der Initialadhäsion. Der Parameter  $j_0$  ist nahezu konstant und wahrscheinlich stärker abhängig von der Art des Partikel als von der Beschaffenheit der Oberfläche. (Siehe dazu auch 3.5) Der Parameter  $\beta$  ist durch  $j_0$  abhängig von  $q_{\text{max}}$ . Die maximale Zellbelegung auf einem Material ( $q_{\text{max}}$ ) bei einer bestimmten Volumenkonzentration ist der Parameter, der eine Aussage über die Startbedingungen für das Biofilmwachstum treffen lässt.

### 3.4.2 Korrelation der Parameter der Initialadhäsion mit dem Zetapotential

Im Vergleich zur Korrelation mit der Oberflächenspannung haben alle drei Parameter der Initialadhäsion einen ungefähr linearen Zusammenhang mit dem Zetapotential (Abb. 39). Die geringste Flächenbedeckung im stationären Zustand lässt sich auf Glas (B33) beobachten. Diese Oberfläche weist ebenfalls das niedrigste Zetapotential (-74,8mV) auf. Dem gegenüber lässt das siloxanbeschichtete Glas mit dem geringsten elektronegativen Oberflächepotential die meisten Zellen adhären. Die Reduktion der elektrostatischen Abstoßung durch die Fluorkarbonbeschichtung der Polymerfolien (PET, PA6) bewirkt eine etwas stärkere Adhäsion der Bakterien. Vergleichbare Korrelationen wurden von Busscher (Busscher *et al.*, 2008) veröffentlicht. Darüber hinaus kann auch hier das reziproke Verhältnis von  $q_{\text{max}}$  und  $\beta$  beobachtet werden (Abb. 39).

Bei der Analyse der bakteriellen Oberflächenladung von *P. species* wurde diese oft als mittelmäßig stark negativ charakterisiert. Das negative Oberflächenpotential von *P. putida* (KT2442) wird von Abu-Lail mit -17,3 mV angegeben (Abu-Lail & Camesano, 2002). Hwang analysierte das Zetapotential und die Hydrophobizität von *P. putida* in Abhängigkeit von der Verfügbarkeit der aromatischen C-Quelle. Dabei sinkt das Zetapotential (-29,9 mV auf +2,76mV) des stoffwechselaktiven hydrophoben Stammes bei der Anwesenheit von Naphtalin (Hwang *et al.*, 2008). Für den in dieser Arbeit verwendeten Stamm (*P. putida* mt2; DSM 3931) wurde mittels der Messung der elektrophoretischen Mobilität ein Zetapotential von -20,8 mV ermittelt (Tabelle 7). Dieser Wert zeigt gute Übereinstimmung mit den publizierten Ergebnissen anderer Gruppen (Rijnaarts *et al.*, 1999).





**Abb. 39** - Korrelation zwischen Zetapotential und den Schlüsselparametern der initialen Zelladhäsion; Dreiecke stehen für Grundmaterialien, Vierecke für Beschichtungen. Die gestrichelten Linien repräsentieren mögliche Fit-Funktionen.

Das Zetapotential der beschichteten und unbeschichteten Materialien ist ebenfalls negativ. Folglich kann eine elektrostatische Abstoßung der Bakterien erwartet werden. Besonders in niedrig konzentrierten, wässrigen Medien (geringe Ionenstärke) gewinnt der Einfluss der elektrostatischen Wechselwirkungen an Bedeutung für die Initialadhäsion (Busscher *et al.*, 2008; Jucker *et al.*, 1996). Im verwendeten Medium ist die Ionenstärke 37 mMol (Konzentrationen siehe 2.3). Also sind die Effekte nur gering, aber vorhanden. Zur Einordnung - liegt die Ionenstärke für physiologische Kochsalzlösung bei 154mMol und die von Trinkwasser, je nach Härte, bei ca. 5mMol.

Die empirisch gewonnenen Daten der Initialadhäsion weisen einen tendenziell linearen Zusammenhang mit dem Zetapotentials auf. Der Einfluss der anderen physikochemischen Wechselwirkungskräfte auf  $j_0$  ist vermutlich stärker als der Einfluss des Zetapotentials. Die beobachteten Trends im Bezug auf  $q_{\max}$  und  $j_0$  wurden in ähnlicher Weise publiziert (van Merode *et al.*, 2008).

Zusammenfassend deuten die gezeigten Ergebnisse darauf hin, dass die Initialadhäsion auf den ausgewählten Materialien von dispersiven van der Waals Wechselwirkungen bestimmt und nur zum Teil durch elektrostatische Kräfte beeinflusst werden.

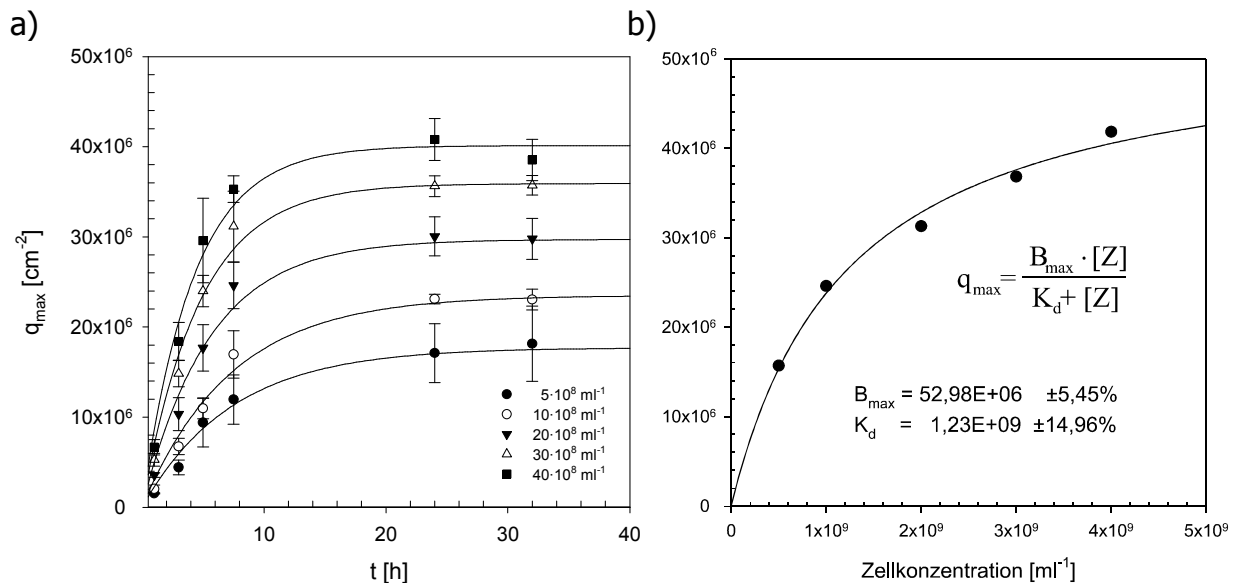
### 3.5 Exkurs: Dissoziationskonstante von *P.putida* auf PA6

#### 3.5.1 Dynamisches Gleichgewicht

Ob  $q_{\max}$  als stationäre Zustand der Zellbelegung, ein dynamisches Gleichgewicht (Equilibrium) darstellt ist noch nicht geklärt (Bos *et al.*, 1999). Bis heute gibt es nur wenige Untersuchungen in dieser Richtung. Wahrscheinlich ist, dass kurze Zeit nach einer reversiblen Bindung aktive Prozesse der Mikroorganismen eine irreversible Bindung verursachen (Busscher & van der Mei, 2006). Unter der Annahme, dass die Initialadhäsion von Bakterien in den Versuchen ähnlich einer Ligand-Rezeptor-Bindung erfolgt, lässt sich der Prozess mit einer Funktion analog der Michaelis-Menten-Gleichung darstellen. Dazu wurde ein Material mit einer mittleren Belegungsichte im normalen Versuchsrahmen ausgewählt (PA6) und der Versuch zur Initialadhäsion mit verschiedenen, relativ hohen Bakterienkonzentrationen durchgeführt.

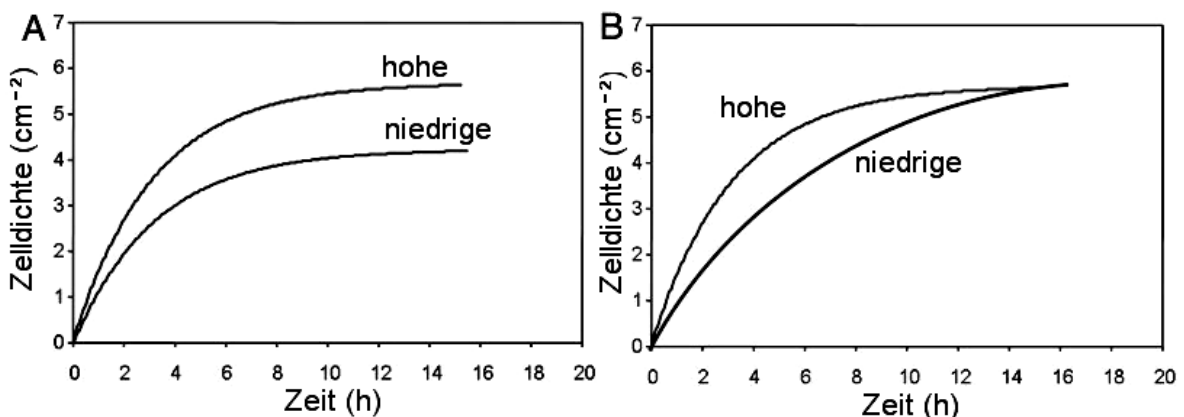
Abb. 40a zeigt auf der linken Seite den zeitlichen Verlauf der Initialadhäsion mit der exponentiellen Regressionsfunktion (Gleichung 10). Für die unterschiedlichen Konzentrationen wurden  $q_{\max}$  Werte in regelmäßigen Abständen gemessen. Der höchste Wert,

mit einem  $q_{\max}$  Wert von  $\sim 4 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-2}$ , sättigt die Oberfläche zu  $\sim 100\%$ . Höhere Zellkonzentrationen sind nicht mit Sicherheit exakt messbar, da sie den Messbereich überschreiten.



**Abb. 40** - a: Initialadhäsion bei verschiedenen Konzentrationen im Medium (Quasi-Substrat); b:  $q_{\max}$  über der Zellkonzentration; Versuchsmaterial ist PA6

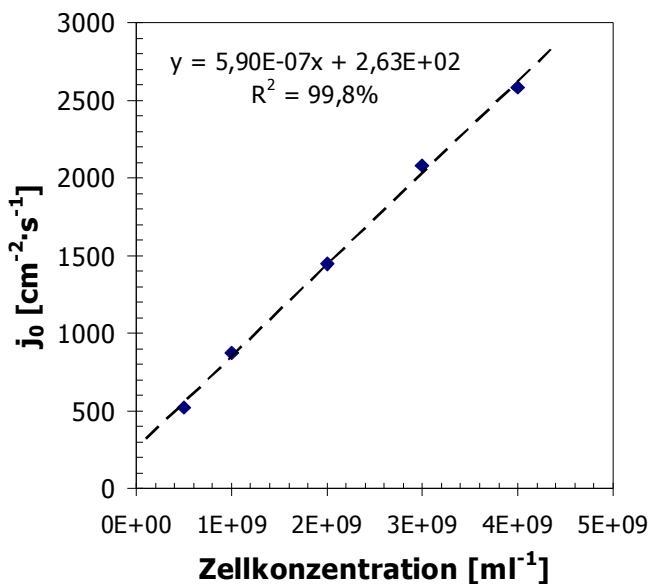
Auf der rechten Seite (Abb. 40b) sind die Zelldichten im stationären Zustand über der jeweiligen Zellkonzentration im überströmenden Medium mit der Michaelis-Menten-Gleichung als Regressionsfunktion aufgetragen. Die ermittelten Werte passen sehr gut in das kinetische Modell ( $R^2=98,72\%$ ). Die Halbsättigungskonzentration liegt bei  $1,23 \cdot 10^9 \text{ ml}^{-1}$  und die theoretisch, maximale Zelldichte beträgt  $5,3 \cdot 10^7 \text{ cm}^{-2}$ . Diese Halbsättigungskonzentration ist vermutlich stark von den Materialeigenschaften beeinflusst. Die gemessene maximale Zellkonzentration an der Oberfläche würde für jedes Bakterium (inklusive aller seiner äußeren Zellwandbestandteile) einen Platz von  $0,73 \times 0,73 \text{ }\mu\text{m}$  ( $0,53 \text{ }\mu\text{m}^2$ ) bedeuten (*P. putida*  $0,5 \text{ }\mu\text{m} \text{ }\varnothing \times 1,1 \text{ }\mu\text{m} = 0,55 \text{ }\mu\text{m}^2$ ).



**Abb. 41** - Einfluss der Bakterienkonzentration auf die Kinetik mit (A) dynamischem Gleichgewicht und (B) stationären Endpunktes

Es spricht Vieles für ein dynamisches Gleichgewicht. Eine irreversible Adhäsionsreaktion ist dadurch gekennzeichnet, dass sie immer im selben Maximum endet (Abb. 41 B). Bei kleineren Zellkonzentrationen im Medium stellt sich diese maximale Belegung nur später ein. Bei einem dynamischen Gleichgewicht ist die Zeitkonstante vergleichbar mit der irreversiblen Adhäsion aber sie endet in einer niedrigeren Zellkonzentration an der Oberfläche (Abb. 41 A). Dieses Maximum kann nur durch das dynamische Ablösen adhärerter Zellen auf dem jeweiligen Level gehalten werden. Um den dynamischen Austausch adhärerter Zellen absolut zu beweisen, könnte ein weiteres Experiment mit fluoreszenzmarkierten Partikeln durchgeführt werden.

### 3.5.2 Adhäsionsgeschwindigkeit



**Abb. 42** - Abhängigkeit der initialen Adhäsionsgeschwindigkeit  $j_0$  von der Zellkonzentration; Versuchsmaterial ist PA6

Bei der Messung der Adhäsionsparameter für verschiedene Konzentrationen konnte ebenfalls die Abhängigkeit der initialen Adhäsionsgeschwindigkeit von der Bakterienkonzentration untersucht werden (Abb. 42). Der Parameter  $j_0$  und die Zellkonzentration stehen in linearem Verhältnis. Der Anstieg der Adhäsionsgeschwindigkeit mit zunehmender Zellkonzentration (Adhäsionsbeschleunigung =  $5,90 \cdot 10^{-7} \text{ cm}^3 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ) ist wahrscheinlich hauptsächlich abhängig

von der Größe und Beschaffenheit der Mikroorganismen (Diffusionskonstante). Darüber hinaus kommen Einflüsse von attraktiven und repulsiven Wechselwirkungen, die von den physiko-chemischen Eigenschaften der Oberfläche verursacht werden zum tragen.

### 3.6 Wachstumsversuche

Die Simulation ist eine Möglichkeit der Abbildung der Entstehungsprozesse des Biofilms. Sie ergänzt das Experiment und versucht das Wachstumsverhalten des Biofilms nach der Initialadhäsion mit unterschiedlich dichter Zellbelegung zu erklären. Diese Untersuchung stellt das Bindeglied zwischen den Ergebnissen der Initialadhäsion und den

Abbauergebnissen im Demonstrator dar und soll bei der Interpretation der beobachteten Zusammenhänge helfen. Die Parameter im Versuch sind dabei identisch mit den Simulationsparametern.

### 3.6.1 Numerische Simulation

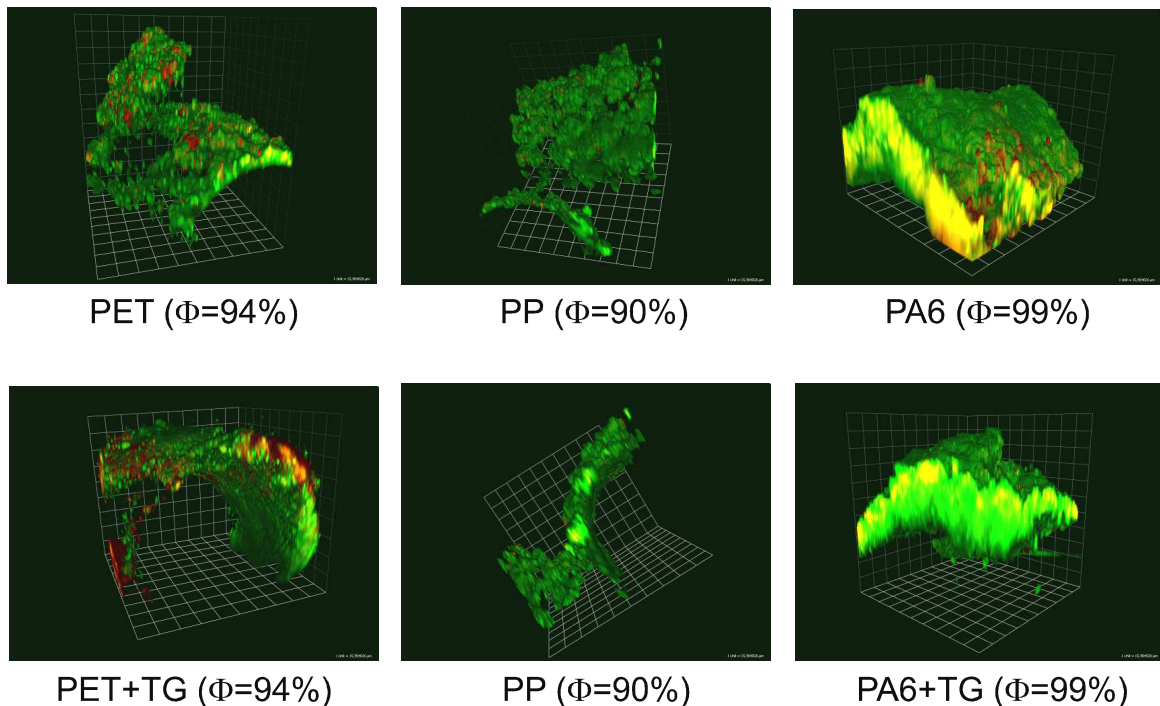
Die aus den Versuchen zur Initialadhäsion entnommenen Startwerte der Zellkonzentration auf der Oberfläche ( $q_{\max}$ ) wurden beispielhaft für die Zellbelegung auf einem Material mit hoher (hydrophob, PP) und mit niedriger (hydrophil, B33) Oberflächenspannung verwendet. Nach der Wachstumssimulation konnte eine höhere Porosität des Biofilms bei geringer initialer Zelldichte beobachtet werden. Dem gegenüber war das Ergebnis bei höherer initialer Zelldichte ein mehr zusammenhängender, glatter Biofilm (Abb. 43 a, b).

Ähnliche Beobachtungen konnten bei den CLSM-Rekonstruktionen der in Fließzellen kultivierten Biofilme gemacht werden (Abb. 43 c, d). Die Zellen und Mikrokolonien auf der Polypropylenfolie besiedeln die Oberfläche zwar in einer höheren Dichte, aber die Dicke der Zellaggregate (Cluster) ist deutlich niedriger. Das Gegenteil ist auf der Glasoberfläche zu sehen. Ungefähr ein Drittel der Fläche ist frei von Zellen. Auf den anderen Bereichen sind mehrere Zellschichten hohe Cluster (Multilayer) zu finden.

Die gesamte Biomasse ist im 3-wöchigen Experiment im Gegensatz zum Simulationsergebnis sehr gering. Dies ist auf den Versuchsaufbau zurückzuführen. Limitierend ist in der Fließzelle offensichtlich die Konzentration an gelöstem Sauerstoff. Ein Großteil, des vor dem Sterilfilter im Medium vorliegenden Luftsauerstoffs ( $8 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ ), wird auf dem Weg zu den Fließzellen von submers wachsenden Zellen und dem Biofilm in den Schläuchen konsumiert, sodass im Beobachtungsraum der Fließzelle nur noch geringe Konzentrationen vorliegen. Eine entsprechende Überschlagsrechnung wurde auf der Basis der Wachstumskinetik (Abb. 13), der Fließgeschwindigkeit und den gemessenen Volumina (Abb. 21) durchgeführt. Somit geben die Ergebnisse der Simulation, einen besseren Hinweis für die Aussagen über den normalen, unlimitierten Wachstumsprozess, als das Experiment.



geringen Dicken sind darin begründet, dass es sich bei dem in dieser Arbeit untersuchten Biofilm um einen Single-Species-Biofilm handelt und kein Überwachsen mit Pilzen und anderen Bakterienspezies erfolgt.



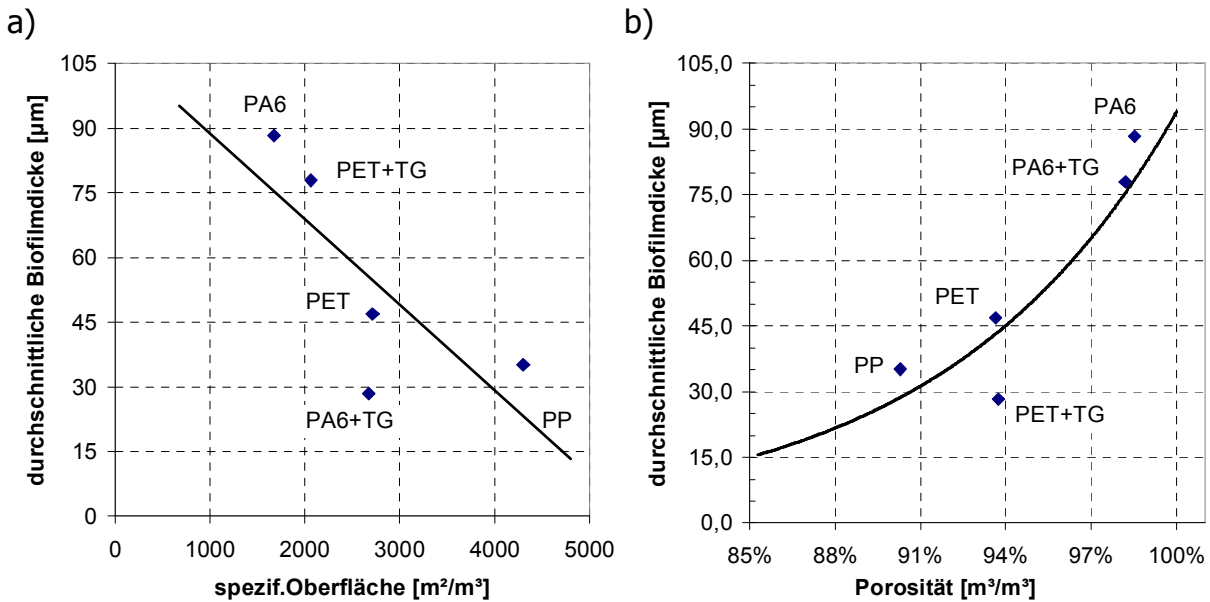
**Abb. 44** - Biofilm auf verschiedenen porösen Textilträgern (1 Kästcheneinheit = 15,9  $\mu\text{m}$ ); Probenentnahme in der Mitte des Festbettbereichs (x und z)

Die Porosität beeinflusst den hydraulischen Widerstand des Trägers. Bei einem konstanten Antrieb durch eine Pumpe würde ein höherer Widerstand einen größeren Fluss oder höheren Druck bewirken. Beim Antrieb der Konvektion durch den Airlift kann das Festbett den Fluss stark verlangsamen, da diese Antriebsart nach dem Prinzip einer Strömungspumpe arbeitet. Damit ist die Porosität des Festbettes ebenfalls eine Kenngröße für die Versorgungsparameter (Nähr- und Sauerstoffkonzentration an der Grenzfläche zum Biofilm). Die Fit-Funktionen in [Abb. 45](#) zeigen deutliche Zusammenhänge zwischen der Biofilmdicke<sup>6</sup> und der Porosität.

Zusammenfassend wird im stationären Zustand der Biofilmentwicklung die Dicke des maturierten Biofilms nicht signifikant von physiko-chemischen Eigenschaften bestimmt, sondern von der Struktur des Trägers und der dadurch bedingten besser oder schlechteren Versorgung mit Nähr- und Sauerstoff. Ein direkter Vergleich mit verschiedenen Strukturen (Porositäten) und demselben Material wurde nicht durchgeführt.

<sup>6</sup> Die Biofilmdicke wurde im Experiment durch das flächenbezogene Feuchtgewicht bestimmt. Da die Dichte des Biofilms mit  $1\text{g/cm}^3$  angenommen wird, entspricht die Einheit  $\text{g/m}^2$  der Dicke in  $\mu\text{m}$ .

Offensichtlich besteht ein Schwellwert bezüglich der Dicke des Biofilms, bis zu dem der Einfluss physiko-chemischer Eigenschaften bestimmbar ist. Maturierte Biofilme hingegen weisen einen stationären Zustand auf, der in der Regel nicht mehr von den physiko-chemischen Eigenschaften des Substratmaterials abhängt.



**Abb. 45** - Höhe des aufgewachsenen Biofilms nach vier Wochen im Verhältnis zur a) Porosität des Trägermaterials und b) spezifischen Oberfläche; 1ml Benzylalkohol pro Liter

### 3.7 Schadstoffadsorption an Materialoberflächen

Dieses Sondierungsexperiment wurde durchgeführt, um den Verdacht der Adsorption von Schadstoffen an den Materialoberflächen und das Eindringen in das Polymernetzwerk zu untersuchen. Man sieht über die Zeit von 12h einen kleinen Teil des Benzylalkohols durch die Begasung verdampfen (Tabelle 9; leere Säule). Die Adsorption an oder in die Polymere liegt im Bereich von 2% Vol.

**Tabelle 9** - Adsorptionstest von Benzylalkohol an textilen Trägern im Demonstratoraufbau; Fläche ~2m<sup>2</sup>; Vorlage 1ml/l; Laufzeit 12h; RT; Begasungsdurchmischung; steril

Säule	1	2	3	4	Mittel [ml/l]	Standard-abweichung
Material	PET	PP	PA6+TG	leer		
RT	2,817	2,817	2,817	2,825	-->Benzylalkohol ident.	
Konzentration [ml/l]	<b>0,903</b>	<b>0,924</b>	<b>0,882</b>	<b>0,916</b>	<b>0,906</b>	<b>2,0%</b>

Polyamid, mit der kleinsten Benzylalkohol-Restkonzentration im überstehenden Medium, wird als quellfähig in Wasser beschrieben (Saremba *et al.*, 1998). Es ist möglich, dass der Schadstoff mit dem Wasser in das Polymer eindringt. Die höhere Konzentration in der Säule mit PP als Matrix kann durch die niedrige Porosität (90%) erklärt werden. Die

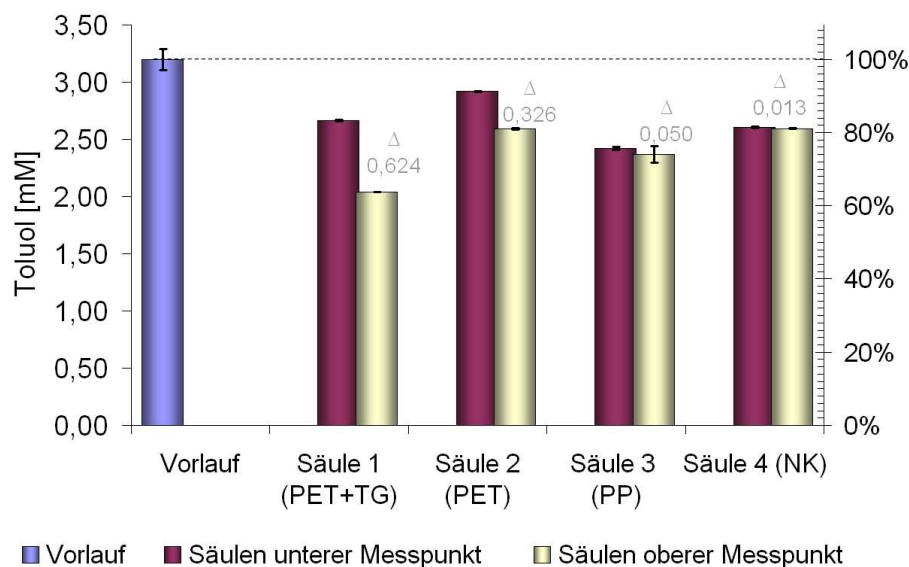


Begasungszone in den festbettgerüsteten Säulen ist geringer (12%) als in der leeren Säule. Damit ist der Luftkontakt, mit dem der aromatische Schadstoff teilweise ausgetrieben wird, weniger intensiv.

Vermutlich findet der Prozess des Verdampfens in höherem Maß als die Adsorption statt. Beide Prozesse zusammen verringern jedoch die Schadstoffkonzentration während des Abbauversuchs (für ca. 24h) in einem vernachlässigbaren Maß, im Vergleich zum Abbau durch die Mikroorganismen.

### 3.8 Labor-Säulen-Bioreaktor

Der Labor-Säulen-Bioreaktor wurde nicht aktiv begast. Der Vorteil ist, das Toluol direkt eingesetzt werden konnte und kein Austreiben durch die Begasung befürchtet werden musste. Für den aeroben Abbau stand hier jedoch nur der in der sterilen Vorratsflasche gelöste Luft-Sauerstoff zur Verfügung.



**Abb. 46** - Abbau von Toluol im Säulenreaktor; Vorlage 3,5 mM Toluol

Die Ergebnisse der Probenentnahme und der Analyse sind in **Abb. 46** zusammengefasst. Die vorgegebene Toluolkonzentration von  $30 \mu\text{l}\cdot\text{l}^{-1}$  ( $\sim 3,5 \text{ mM}$ ) wird auf dem Weg zum ersten Wegpunkt (Probenpunkt Vorlauf) durch die in den Schläuchen anhaftenden Mikroorganismen auf ca. 3,2 mM gesenkt. Schon auf dem weiteren Weg zur ersten Probenentnahmestelle in der jeweiligen Säule werden weitere 10-20% abgebaut. Auf der eigentlichen Versuchsstrecke von 10 cm (10 cm Höhe; 4,5 cm DM;  $V=159 \text{ ml}$ ) wird vergleichsweise nur noch wenig Schadstoff abgebaut. Vermutlich handelt es sich hier auch nicht um einen Abbau, sondern um eine Pufferung des Schadstoffs in den Biopolymeren des vorliegenden Biofilms. Ein Indiz ist die völlig ausbleibende Absenkung

der Konzentration in der Säule ohne Festbett. Es kann angenommen werden, dass im Bereich der Säule ohne aktive Begasung nur geringe Konzentrationen an gelöstem Sauerstoff vorliegen. Ein solcher Aufbau ist besonders als Biofilter geeignet, um schwer abbaubare Spuren von Schadstoffen aus dem Abwasser zu entfernen.

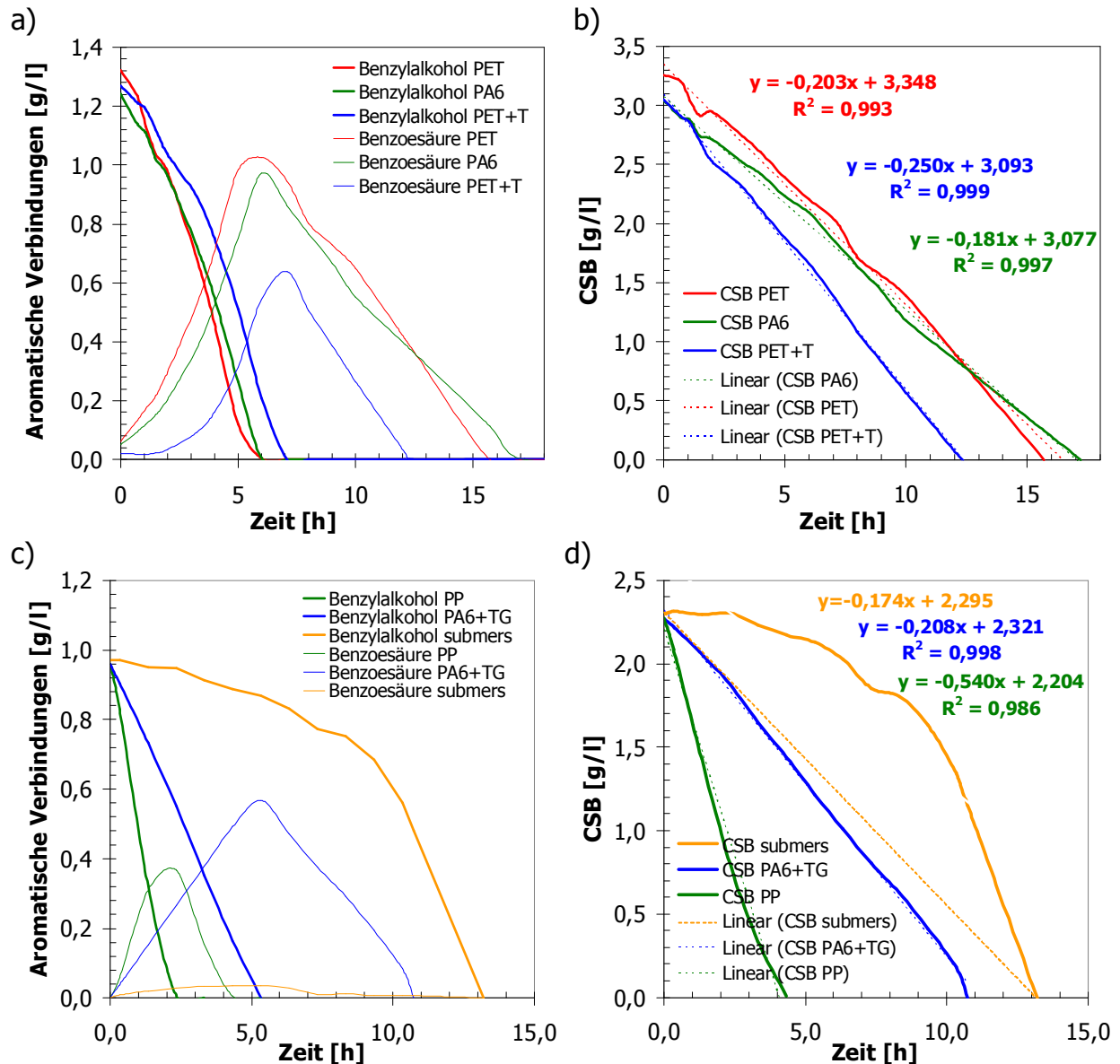
### 3.9 Demonstrator

#### 3.9.1 Abbauversuche

Das Demonstratorexperiment (Airliftreaktor mit Festbett) bietet viele Analyse-möglichkeiten über die Untersuchung des Abbauperlaufs hinaus. Die Analyse des Schadstoffabbaus mit HPLC, anstatt der chemischen Oxidation, gibt einen Einblick auf den Abbauweg eines Schadstoffes durch einen Biofilm, im Vergleich zu planktonischen Mikroorganismen (submers Prozess).

Beim Abbau durch eine Biofilmanwendung wird der primäre Schadstoff (Benzylalkohol) relativ schnell abgebaut (Abb. 47). Die Festbettreaktoren haben den Schadstoff nach 2h (PP), 5h (PA6+TG), 6h (PET, PA6) bzw. 7h (PET+TG) verbraucht, während der Submersreaktor Benzylalkohol erst nach 13h vollständig abgebaut hat (Abb. 47, a und c). Maßgeblich für die Leistung des Submersreaktors ist die Zellkonzentration zu Beginn. Durch den Spülvorgang sind nur geringe Konzentrationen an freien Mikroorganismen vorhanden. Die Situation ist vergleichbar mit einem Abwasserprozess ohne Schlammrückführung, bei dem sich plötzlich die Schadstofflast erhöht.

In den Biofilmreaktoren liegt ein relativ großes Reservoir an aktiver immobilisierter Biomasse vor. Dort beginnt sofort nach Start nicht nur der Abbau sondern auch eine Akkumulation von Benzoesäure. Diese Akkumulation endet erst nach dem vollständigen Abbau der primären C-Quelle (Benzylalkohol). Anschließend erfolgt der Abbau dieses Metaboliten. Beim submersen Prozess kommt es zu keinen nennenswerten Anhäufungen von Metaboliten (Abb. 47, d).



**Abb. 47** - Abbau aromatischer Verbindungen (a, c) bzw. CSB (b, d); repräsentative Experimente; Andere Metabolite lagen unterhalb der Nachweisgrenze.

Generell ist Benzoessäure das einzige Abbauprodukt, das im nachweisbaren Konzentrationsbereich während des Versuchs vorlag. Weder Benzaldehyd noch Catechol konnten in den Proben nachgewiesen werden (siehe auch [Abb. 14](#)). Die Peaks der Benzoessäure sind relativ symmetrisch. Das heißt, die Abbaurate ist ungefähr genauso groß, wie die Produktionsrate im Vorfeld. Das wiederum lässt nur den Schluss zu, dass der Abbau der Benzoessäure bei Anwesenheit von Benzylalkohol im oder am Biofilm größtenteils blockiert ist. Diese Blockierung muss an den Enzymen des direkt anschließenden Prozesses statt finden (Benzoessäure → Catechol). Während die Benzylalkohol-Dehydrogenase (BADH; Oxidation zu Benzaldehyd) und die Benzaldehyd-Dehydrogenase (BZDH; Oxidation zu Benzoessäure) nicht direkt Sauerstoff sondern das

Reduktionsequivalent NAD<sup>+</sup>/NADH aus dem Zellenergiestoffwechsel beziehen (Shaw & Harayama, 1990), benötigt die Toluat-Oxygenase (TO; Oxidation von Benzoesäure zu Catechol) molekularen Sauerstoff zur Umsetzung ihres spezifischen Substrates (Ishida *et al.*, 2002). Die Prozesse der Atmungskette haben durch die Wechselzahlen der Enzyme (Membrangebundene ATPase, ...) Vorrang zu anderen Enzymreaktionen. So kommt es bei limitierter Sauerstoffversorgung, wie im unteren Bereich des downcomer oder tiefer im Biofilm, zu einer Bevorzugung der NAD-abhängigen Reaktionen. Im submersen Bereich sind die einzelnen Bakterien im gesamten Volumen gut mit Sauerstoff versorgt und durchmischt, wodurch dieser Effekt nicht auftritt. Fazit ist, dass bei der Weiterentwicklung dieses Biofilmprozesses das Verhältnis von Begasungszone zu Festbettbereich besser abgestimmt werden muss.

**Tabelle 10** - Zusammenfassung wichtiger Kenngrößen des Demonstrator-Versuchs

Material	PET	PET+TG	PA6	PA6+TG	PP	submers	Einheit
<b>Materialeigenschaften</b>							
Oberflächenspannung	40,3	10,1	34,4	15,0	23,4	-	mN/m
q <sub>max</sub>	13,4E+06	16,9E+06	15,7E+06	22,2E+06	28,1E+06	-	cm <sup>-2</sup>
Spezif. Oberfläche	2714	2672	2063	1676	4301	0	m <sup>2</sup> /m <sup>3</sup>
Porosität	93,6%	93,7%	98,2%	98,5%	90,3%	100,0%	
<b>Abbauleistung</b>							
Abbaurrate (CSB)	4,88	6,00	4,34	4,63	11,80	4,90	g/(l·d)
	<b>2,39</b>	<b>2,89</b>	<b>2,84</b>	<b>3,72</b>	<b>4,03</b>		<b>g/(m<sup>2</sup>·d)</b>
	50,9	101,9	36,5	42,1	114,7		g/(kg(FG)·d)
<b>Biofilmstruktur</b>							
Biomasse TrG	1,51	0,86	2,74	2,97	1,87		g/m <sup>2</sup> (TrG)
Biofilmdicke	46,9	28,3	77,9	88,3	35,1		µm; g/m <sup>2</sup> (FG)
Biofilmdichte	32,1	30,4	35,1	33,6	53,2		mg/cm <sup>3</sup>

Weiterhin ist die nahezu lineare Form des CSB-Abbaus mit Hilfe des Biofilms auffällig (Abb. 47d). Die Leistung und damit die aktive Biomasse scheinen für den Verlauf des Versuches relativ konstant zu bleiben. Bei der submersen Betriebsvariante steigt die Leistung erwartungsgemäß kontinuierlich mit zunehmender Zellzahl an. Die Abbauleistung wurde hier absolut zwischen Anfang und Ende berechnet ( $\Delta_{\text{Schadstoff}}/\Delta_{\text{Zeit}}$ ). Zur Vergleichbarkeit zwischen den Prozessen und den verschiedenen Materialien wurde die Abbauleistungen für jeden Reaktor auf Volumen und Aufwuchsfläche relativiert (Tabelle 10).

Die volumenbezogenen Abbauleistungen zeigen, dass die Biofilmreaktoren gegenüber submers geführten Prozessen mit niedrigem Inoculum vergleichbare Leistungen erbringen können. PP erzielte mehr als die doppelte Leistung ( $11,8 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ) des submersen Prozesses ( $4,9 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ).

Ein Vergleich der aufwuchsflächenabhängigen Leistung der Festbettprozesse hebt PP ebenfalls besonders heraus ( $4 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$ ). Der Biofilm auf den anderen unbeschichteten Trägermaterialien zeigt mittlere Abbauleistungen von  $2,4 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  (PET) beziehungsweise  $2,9 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  (PA6). Die Beschichtung führt jeweils zu einer Erhöhung der Leistung des auf dem Träger etablierten Biofilms ( $2,9 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  für PET+TG und  $3,7 \text{ g}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{d}^{-1}$  für PA6+TG).

Als Maß für die Effizienz der Biomasse wurde die flächenabhängige Leistung mit der Biofilmdicke multipliziert. Es zeigt sich, dass relativ zum immobilisierten Feuchtgewicht die Biofilme auf PP das Dreifache und PET+TG das Doppelte der Leistung im Vergleich zu den anderen drei Biofilmen erzielten.

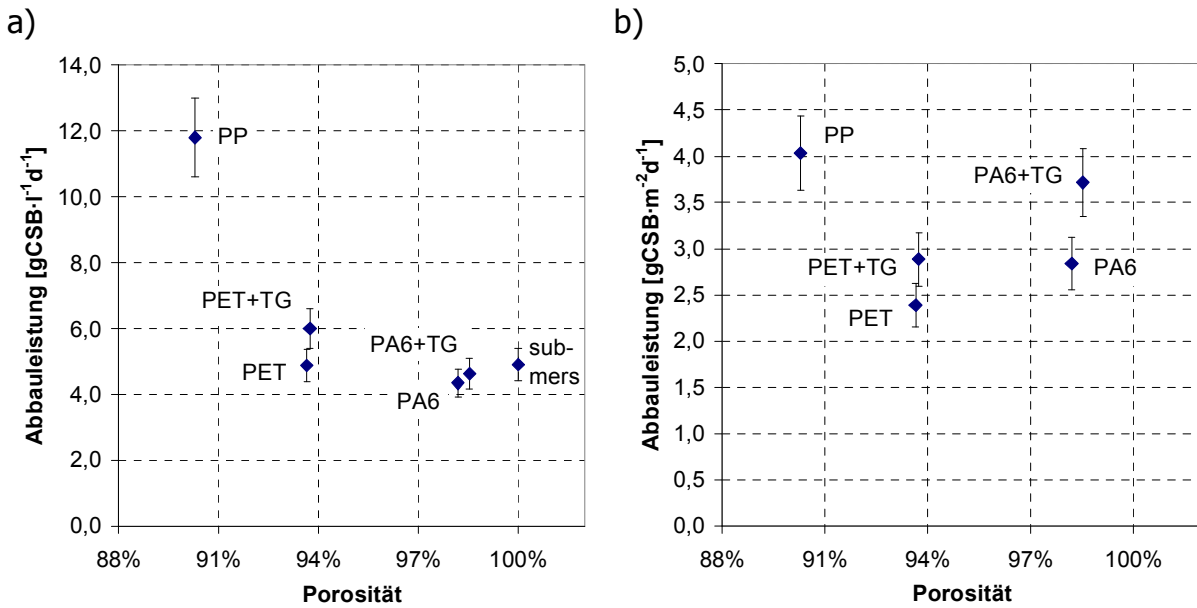
Strukturell ergibt sich, wie oben schon erwähnt (3.6.2), eher eine Abhängigkeit der Biomasse zur Porosität. Die dargestellten Werte (Tabelle 10, unten) sind Durchschnittswerte, als würden glatte homogene Biofilme untersucht werden. Dies ist für Biofilme mit einer niedrigen initialer Adhäsionsdichte ( $q_{\text{max}}$ ) nicht der Fall (3.6.1).

Die Biomassedichten liegen im Bereich von Literaturwerten ( $\sim 33 \text{ mg TG /cm}^3$ ). PP zeigt einen leicht erhöhten Wert ( $53 \text{ mg TG /cm}^3$ ), der aber ebenfalls im Bereich publizierter Daten für Airliftreaktoren liegt (Kwok *et al.*, 1998).

### 3.9.2 Korrelation der Abbauleistung mit verschiedenen Systemparametern

Wie schon in 3.6.2 diskutiert, ist die Biofilm-Biomasseausbeute abhängig von der Nähr- und Sauerstoffversorgung. Eine gute Versorgung durch Konvektion ist wiederum nur bei einer ausreichend offenen Porosität des Trägermaterials gegeben.

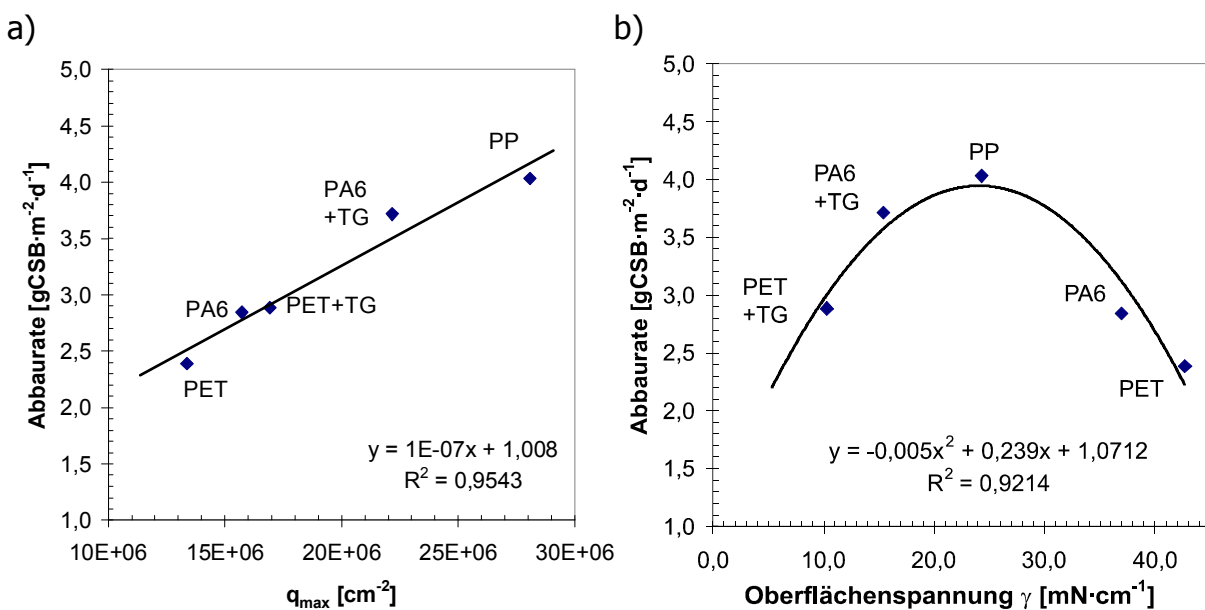
Beim Vergleich der Porosität mit der reaktorvolumenabhängigen Leistung (Abb. 48a) oder der aufwuchsflächenabhängigen Leistung (Abb. 48b), kann kein signifikanter Zusammenhang festgestellt werden. Die volumenbezogene Leistung ist mit abnehmender Porosität höher, doch lässt die Datendichte keine Aussage über mögliche Fit-Funktionen und damit Korrelationsmodelle zu.



**Abb. 48** - Korrelation der Porosität des Trägers mit der a) volumenbezogenen Abbauleistung; b) Abbauleistung pro Aufwuchsfläche

In beiden Graphiken (Abb. 48) wird nochmals deutlich, dass durch die Beschichtung mit Tegophob<sup>®</sup> eine Leistungssteigerung des Biofilms auf dem entsprechenden Material erzielt worden ist.

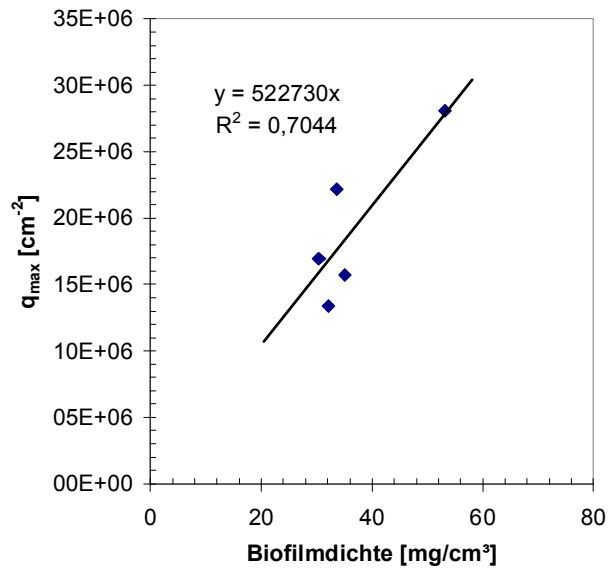
Bei der Korrelation der aufwuchsflächenabhängigen Leistung mit den biologischen Parametern der Initialadhäsion zeigte sich ein lineares Verhältnis für  $q_{max}$  (Abb. 49, a). Für  $\beta$  war der lineare Anstieg wiederum umgekehrt proportional zum Anstieg von  $q_{max}$ . Je höher  $q_{max}$  bzw. niedriger  $\beta$ , desto höher ist die vom Biofilm gezeigte Leistung. Für  $j_0$  war kein linearer oder quadratischer Zusammenhang erkennbar (nicht gezeigt).



**Abb. 49** - Korrelation der Abbaurrate mit a) der initialen Zelldichte  $q_{max}$  und b) der Oberflächenspannung  $\gamma$

Da sich  $q_{\max}$  in deutlichem Zusammenhang mit der Oberflächenspannung (3.4.1) und ebenfalls mit der Abbaurrate (Abb. 49, a) befindet, ist auch der gleiche Zusammenhang zwischen Oberflächenspannung und Abbaurrate zu erwarten (Abb. 49, b).

Es ist nicht davon auszugehen, dass die physiko-chemischen Eigenschaften eines Materials einen direkten Einfluss auf die Abbauleistung durch die Veränderung von Diffusionskoeffizienten oder das



Strömungsbild haben. Es ist jedoch vorstellbar, dass die Zelldichte am Ende der Initialadhäsion, also am Anfang des Biofilmwachstums, einen Einfluss auf die Zelldichte des maturierten Biofilms hat. Ein Indiz für diesen Zusammenhang ist die Korrelation der Biofilmdichte (TrG:FG) mit  $q_{\max}$  (Abb. 50). Aufgrund der geringen Dichten der Biomassen und des bei dem angewendeten Messverfahren erwarteten hohen Fehlers, kann diese Aussage nicht mit absoluter Sicherheit getroffen werden. Wahrscheinlich hat  $q_{\max}$  einen mehr oder weniger großen Anteil an der Ausprägung der Biofilmdichte.

**Abb. 50** - Korrelation der Biofilmdichte mit der initialen Zelldichte  $q_{\max}$

## Zusammenfassung

*An English abstract you can find on page 5.*

Durch die Untersuchung der Zusammenhänge zwischen den Oberflächeneigenschaften der Materialien und der Besiedlungsaktivität durch die Bakterien können in verschiedenen Bereichen Materialien oder Beschichtungen verwendet werden, die den jeweiligen mikrobiologischen Erfordernissen entsprechen. In hygienisch kritischen Bereichen können damit Materialien eingesetzt werden, deren Eigenschaften eine schlechte Besiedelbarkeit bedingen. Demgegenüber können die natürlichen Mechanismen der Adhäsion auf ausgewählten Materialien genutzt werden, um Mikroorganismen für eine industrielle Anwendung (produktiver Biofilm oder Abwasserbehandlung) zu immobilisieren.

Es wurden Materialeigenschaften untersucht, die schon länger im Zusammenhang mit der mikrobiologischen Affinität gesehen wurden. Die physiko-chemischen Eigenschaften

der Benetzbarkeit wurden in der Oberflächenspannung zusammengefasst. Mit den untersuchten Materialien stand ein weites Spektrum aus niedrig- und hochenergetischen Oberflächen zur Verfügung. Als Oberfläche mit der niedrigsten Oberflächenspannung (hydrophob) wurde ein modifizierter Polyester (PET+TG) mit 10,3 mN/m gefunden. Auf der hydrophilen, höherenergetischen Seite wurde für Glas (B33) der höchste Wert von 44,7 mN/m bestimmt.

Um den Einfluss von elektronegativen Ladungen zwischen der Oberfläche und den biologischen Partikeln zu ermitteln, wurde die physiko-chemische Eigenschaft des Zetapotentials bestimmt. Das Zetapotential wurde für die ausgewählten Materialien zwischen -28,3 mV (modifiziertes Glas; B33+TP) und -74,8mV (unmodifiziertes Glas; B33) gemessen. Die Mikroorganismen (*P. putida*; vital) besitzen ein Zetapotential von -20,8 mV.

Die Messwerte des zeitlichen Verlaufs der bakteriellen Adhäsion wurden in eine Funktion mit exponentiellem Anstieg zu einem Maximum eingepasst. Die Parameter dieser Funktion ( $q_{\max}$  und  $\beta$ ) sind ein Maß für die Stärke der Affinität zwischen Bakterien und Materialoberfläche. Beide Parameter haben einen Zusammenhang über die Funktion der initialen Adhäsionsgeschwindigkeit ( $j_0 = q_{\max} \cdot \beta$ ). Da  $j_0$  für die analysierten Oberflächen nahezu konstant ist ( $\sim 500 \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ), fällt die maximale Flächenbelegung ( $q_{\max}$ ) mit steigendem Akkumulationsfaktor ( $\beta$ ) und umgekehrt. Die berechneten Werte für  $q_{\max}$  liegen zwischen  $6,6 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^{-2}$  (B33) und  $28,1 \cdot 10^6 \cdot \text{cm}^{-2}$  (Polypropylen; PP). Für  $\beta$  liegen die Werte zwischen  $0,06 \cdot \text{h}^{-1}$  (PP) und  $0,15 \cdot \text{h}^{-1}$  (B33).

Die Korrelation der Parameter der bakteriellen Adhäsion mit der Oberflächenspannung ergab kein lineares Verhältnis, sondern lief von der Seite hoher und niedriger Oberflächenspannung parabelförmig auf ein Maximum zu. Angenommen wird, dass die Limitierung von der hochenergetischen, hydrophilen Seite durch eine hoch geordnete Schicht von Wassermolekülen („exclusion zone“) bedingt wird. Auf der niedrig energetischen, hydrophoben Seite wird die Barrierefunktion durch den „depletion layer“ vermutet. Unmittelbar angrenzende Wassermoleküle über der Materialoberfläche befinden sich im Vergleich zu freiem, weiter entfernten Wasser, in einem speziellen, hohen Energiestatus. Es wird angenommen, dass die Reaktion zum Austausch von Molekülen in den „depletion layer“ energetisch ungünstig ist. Damit besteht neben der hydrophilen Barriere ein hydrophobes Limit, das die Adhäsion von Mikroorganismen minimiert.



Das Verhältnis der bakteriellen Adhäsion zum Zetapotential ist ungefähr linear, je elektronegativer, desto ungünstiger die Adhäsion. Ursache ist die leicht negative Ladung der bakteriellen Zellwand der verwendeten Spezies und der dadurch verursachten elektrostatischen Abstoßung von negativ geladenen Oberflächen.

Das sich an die Adhäsion der Bakterien anschließende Wachstum wird in der Phase der Mikrokolonien noch von der initialen Zelldichte ( $q_{\max}$ ) bestimmt. Simulationen zeigen eine stärkere Biofilmbildung bei niedriger initialer Zelldichte. Im stationären Zustand sind die strukturellen Parameter des Biofilms von anderen Systemparametern wie der Versorgung mit Sauerstoff (Trägerporosität) bestimmt.

Im Hinblick auf die Abbauleistung besteht nur ein leichter Trend im Zusammenhang von o. g. Versorgungseigenschaften, beeinflusst durch die Porosität des Trägers, und der volumenbezogenen Abbauleistung. Mit der flächenbezogenen Abbauleistung besteht wiederum ein stärkerer Zusammenhang mit der initialen Adhäsionsdichte ( $q_{\max}$ ). Wahrscheinlich ist die flächenbezogene Zelldichte von größerer Bedeutung als die Dicke des ausgewachsenen Biofilms.

Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten eine Auswirkung der Oberflächenspannung des Materials ( $\gamma_s$ ) auf den Biofilmwachstumsprozess bis hin zur Abbauleistung an. Für den untersuchten Organismus wurde das Material (PP) mit der optimalen Oberflächenspannung bestimmt, die eine optimale Immobilisierung und hohe Abbauleistung bewirkt.

Gleichermaßen können die Ergebnisse der Ausgangspunkt für Überlegungen eines neuen Antifoulingkonzepts mit extrem niedrig energetischen Oberflächen sein.

## Danksagung

Bei Prof. Dr. Ing. Klaus Liefeith bedanke ich mich für die Überlassung des Themas, die Möglichkeit es im Fachbereich Biowerkstoffe des Instituts für Bioprocess- und Analysenmesstechnik e. V. in Heiligenstadt bearbeiten zu dürfen und seine Hilfe vor allem durch Projektbesprechungen oder bei der Revision dieser Dissertation.

Ein herzliches Dankeschön an Prof. Dr. rer. nat. Harald Horn, der die externe Betreuung dieser Arbeit übernommen hat. Vielen Dank für die konstruktiven Diskussionen und die motivierenden Worte.

Dr. Ing. Marion Frant danke ich für die praktische Unterstützung der Arbeiten, für ihr offenes Ohr bei den häufigen fachlichen Diskussionen, ihre Hilfe bei Fragen im Projektmanagement und für die angenehme Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Verena Schenke und Juliane Zirm, für die unschätzbare und zuverlässige Unterstützung im Labor.

Jürgen Rost danke ich für seine Arbeit an der Simulationssoftware.

Den Kooperationspartnern aus dem TITV in Greiz, Dr. Wolfgang Scheibner, Frau Monika Weißer und Herrn Danny Schwabe, vielen Dank für die Bereitstellung der Materialien, die Durchführung der Beschichtungen und die hilfreichen Projektmeetings.

Vielen lieben Dank an Steffi Grohmann, Stefan Wiedemeier, Dr. Jörg Schemberg und all den anderen netten Kollegen im iba - Heiligenstadt, für die angenehme und freundliche Arbeitsatmosphäre.

Vielen Dank natürlich auch meiner Familie, meiner Frau Judith und meiner Tochter Paula, die mir seelischen Beistand, Motivation und Inspiration gegeben haben.

## 4 Referenzen

**Absolom, D. R., Lamberti, F. V., Policova, Z., Zingg, W., Van Oss, C. J. & Neumann, A. W. (1983).** Surface thermodynamics of bacterial adhesion. *Applied and Environmental Microbiology* **46**, 90.

**Abu-Lail, N. I. & Camesano, T. A. (2002).** Elasticity of *Pseudomonas putida* KT2442 surface polymers probed with single-molecule force microscopy. *Langmuir* **18**, 4071-4081.

**Adachi, K., Tsurumoto, T., Yonekura, A., Nishimura, S., Kajiyama, S., Hirakata, Y. & Shindo, H. (2007).** New quantitative image analysis of staphylococcal biofilms on the surfaces of nontranslucent metallic biomaterials. *J Orthop Sci* **12**, 178-184.

**Alpkvist, E., Picioreanu, C., van Loosdrecht, M. & Heyden, A. (2006).** Three dimensional biofilm model with individual cells and continuum EPS matrix. *Biotechnology and Bioengineering* **94**, 961-979.

**Anderl, J. N., Franklin, M. J. & Stewart, P. S. (2000).** Role of Antibiotic Penetration Limitation in *Klebsiella pneumoniae* Biofilm Resistance to Ampicillin and Ciprofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **44**, 1818-1824.

**Balestrino, D., Ghigo, J. M., Charbonnel, N., Haagensen, J. A. & Forestier, C. (2008).** The characterization of functions involved in the establishment and maturation of *Klebsiella pneumoniae* in vitro biofilm reveals dual roles for surface exopolysaccharides. *Environ Microbiol* **10**, 685-701.

**Bayer, A. S., Park, S., Ramos, M. C., Nast, C. C., Eftekhar, F. & Schiller, N. L. (1992).** Effects of alginase on the natural history and antibiotic therapy of experimental endocarditis caused by mucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity* **60**, 3979-3985.

**Beyenal, H., Lewandowski, Z. & Harkin, G. (2004).** Quantifying Biofilm Structure: Facts and Fiction. *Biofouling* **20**, 1-23.

**Biffinger, J. C., Pietron, J., Ray, R., Little, B. & Ringeisen, B. R. (2007).** A biofilm enhanced miniature microbial fuel cell using *Shewanella oneidensis* DSP10 and oxygen reduction cathodes. *Biosens Bioelectron* **22**, 1672-1679.

**Bos, R., van der Mei, H. C. & Busscher, H. J. (1999).** Physico-chemistry of initial microbial adhesive interactions--its mechanisms and methods for study. *FEMS Microbiol Rev* **23**, 179-230.

**Branda, S. S., Vik, Å., Friedman, L. & Kolter, R. (2005).** Biofilms: the matrix revisited. *Trends in Microbiology* **13**, 20-26.

**Bruer, S. M., Student, P. D., Powell, N. & Smith, G. (2005).** Three-Dimensionally Knit Spacer Fabrics: A Review of Production Techniques and Applications. *Journal of Textile and Apparel* **4**.

**Buksek, H., Luxbacher, T. & Petrinic, I. (2010).** Zeta Potential Determination of Polymeric Materials Using Two Differently Designed Measuring Cells of an Electrokinetic Analyzer. *Acta Chim Slov* **57**, 700-706.

- Burlage, R. S., Hooper, S. W. & Sayler, G. S. (1989).** The TOL (pWW0) catabolic plasmid. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 1323.
- Busscher, H. J. & Van der Mei, H. C. (1997).** Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Advances in Dental Research* **11**, 24.
- Busscher, H. J. & van der Mei, H. C. (2006).** Microbial adhesion in flow displacement systems. *Clinical microbiology reviews* **19**, 127.
- Busscher, H. J., van de Belt-Gritter, B., Dijkstra, R. J. B., Norde, W. & van der Mei, H. C. (2008).** Streptococcus mutans and Streptococcus intermedius adhesion to fibronectin films are oppositely influenced by ionic strength. *Langmuir* **24**, 10968-10973.
- Chambless, J. D., Hunt, S. M. & Stewart, P. S. (2006).** A Three-Dimensional Computer Model of Four Hypothetical Mechanisms Protecting Biofilms from Antimicrobials. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 2005.
- Chang, H. T., Parulekar, S. J. & Ahmed, M. (2005).** A dual-growth kinetic model for biological wastewater reactors. *Biotechnol Prog* **21**, 423-431.
- Clint, J. & Wicks, A. (2001).** Adhesion under water: surface energy considerations. *International Journal of Adhesion & Adhesives* **21**, 267-273.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R. & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial Biofilms. *Annual Reviews in Microbiology* **49**, 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science* **284**, 1318.
- Dalwai, F., Spratt, D. A. & Pratten, J. (2006).** Modeling shifts in microbial populations associated with health or disease. *Appl Environ Microbiol* **72**, 3678-3684.
- de Beer, D., Stoodley, P. & Lewandowski, Z. (1994).** Liquid flow in heterogeneous biofilms. *Biotechnology and Bioengineering* **44**, 636-641.
- de Beer, D., Stoodley, P. & Lewandowski, Z. (1997).** Measurement of local diffusion coefficients in biofilms by microinjection and confocal microscopy. *Biotechnology and Bioengineering* **53**, 151-158.
- Della Volpe, C. & Siboni, S. (2000).** Acidbase surface free energies of solids and the definition of scales in the Goodvan OssChaudhury theory. *Journal of adhesion science and technology* **14**, 235-272.
- Diaz, L. F., Munoz, R., Bordel, S. & Villaverde, S. (2008).** Toluene biodegradation by Pseudomonas putida F1: targeting culture stability in long-term operation. *Biodegradation* **19**, 197-208.
- Diels, L. (2004).** Final Report: Multifunctional permeable barriers carrying well-performing microbial biofilms for treatment of mixed pollutant plumes. In *Cell factory*, pp. 561. Mol (Belgium): Vlaamse instelling voor technologisch onderzoek.
- Downing, L. S. & Nerenberg, R. (2007).** Kinetics of microbial bromate reduction in a hydrogen-oxidizing, denitrifying biofilm reactor. *Biotechnol Bioeng* **98**, 543-550.

- Edwards, K. J., Bond, P. L., Gihring, T. M. & Banfield, J. F. (2000).** An Archaeal Iron-Oxidizing Extreme Acidophile Important in Acid Mine Drainage. *Science* **287**, 1796.
- Flemming, H. C. & Schaule, G. (1994).** Mikrobielle Werkstoffzerstörung-Biofilm und Biofouling. *Werkstoffe und Korrosion* **45**, 29-30.
- Fox, H. W. & Zisman, W. A. (1950).** The spreading of liquids on low energy surfaces. I. polytetrafluoroethylene\* 1. *Journal of Colloid Science* **5**, 514-531.
- Fux, C. A., Costerton, J. W., Stewart, P. S. & Stoodley, P. (2005).** Survival strategies of infectious biofilms. *Trends Microbiol* **13**, 34-40.
- Ge, Z., Cahill, D. G. & Braun, P. V. (2006).** Thermal conductance of hydrophilic and hydrophobic interfaces. *Physical review letters* **96**, 186101.
- Glud, R. N., Fossing, H. & Jørgensen, B. B. (2007).** Effect of the diffusive boundary layer on benthic mineralization and O<sub>2</sub> distribution: A theoretical model analysis. *Limnol Oceanogr* **52**, 547-557.
- Gottenbos, B. (2001).** The development of antimicrobial biomaterial surfaces, pp. 120. Groningen: University of Groningen.
- Gottenbos, B., Grijpma, D. W., Van der Mei, H. C., Feijen, J. & Busscher, H. J. (2001).** Antimicrobial effects of positively charged surfaces on adhering gram-positive and gram-negative bacteria. *J Antimicrob chemotherapy* **48**, 7-13.
- Guffanti, A. A., Monti, L. G., Blanco, R., Ozick, D. & Krulwich, T. A. (1979).**  $\beta$ -Galactoside Transport in an Alkaline-tolerant Strain of *Bacillus circulans*. *Journal of General Microbiology* **112**, 161.
- Haack, S. K., Garchow, H., Odelson, D. A., Forney, L. J. & Klug, M. J. (1994).** Accuracy, Reproducibility, and Interpretation of Fatty Acid Methyl Ester Profiles of Model Bacterial Communities. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2483.
- Haisch, C. & Niessner, R. (2007).** Visualisation of transient processes in biofilms by optical coherence tomography. *Water Res* **41**, 2467-2472.
- Henze, M., van Loosdrecht, M. C. M., Ekama, G. A. & Brdjanovic, D. (2008).** Wastewater Treatment Development. *Biological wastewater treatment: principles, modelling and design*, 1.
- Hille, A., He, M., Ochmann, C., Neu, T. R. & Horn, H. (2008).** Application of two component biodegradable carriers in a particle-fixed biofilm airlift suspension reactor: development and structure of biofilms. *Bioprocess Biosyst Eng*.
- Hoehn, R. C. & Ray, A. D. (1973).** Effects of thickness on bacterial film. *J Water Pollut Control Fed* **45**, 2302-2320.
- Hu, Z., Hidalgo, G., Houston, P. L., Hay, A. G., Shuler, M. L., Abruna, H. D., Ghiorse, W. C. & Lion, L. W. (2005).** Determination of spatial distributions of zinc and active biomass in microbial biofilms by two-photon laser scanning microscopy. *Appl Environ Microbiol* **71**, 4014-4021.

- Hwang, G., Ban, Y. M., Lee, C. H., Chung, C. H. & Ahn, I. S. (2008).** Adhesion of *Pseudomonas putida* NCIB 9816-4 to a naphthalene-contaminated soil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **62**, 91-96.
- Ishida, T., Kita, A., Miki, K., Nozaki, M. & Horiike, K. (2002).** Structure and reaction mechanism of catechol 2, 3-dioxygenase (metapyrocatechase), pp. 213-220: Elsevier.
- Israelachvili, J. (1996).** Role of hydration and water structure in biological and colloidal interactions. *Nature* **379**, 219-225.
- Jucker, B. A., Harms, H. & Zehnder, A. J. (1996).** Adhesion of the positively charged bacterium *Stenotrophomonas* (*Xanthomonas*) *maltophilia* 70401 to glass and Teflon. *Journal of Bacteriology* **178**, 5472-5479.
- Koch, G., Kuhni, M., Rieger, L. & Siegrist, H. (2001a).** Calibration and validation of an ASM3-based steady-state model for activated sludge systems--part II: Prediction of phosphorus removal. *Water Res* **35**, 2246-2255.
- Koch, G., Kühni, M. & Siegrist, H. (2001b).** Calibration and validation of an ASM3-based steady-state model for activated sludge systems--part I: prediction of nitrogen removal and sludge production. *Water Research* **35**, 2235-2245.
- Komlos, J., Cunningham, A. B., Camper, A. K. & Sharp, R. R. (2005).** Interaction of *Klebsiella oxytoca* and *Burkholderia cepacia* in dual-species batch cultures and biofilms as a function of growth rate and substrate concentration. *Microb Ecol* **49**, 114-125.
- Komlos, J., Cunningham, A. B., Camper, A. K. & Sharp, R. R. (2006).** Effect of substrate concentration on dual-species biofilm population densities of *Klebsiella oxytoca* and *Burkholderia cepacia* in porous media. *Biotechnol Bioeng* **93**, 434-442.
- Kühl, M., Rickelt, L. F. & Thar, R. (2007).** Combined Imaging of Bacteria and Oxygen in Biofilms? *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 6289-6295.
- Kwok, W. K., Picioreanu, C., Ong, S. L., Van Loosdrecht, M. C. M., Ng, W. J. & Heijnen, J. J. (1998).** Influence of biomass production and detachment forces on biofilm structures in a biofilm airlift suspension reactor. *Biotechnology and Bioengineering* **58**, 400-407.
- Kwon, O., Devarakonda, S. B., Sankovic, J. M. & Banerjee, R. K. (2008).** Oxygen transport and consumption by suspended cells in microgravity: a multiphase analysis. *Biotechnol Bioeng* **99**, 99-107.
- Lawrence, J. R., Swerhone, G. D. W., Leppard, G. G., Araki, T., Zhang, X., West, M. M. & Hitchcock, A. P. (2003).** Scanning Transmission X-Ray, Laser Scanning, and Transmission Electron Microscopy Mapping of the Exopolymeric Matrix of Microbial Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **69**, 5543-5554.
- Lazarova, V. & Manem, J. (1995).** Biofilm characterization and activity analysis in water and wastewater treatment. *Water Research* **29**, 2227-2245.
- Li, B. & Logan, B. E. (2004).** Bacterial adhesion to glass and metal-oxide surfaces. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **36**, 81-90.

**Li, M., Peng, L., Ji, Z., Xu, J. & Li, S. (2008).** Establishment and characterization of dual-species biofilms formed from a 3,5-dinitrobenzoic-degrading strain and bacteria with high biofilm-forming capabilities. *FEMS Microbiol Lett* **278**, 15-21.

**Lum, K., Chandler, D. & Weeks, J. D. (1999).** Hydrophobicity at small and large length scales. *The Journal of Physical Chemistry B* **103**, 4570-4577.

**Mandlik, A., Swierczynski, A., Das, A. & Ton-That, H. (2008).** Pili in Gram-positive bacteria: assembly, involvement in colonization and biofilm development. *Trends Microbiol* **16**, 33-40.

**Massol-Deya, A. A., Whallon, J., Hickey, R. F. & Tiedje, J. M. (1995).** Channel structures in aerobic biofilms of fixed-film reactors treating contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* **61**, 769-777.

**Möhle, R. B. (2008).** An Analytic-Synthetic Approach Combining Mathematical Modeling and Experiments: Towards an Understanding of Biofilm Systems: Universitätsbibliothek Braunschweig.

**Mondragon-Parada, M. E., Ruiz-Ordaz, N., Tafoya-Garnica, A., Juarez-Ramirez, C., Curiel-Quesada, E. & Galindez-Mayer, J. (2008).** Chemostat selection of a bacterial community able to degrade s-triazinic compounds: continuous simazine biodegradation in a multi-stage packed bed biofilm reactor. *J Ind Microbiol Biotechnol* **35**, 767-776.

**Münch, C., Neu, T., Kusch, P. & Roske, I. (2007).** The root surface as the definitive detail for microbial transformation processes in constructed wetlands--a biofilm characteristic. *Water Sci Technol* **56**, 271-276.

**Muyzer, G. & Smalla, K. (1998).** Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**, 127-141.

**Nadell, C. D., Xavier, J. B., Levin, S. A. & Foster, K. R. (2008).** The Evolution of Quorum Sensing in Bacterial Biofilms. *PLoS Biol* **6**, e14.

**Nancharaiah, Y. V., Wattiau, P., Wuertz, S., Bathe, S., Mohan, S. V., Wilderer, P. A. & Hausner, M. (2003).** Dual labeling of *Pseudomonas putida* with fluorescent proteins for in situ monitoring of conjugal transfer of the TOL plasmid. *Appl Environ Microbiol* **69**, 4846-4852.

**Neilands, J. B. (1995).** Siderophores: structure and function of microbial iron transport compounds. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 26723-26726.

**Neu, T., Swerhone, G. D. & Lawrence, J. R. (2001).** Assessment of lectin-binding analysis for in situ detection of glycoconjugates in biofilm systems. *Microbiology* **147**, 299-313.

**Owens, D. K. & Wendt, R. C. (1969).** Estimation of the polar parameters of the surface tension of liquids by contact angle measurements on gels. *J Appl Polym Sci* **13**, 1741-1747.

**Paerl, H. W. (1998).** Microbial Phototrophic, Heterotrophic, and Diazotrophic Activities Associated with Aggregates in the Permanent Ice Cover of Lake Bonney, Antarctica. *Microbial Ecology* **36**, 221-230.

- Piciooreanu, C., Van Loosdrecht, M. C. M. & Heijnen, J. J. (1998).** Mathematical modeling of biofilm structure with a hybrid differential-discrete cellular automaton approach. *Biotechnology and Bioengineering* **58**, 101-116.
- Piciooreanu, C., Van Loosdrecht, M. C. M. & Heijnen, J. J. (2000).** Effect of diffusive and convective substrate transport on biofilm structure formation: a two-dimensional modeling study. *Biotechnology and Bioengineering* **69**, 504-515.
- Piciooreanu, C., van Loosdrecht, M. C. M. & Heijnen, J. J. (2001).** Two-dimensional model of biofilm detachment caused by internal stress from liquid flow. *Biotechnology and Bioengineering* **72**, 205-218.
- Piciooreanu, C., Xavier, J. B. & van Loosdrecht, M. C. M. (2004).** Advances in mathematical modeling of biofilm structure. *Biofilms* **1**, 337-349.
- Rijnaarts, H. H. M., Norde, W., Lyklema, J. & Zehnder, A. J. B. (1999).** DLVO and steric contributions to bacterial deposition in media of different ionic strengths. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **14**, 179-195.
- Rishell, S., Casey, E., Glennon, B. & Hamer, G. (2004).** Characteristics of a methanotrophic culture in a membrane-aerated biofilm reactor. *Biotechnol Prog* **20**, 1082-1090.
- Roosjen, A., Kaper, H., Van der Mei, H. C., Norde, W. & Busscher, H. J. (2003).** Inhibition of adhesion of yeasts and bacteria by polyethylene oxide-brushes on glass in a parallel plate flow chamber. *Microbiology* **149**, 3239-3246.
- Saien, J. & Nejati, H. (2007).** Enhanced photocatalytic degradation of pollutants in petroleum refinery wastewater under mild conditions. *J Hazard Mater* **148**, 491-495.
- Saravanan, V. & Sreekrishnan, T. R. (2008).** A mathematical model for a hybrid anaerobic reactor. *J Environ Manage* **88**, 136-146.
- Saremba, S., Steffens, M., Wulfhorst, B. & Hirt, P. (1997).** Polyamidfasern. In *Melliand Textilberichte*, pp. 771-794. Aachen: Institut für Textiltechnik der RWTH Aachen.
- Saremba, S., Steffens, M., Wulfhorst, B. & Hirt, P. (1998).** Polyamidfasern. In *Melliand Textilberichte*, pp. 771-794. Aachen: Institut für Textiltechnik der RWTH Aachen.
- Schmenk, B., Miez-Meyer, R., Steffens, M., Wulfhorst, B. & Gleixner, G. (2002).** Polypropylenfasern. In *Melliand Textilberichte*, pp. 601-618. Aachen: Institut für Textiltechnik der RWTH Aachen.
- Sharma, M., Visai, L., Bragheri, F., Cristiani, I., Gupta, P. K. & Speziale, P. (2008).** Toluidine blue-mediated photodynamic effects on staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother* **52**, 299-305.
- Shaw, J. P. & Harayama, S. (1990).** Purification and characterisation of TOL plasmid encoded benzyl alcohol dehydrogenase and benzaldehyde dehydrogenase of *Pseudomonas putida*. *European journal of biochemistry* **191**, 705-714.
- Steinberger, R. E. & Holden, P. A. (2005).** Extracellular DNA in single- and multiple-species unsaturated biofilms. *Appl Environ Microbiol* **71**, 5404-5410.



**Stewart, P. S., Roe, F., Rayner, J., Elkins, J. G., Lewandowski, Z., Ochsner, U. A. & Hassett, D. J. (2000).** Effect of Catalase on Hydrogen Peroxide Penetration into *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 836-838.

**Stewart, P. S. (2003).** Diffusion in biofilms. *Journal of Bacteriology* **185**, 1485.

**Stoodley, P. (1994).** Liquid Flow in Biofilm Systems. *Applied and Environmental Microbiology* **60**, 2711.

**Taherzadeh, D., Picioreanu, C., Küttler, U., Simone, A., Wall, W. A. & Horn, H. (2010).** Computational study of the drag and oscillatory movement of biofilm streamers in fast flows. *Biotechnology and Bioengineering* **105**, 600-610.

**Tarasevich, Y. I. (2011).** State and structure of water in vicinity of hydrophobic surfaces. *Colloid Journal* **73**, 257-266.

**Tarre, S., Shlafman, E., Beliavski, M. & Green, M. (2007).** Changes in ammonia oxidiser population during transition to low pH in a biofilm reactor starting with *Nitrosomonas europaea*. *Water Sci Technol* **55**, 363-368.

**Taylor, R. L., Verran, J., Lees, G. C. & Ward, A. J. P. (1998).** The influence of substratum topography on bacterial adhesion to polymethyl methacrylate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* **9**, 17-22.

**Tetzlaff, G., Dahmen, M. & Wulforth, B. (1993).** Polyesterfasern. In *Melliand Textilberichte*. Aachen: Institut für Textiltechnik der RWTH Aachen.

**van der Mei, H. C., Free, R. H., Elving, G. J., Van Weissenbruch, R., Albers, F. W. J. & Busscher, H. J. (2000).** Effect of probiotic bacteria on prevalence of yeasts in oropharyngeal biofilms on silicone rubber voice prostheses in vitro. *Journal of Medical Microbiology* **49**, 713.

**Van Kessel, J. S. & Russell, J. B. (1992).** Energetics of arginine and lysine transport by whole cells and membrane vesicles of strain SR, a monensin-sensitive ruminal bacterium. *Applied and Environmental Microbiology* **58**, 969.

**van Merode, A. E. J., Duval, J. F. L., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. & Krom, B. P. (2008).** Increased adhesion of *Enterococcus faecalis* strains with bimodal electrophoretic mobility distributions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **64**, 302-306.

**Van Oss, C. J., Chaudhury, M. K. & Good, R. J. (1988).** Interfacial Lifshitz-van der Waals and polar interactions in macroscopic systems. *Chemical Reviews* **88**, 927-941.

**Vogelsang, C., Grung, M., Jantsch, T. G., Tollefsen, K. E. & Liltved, H. (2006).** Occurrence and removal of selected organic micropollutants at mechanical, chemical and advanced wastewater treatment plants in Norway. *Water Res* **40**, 3559-3570.

**Vogler, E. A. (1999).** Water and the acute biological response to surfaces. *Journal of Biomaterials Science-Polymer Edition* **10**, 1015-1046.

**von der Schulenburg, D. A., Gladden, L. F. & Johns, M. L. (2007).** Modelling biofilm-modified hydrodynamics in 3D. *Water Sci Technol* **55**, 275-281.

- Wagner, M., Manz, B., Volke, F., Neu, T. R. & Horn, H. (2010a).** Online assessment of biofilm development, sloughing and forced detachment in tube reactor by means of magnetic resonance microscopy. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Wagner, M., Taherzadeh, D., Haisch, C. & Horn, H. (2010b).** Investigation of the mesoscale structure and volumetric features of biofilms using optical coherence tomography. *Biotechnology and Bioengineering*.
- Wang, Z., Li, J., Hesham Ael, L., He, S., Zhang, Y. & Yang, M. (2007).** Co-variations of bacterial composition and catabolic genes related to PAH degradation in a produced water treatment system consisting of successive anoxic and aerobic units. *Sci Total Environ* **373**, 356-362.
- Ward, D. M., Ferris, M. J., Nold, S. C. & Bateson, M. M. (1998).** A Natural View of Microbial Biodiversity within Hot Spring Cyanobacterial Mat Communities. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 1353-1370.
- Ward, J. P., King, J. R., Koerber, A. J., Croft, J. M., Sockett, R. E. & Williams, P. (2003).** Early development and quorum sensing in bacterial biofilms. *J Math Biol* **47**, 23-55.
- Watnick, P. & Kolter, R. (2000).** Biofilm, City of Microbes, pp. 2675-2679: Am Soc Microbiol.
- Watson, S. W. & Hobbie, J. E. (1979).** Measurement of bacterial biomass as lipopolysaccharide. *ASTM special technical publication*, 82-88.
- Weber, S. D., Ludwig, W., Schleifer, K. H. & Fried, J. (2007).** Microbial composition and structure of aerobic granular sewage biofilms. *Appl Environ Microbiol* **73**, 6233-6240.
- Welker, I. A. (2004).** Schadstoffströme im urbanen Wasserkreislauf - Aufkommen und Verteilung, insbesondere in den Abwasserentsorgungssystemen. In *Fachgebiet Siedlungswasserwirtschaft*, pp. 445. Kaiserslautern: Technische Universität Kaiserslautern.
- Werner, C., Korber, H., Zimmermann, R., Dukhin, S. & Jacobasch, H. J. (1998).** Extended Electrokinetic Characterization of Flat Solid Surfaces\* 1. *Journal of colloid and interface science* **208**, 329-346.
- Williams, P. (2000).** Quorum sensing and the population-dependent control of virulence. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **355**, 667-680.
- Wong, L. & Amy, C. (1998).** Biofilms in Food Processing Environments. *Journal of Dairy Science* **81**, 2765.
- Xavier, J. B. & Foster, K. R. (2007).** From the Cover: Cooperation and conflict in microbial biofilms. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 876.
- Xavier Jde, B., Picioreanu, C. & van Loosdrecht, M. C. (2005).** A general description of detachment for multidimensional modelling of biofilms. *Biotechnol Bioeng* **91**, 651-669.
- Zhang, X., Bishop, P. L. & Kupferle, M. J. (1998).** Measurement of polysaccharides and proteins in biofilm extracellular polymers. *Water Science & Technology* **37**, 345-348.

**Zheng, J., Chin, W. C., Khijniak, E. & Pollack, G. H. (2006).** Surfaces and interfacial water: Evidence that hydrophilic surfaces have long-range impact. *Advances in Colloid and Interface Science* **127**, 19-27.

**Zilli, M., Palazzi, E., Sene, L., Converti, A. & Del Borghi, M. (2001).** Toluene and styrene removal from air in biofilters. *Process Biochemistry* **37**, 423-429.

*Eigene Publikationen im Zusammenhang mit dieser Arbeit*

### Journal article

**Montag, D., Frant, M., Horn, H., Liefeith, K. (2012).** Dependence of the initial adhesion of biofilm forming *Pseudomonas putida* mt2 on physico-chemical material properties. *Biofouling* (eingereicht)

### Vortrag

**Montag, D., Liefeith, K. (30.05.2011).** Optimierung der Grenzfläche zwischen Substrat und Biofilm für die biologische Abwasserbehandlung in einem textilen Festbettreaktor. *Vortrags- und Diskussionstagung der DECHEMA: Bioverfahrenstechnik an Grenzflächen*, Tagungsband, 18-19.

### Abschlussbericht

**(Juni 2011)** Entwicklung von 3D-Textilien mit sehr großen reaktiv wirksamen Oberflächen für modulare Bioreaktorsysteme zur biologischen Abwasserreinigung. **AiF - IGF (ZUTECH) Vorh.Nr. 277 ZBR**

### Poster

**Montag, D., Liefeith, K. (13.-15.09.2010).** Materialcharakterisierung und Materialbestimmung für biologische Wasserbehandlung in einem Biofilmreaktor. *IFAT ENTSORGA 2010*, München, (Ausstellung des Demonstrators).

**Montag, D., Scheibner W., Möhring, U., Liefeith, K. (24.-26.05.2011).** Grenzflächencharakterisierung und Materialbestimmung für eine optimierte biologische Wasserbehandlung in einem Biofilmreaktor mit textilem Festbett. *Techtextil 2011*, Frankfurt, (Ausstellung des Labor-Säulen-Bioreaktors).

Chemische Eigenschaften von Toluol und seinen Metaboliten (Anhang)

Substanz	Toluol	Benzyl- alkohol	Benz- aldehyd	Benzoe- säure	Catechol	
Summenformel	C7H9	C7H8O	C7H6O	C7H6O2	C6H6O8	
Schmelzpunkt °C		-95	-15	-26	<b>122</b>	105
Siedepunkt °C	111	206	179	179	<b>250</b>	245
Dampfdruck 20° mbar	29	0,027	0,8	0,8	<b>0</b>	0,2
Dichte g/cm <sup>3</sup> 20°C	0,87	1,04	1,05	1,05	1,27	1,34
Molare Masse	92,14	108,14	106,12	122,12	122,12	110,11
Wasserlöslichkeit 20°C mg/l	470	<b>39.000</b>	3.000	2.900	2.900	430.000
Wasserlöslichkeit 20°C µl/l	540	37.500	2.857	2.283	2.283	320.896
log K <sub>ow</sub>	2,73	1,05	1,48	1,18	1,18	0,88
HPLC-Fläche/mMol	8,660E+05	9,979E+05	3,401E+05	1,636E+06		
HPLC-RT-Messwerte min	14,83	2,79	4,41	3,14	3,14	2,21
CSB gO <sub>2</sub> /gSubstanz	3,124	2,366	2,712	2,139		

