

# REPORT

Contract: N/A

Cicerostr. 24  
D-10709 Berlin  
Germany  
Tel +49 (0)30 536 53 800  
Fax +49 (0)30 536 53 888  
www.kompetenz-wasser.de

## **Kausale Zusammenhänge zwischen den Signalen einer optischen Multiparametersonde und Biofilmwachstum in wasserführenden Rohrnetzen *Erste Untersuchungen***

Project acronym: BIOSENS

by

Dr. K.-H. Mittenzwey, Optosens GmbH Berlin  
Prof. Dr. U. Szewzyk, TU Berlin  
Dipl.-Ing. V. Dworak, BBPT GmbH Berlin  
Dr. D. Schulze, UVT Ing.-Büro für Umwelt- und Verfahrenstechnik GbR, Berlin

for

Kompetenzzentrum Wasser Berlin gGmbH

Preparation of this report was financed in part through funds provided by Veolia Water



Berlin, Germany

2006

## **Important Legal Notice**

**Disclaimer:** The information in this publication was considered technically sound by the consensus of persons engaged in the development and approval of the document at the time it was developed. KWB disclaims liability to the full extent for any personal injury, property, or other damages of any nature whatsoever, whether special, indirect, consequential, or compensatory, directly or indirectly resulting from the publication, use of application, or reliance on this document.

KWB disclaims and makes no guaranty or warranty, expressed or implied, as to the accuracy or completeness of any information published herein. It is expressly pointed out that the information and results given in this publication may be out of date due to subsequent modifications. In addition, KWB disclaims and makes no warranty that the information in this document will fulfill any of your particular purposes or needs.

The disclaimer on hand neither seeks to restrict nor to exclude KWB's liability against all relevant national statutory provisions.

---

## **Wichtiger rechtlicher Hinweis**

**Haftungsausschluss** Die in dieser Publikation bereitgestellte Information wurde zum Zeitpunkt der Erstellung im Konsens mit den bei Entwicklung und Anfertigung des Dokumentes beteiligten Personen als technisch einwandfrei befunden. KWB schließt vollumfänglich die Haftung für jegliche Personen-, Sach- oder sonstige Schäden aus, ungeachtet ob diese speziell, indirekt, nachfolgend oder kompensatorisch, mittelbar oder unmittelbar sind oder direkt oder indirekt von dieser Publikation, einer Anwendung oder dem Vertrauen in dieses Dokument herrühren.

KWB übernimmt keine Garantie und macht keine Zusicherungen ausdrücklicher oder stillschweigender Art bezüglich der Richtigkeit oder Vollständigkeit jeglicher Information hierin. Es wird ausdrücklich darauf hingewiesen, dass die in der Publikation gegebenen Informationen und Ergebnisse aufgrund nachfolgender Änderungen nicht mehr aktuell sein können. Weiterhin lehnt KWB die Haftung ab und übernimmt keine Garantie, dass die in diesem Dokument enthaltenen Informationen der Erfüllung Ihrer besonderen Zwecke oder Ansprüche dienlich sind.

Mit der vorliegenden Haftungsausschlussklausel wird weder bezweckt, die Haftung der KWB entgegen den einschlägigen nationalen Rechtsvorschriften einzuschränken noch sie in Fällen auszuschließen, in denen ein Ausschluss nach diesen Rechtsvorschriften nicht möglich ist.

## **Abstract (English)**

### **Causal coherences between the signals of an optical multi-parameter probe and biofilm growth in water-transporting pipeline networks**

#### **First investigations**

Duration: 1/2005 – 9/2005

Volume: 147.000 €

Contractors: Dr. K.-H. Mittenzwey, Optosens GmbH Berlin, Prof. Dr. U. Szewzyk, TU Berlin, Dipl.-Ing. V. Dworak, BBPT GmbH Berlin, Dr. D. Schulze, UVT Ing.-Büro für Umwelt- und Verfahrenstechnik GbR, Berlin

Contact at KWB: Dr. Bodo Weigert

Biofouling processes generate considerable problems for municipal and industrial pipeline systems used for water transport. In order to counter these difficulties in due time, it is essential to detect biofilms at an early stage. Against this background, a newly developed optical measurement probe has been tested with regard to its suitability for the detection of biofilms and to its application potential for the water industry.

The optical sensor is characterised by the fact that it allows for the synchronous online measurement of up to 4 different optical parameters for up to 4 different wave-lengths.

The experiments have revealed coherences between the measurement signals and the generation of biofilms, coherences which have been verified through accompanying chemical/physical and microbiological analyses. First approaches for the application of this type of probe in water-transporting pipeline systems have been developed.

The tests have been carried out in two phases, using a tube reactor equipped with reference probes in addition to the actual measurement probe. Due to this method, additional fouling surfaces on identical optical windows have been created which could have been microbiologically analysed over a longer period of time.

During the first test phase, the reactor has been fed with effluent originating from the WWTP Ruhleben in order to shortly obtain the relevant information on the reaction behaviour of the measurement probe and to undertake a first adjustment of the optical system. Between the measured TOC and BDOC concentrations and the development of cell numbers (DAPI test) coinciding tendencies have resulted and a rough correlation between the biofilm thickness and the optical parameters has been observed.

During the second test phase carried out with drinking water, the optical data measured with the fouling sensor have correlated very well with the cell numbers measured on the optical windows of the reference probes. The comparison between the spectroscopic lab trials carried out with the effluent samples yielded by the reactor and the measurement data of the optical probe allows the conclusion that the optical data documented are in fact due to biofilm influences and not to free water.

The critical consideration of the results has revealed that the adsorption data of the measurement probe have very well correlated with the microbiologically measured development of cell numbers during the growth phase, whereas the dispersion and fluorescence parameters have shown another dynamic behaviour. Rapid adsorption processes due to certain water ingredients - such as humic substances, which are, besides the relatively slow cell proliferation, characteristic for the growth phase – are reflected in a relatively sharp increase of the fluorescence signal.

When the experimental conditions, as for instance temperature level and nutrients supply, are changed, the optical parameters absorption, dispersion and fluorescence have shown a different behaviour depending also on the selected wave length. So the dispersion in the close infrared sphere (NIR) has clearly increased in contrast to the UV dispersion measured for varying wave lengths. The interruption of the nutrients input has led to a slight decrease of the optical dispersion and absorption parameters parallel to a slight drop in the cell numbers.

The tests have demonstrated that the optical sensor applied has a big potential for the detection of biofilm growth processes, requiring the measurement of several optical parameters on varying wave lengths.

These first investigations have very clearly revealed that, in view of the interpretation of the data collected, the entire potential of the sensor has not been utilised yet. So it can be assumed that further biochemical parameters as for instance NAD/NADH, have also been collected by means of the optical parameters. This would be a valuable evidence in terms of the metabolic activities of the biofilm cells.

In order to provide a suitable tool to the water industry, the results obtained until now have to be confirmed. In particular, it has to be demonstrated to what extent the beginning and advanced stages of fouling processes can reliably be detected and documented by means of different and complex media. In addition, the coherences between the optical parameters and the different processes during biofilm growth have to be recorded in detail to develop certain algorithms and calibration functions usable for the control of anti-fouling measures in the water industry.

## **Abstrakt (German)**

### **Kausale Zusammenhänge zwischen den Signalen einer optischen Multiparametersonde und Biofilmwachstum in wasser-führenden Rohrnetzen - Erste Untersuchungen**

Dauer: 1/2005 – 9/2005

Volumen: 147.000 €

Vertragspartner: Dr. K.-H. Mittenzwey, Optosens GmbH Berlin, Prof. Dr. U. Szewzyk, TU Berlin, Dipl.-Ing. V. Dworak, BBPT GmbH Berlin, Dr. D. Schulze, UVT Ing.-Büro für Umwelt- und Verfahrenstechnik GbR, Berlin

Kontakt im KWB: Dr. Bodo Weigert

Biofoulingprozesse bereiten in kommunalen und industriellen wasserführenden Leitungssystemen große Probleme. Um dem rechtzeitig entgegenwirken zu können, müssen solche Belagsbildungen frühzeitig erkannt werden. In diesem Zusammenhang wurde eine neu entwickelte optische Messsonde von 3 in Berlin ansässigen Industriepartnern in Zusammenarbeit mit der TU-Berlin auf die praktische Eignung für die Detektion von Biofilmen, und damit hinsichtlich ihres Einsatzpotentials in der Wasserwirtschaft untersucht.

Der eingesetzte optische Sensor zeichnet sich dadurch aus, dass gleichzeitig bis zu 4 verschiedene optische Parameter bei bis zu 4 verschiedenen Wellenlängen online erfasst werden können.

In den Experimenten wurden Zusammenhänge zwischen den Messsignalen und der Biofilmbildung dokumentiert, durch begleitende chemisch/physikalische und mikrobiologische Untersuchungen verifiziert und erste Ansätze für den Einsatz einer solchen Sonde in wasserführenden Rohrsystemen erarbeitet.

Die Versuche wurden in zwei Abschnitten durchgeführt, wobei jeweils ein durchströmter Rohrreaktor zum Einsatz kam, der neben der Messsonde mit Referenzsonden ausgestattet war. Dadurch wurden zusätzliche Bewuchsflächen auf identischen optischen Fenstern geschaffen, die über einen längeren Zeitraum begleitend mikrobiologisch analysiert werden konnten.

Im ersten Versuchsabschnitt wurde der Reaktor mit dem Ablauf der Kläranlage Ruhleben beschickt, um bei hoher Substratkonzentration in kurzer Zeit Informationen über das Ansprechverhalten der Messsonde zu erhalten und eine erste Abstimmung des optischen Systems vornehmen zu können. Zwischen dem gemessenen TOC und BDOC und der Zellzahlentwicklung (DAPI-Test) resultierten übereinstimmende Tendenzen, zwischen der Biofilmdicke und den optischen Parametern war eine grobe Korrelation erkennbar.

In den im zweiten Versuchsabschnitt mit Trinkwasser durchgeführten Experimenten korrelierten die mit dem Fouling-Sensor gemessenen optischen Daten gut mit den

Zellzahlen, die auf den optischen Fenstern der Referenzsonden gemessen wurden. Ein Vergleich der spektroskopischen Laboruntersuchungen von Ablaufproben des Reaktors mit den Messdaten der optischen Sonde lässt den Schluss zu, dass die dokumentierten optischen Messwerte tatsächlich durch Belagseinflüsse und nicht durch das Freiwasser bedingt sind.

Bei differenzierter Betrachtung der Ergebnisse korrelierten die Absorptionsdaten der Messsonde mit der mikrobiologisch gemessenen Zellzahlentwicklung in der Aufwuchsphase sehr gut, während die Streu- und Fluoreszenzparameter ein anderes dynamisches Verhalten zeigten. Schnelle Adsorptionsprozesse durch Wasserinhaltsstoffe wie z.B. Huminstoffe, die neben der relativ langsamen Zellvermehrung in der Aufwuchsphase charakteristisch sind, spiegelten sich besonders in einem relativ starken Anstieg des Fluoreszenzsignals wider.

Bei geänderten experimentellen Bedingungen, wie z.B. Temperatur oder Nährstoffangebot, zeigten die optischen Parameter Absorption, Streuung und Fluoreszenz ein unterschiedliches Verhalten, das auch von der gewählten Wellenlänge abhängig ist. Beispielsweise zeigte die Streuung im nahen Infrarotbereich (NIR) im Gegensatz zur bei unterschiedlichen Wellenlängen gemessenen UV-Streuung einen deutlichen Anstieg. Eine Unterbrechung der Nährstoffgabe hatte parallel zu einer leichten Abnahme der Zellzahl auch eine leichte Abnahme der optischen Streuungs- und Absorptionsparameter zur Folge.

In den Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der eingesetzte optische Sensor ein großes Potenzial bei der Erfassung von Biofoulingprozessen besitzt, wobei die Messung mehrerer optischer Parameter bei unterschiedlichen Wellenlängen erforderlich ist.

Diese ersten Untersuchungen zeigten auch sehr deutlich, dass hinsichtlich der Interpretation der gewonnenen Daten noch nicht alle Möglichkeiten des Sensors ausgeschöpft sind. So lassen die gemessenen Daten vermuten, dass mit den optischen Parametern weitere biochemische Parameter, wie zum Beispiel NAD/NADH, erfasst wurden, womit ein sehr guter Hinweis auf die Stoffwechselaktivität der Zellen im Biofilm gegeben wäre.

Um der Wasserwirtschaft ein geeignetes Werkzeug zur Verfügung stellen zu können, müssen die bisherigen Ergebnisse bestätigt werden. Insbesondere ist zu zeigen, inwieweit beginnende und fortgeschrittene Stadien von Foulingprozessen in verschiedenen und komplexen Medien sicher erkannt und dokumentiert werden können. Außerdem müssen Zusammenhänge zwischen den optischen Parametern und den unterschiedlichen Vorgängen während der Biofilmbildung im Detail erfasst werden, um Algorithmen und Kalibrierfunktionen zu entwickeln, die für die Steuerung von Antifoulingmaßnahmen in der praktischen Wasserwirtschaft nutzbar sind.

## Abstract

### **Rapports de causalité entre les signaux d'une sonde optique multiparamètre et le développement de biofilm dans les canalisations d'eau –investigations préliminaires**

Durée 1/2005 – 9/2005

Dudget: 147.000 €

Partenaire: Dr. K.-H. Mittenzwey, Optosens GmbH Berlin, Prof. Dr. U. Szewzyk, TU Berlin, Dipl.-Ing. V. Dworak, BBPT GmbH Berlin, Dr. D. Schulze, UVT Ing.-Büro für Umwelt- und Verfahrenstechnik GbR, Berlin

Contact au KWB: Dr. Bodo Weigert

Les biofilms se trouvant sur la surface interne des réseaux de canalisation peuvent poser des problèmes considérables dans les secteurs de l'industrie et de l'approvisionnement en eau potable. Les mesures de précaution et de surveillance concernant la détection des formations du biofilm se basent actuellement toujours sur de longues procédures d'essai microbiologiques. La surveillance des canalisations a nettement pu être améliorée grâce à l'utilisation de procédés de mesure en ligne.

Dans le cadre du projet, un des systèmes de mesure opto-spectroscopique « inline » disponible sur le marché pour l'enregistrement en ligne des biofilms, a été examiné. La sonde est capable de mesurer de manière synchronisée jusqu'à quatre paramètres optiques différents avec jusqu'à quatre longueurs d'onde différentes.

Lors des expériences, des rapports entre les signaux de mesure évalués et la formation du bio-film ont été documentés et vérifiés par la suite par des examens chimiques/physiques et micro-biologiques.

L'évaluation parallèle de plusieurs paramètres optiques disponibles a permis de démontrer que le capteur en ligne utilisé bénéficie d'un grand potentiel pour un enregistrement en ligne de procédés de colmatage biologiques.

Les premiers examens ont nettement montré que lors de l'interprétation des données requises, toutes les possibilités du capteur n'ont pas été épuisées. On peut donc supposer que d'autres paramètres biochimiques apportant des informations sur l'état biologique de la biomasse développée peuvent être enregistrés. Pour cela, d'autres examens seraient nécessaires.

## Table of Contents

Chapter 1 EINLEITUNG .....	1
1.1 Biofilme allgemein .....	1
1.2 Nachweis von Biofilmen .....	2
Chapter 2 MATERIAL UND METHODEN .....	3
2.1 Versuchsanordnung .....	3
2.1.1 Optischer Sensor.....	3
2.1.2 Referenzsonden (Dummies) .....	5
2.1.3 Reaktor .....	5
2.2 Analytik .....	6
2.2.1 Spektroskopische Untersuchungen im Labor .....	6
2.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen.....	6
2.2.3 Chemisch/physikalische Untersuchungen .....	9
Chapter 3 ERGEBNISSE .....	11
3.1 Experiment 1 .....	11
3.1.1 Messverhalten der optischen Sonde .....	12
3.1.2 Gesamtzellzahl des Biofilms .....	13
3.1.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung des Biofilms .....	14
3.1.4 Fotografische Dokumentation des Biofilms .....	14
3.1.5 Organische Parameter im Kläranlagenablauf .....	16
3.2 Experiment 2 .....	18
3.2.1 Messverhalten der optischen Sonde .....	19
3.2.2 Gesamtzellzahl des Biofilms .....	21
3.2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung des Biofilms .....	22
3.2.4 Fotografische Dokumentation des Biofilms .....	23
3.3 Experiment 3 .....	24
3.3.1 Messverhalten der optischen Sonde .....	24
3.3.2 Gesamtzellzahl des Biofilms .....	29
Chapter 4 ATP und DOC Bestimmung im Freiwasser.....	30
4.1.1 Fotografische Dokumentation des Biofilms .....	30
Chapter 5 DISKUSSION.....	32
Chapter 6 SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK.....	33
Chapter 7 LITERATUR .....	34



## List of Figures

Abbildung 1 : Optischer Sensor – Eigenschaften.....	3
Abbildung 2: Optischer Sensor - Messkopf.....	4
Abbildung 3: Rohrreaktor .....	5
Abbildung 4: : Rohrreaktor - voll bestückt .....	6
Abbildung 5: Versuchsaufbau Experiment 1 .....	12
Abbildung 6: zeitlicher Verlauf von Fluoreszenz, Streuung und Entwicklung der Gesamtzellzahl des Biofilms im Experiment 1 (Klärwerk Ruhleben). .....	13
Abbildung 7: Entwicklung der Anzahl der hybridisierbaren Zellen des Biofilms des Experiments 1. ....	14
Abbildung 8: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines 29 Tage alten Biofilms der Kläranlage Ruhleben (Experiment 1); a: DAPI Färbung, b: Hybridisierung mit EUB Sonde.....	15
Abbildung 9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Biofilms der Kläranlage Ruhleben.....	15
Abbildung 10: Biofilmbildung auf dem optischen Fenster der Mess-Sonde und auf der Oberfläche des Rohrreaktors (Experiment 1) .....	16
Abbildung 11: CSB-online-Messung (Ablauf Ruhleben, Experiment 1).....	17
Abbildung 12: BDOC, CSB, TOC (Ablauf Ruhleben).....	17
Abbildung 13: Versuchsaufbau Experiment 2 .....	18
Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Absorption bei verschiedenen Wellenlängen und Entwicklung der Gesamtzellzahl des Biofilms (Experiment 2) .....	19
Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei verschiedenen Wellenlängen (Experiment 2).....	20
Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Streuung bei verschiedenen Wellenlängen (Experiment 2).....	21
Abbildung 17: Entwicklung der Gesamtzellzahl und Anzahl der hybridisierbaren <i>Eubakterien</i> und $\beta$ - <i>Proteobakterien</i> des Biofilms des Experiment 2. ....	22
Abbildung 18: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 15 Tage alten Biofilms ohne Substratzugabe (Experiment 2). Zellen DAPI gefärbt. ....	23
Abbildung 19: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 38 Tage alten Biofilms; a: DAPI Färbung, b: Hybridisierung mit EUB Sonde.....	23
Abbildung 20: Versuchsaufbau Experiment 3 .....	24

Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der Streuung bei verschiedene Wellenlängen und Entwicklung der Gesamtzellzahl des Biofilms (Experiment 3) .....	25
Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Absorption bei verschiedenen Wellenlängen (Experiment 3).....	26
Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei verschiedene Wellenlängen (Experiment 3).....	27
Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei verschiedene Wellenlängen (zeitlicher Ausschnitt, Experiment 3).....	27
Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei verschiedenen Wellenlängen (zeitlicher Ausschnitt, Experiment 3).....	28
Abbildung 26: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines mit DAPI gefärbten Biofilms; a: 2 Tage, mit Substrat; b: 13 Tage, ohne Substrat.....	30

## List of Tables

Tabelle 1: Eingesetzte Oligonukleotidsonden .....	8
Tabelle 2: Gesamtzellzahl der Experiments 1 (Mittelwert mit Standardabweichung).....	13
Tabelle 3: Gesamtzellzahl der Experiments 2 (Mittelwert mit Standardabweichung).....	22
Tabelle 4: Gesamtzellzahl im Biofilm des Experiments 3 (Mittelwert mit Standardabweichung) .....	29
Tabelle 5: DOC und ATP Gehalt des Durchflusswassers des Reaktors (Experiment 3).	31

# Chapter 1

## EINLEITUNG

### 1.1 Biofilme allgemein

An allen Grenzflächen in der Natur und in technischen Systemen, die ausreichend Wasser enthalten, kommen angeheftete Mikroorganismen (Biofilme) vor. Biofilme stellen die bei weitem wichtigste Lebensweise von vielen Mikroorganismen dar und sind entscheidend an wichtigen Stoffumwandlungen und Stoffkreisläufen beteiligt. In technischen Anlagen können Biofilme einerseits Materialzerstörungen (Biodeterioration, Korrosion) und Verstopfungen verursachen, andererseits aber auch in diversen Reaktoren in biotechnologischen Verfahren eingesetzt werden. Die grundlegenden Mechanismen, die an der Entwicklung und Erhaltung von Biofilmen beteiligt sind, werden durch eine Kombination mikroskopischer, mikrobiologischer und molekulargenetischer Methoden immer besser verstanden. Es zeichnet sich immer deutlicher ab, dass neben dem Fraß durch tierische Weidegänger und Protozoen die Interaktion und Kommunikation zwischen Mikroorganismen von entscheidender Bedeutung für die Entwicklung von Biofilmen sind.

Über die Definition des Begriffs Biofilm ist in den letzten Jahren viel diskutiert worden. In diesem Artikel sollen darunter mikrobielle Lebensgemeinschaften an Grenzflächen mit einer wässrigen Phase verstanden werden. Solche Lebensgemeinschaften wurden in Form des Aufwuchses auf festen Oberflächen (meist wurden Objektträger exponiert) oder der Grenzfläche Wasser-Luft (Kahmhaut) schon vor gut 150 Jahren intensiv mikroskopisch untersucht. Die Beschreibung konzentrierte sich damals jedoch meist auf die mikroskopischen Protozoen, Tiere und Pflanzen, während prokaryotische Mikroorganismen kaum beachtet wurden. Erst im Verlauf des 20. Jahrhunderts wurden Bakterien und Archaea als wichtige, häufig sogar dominierende Komponenten der Biofilme erkannt.

Die wichtigsten Komponenten aus denen sich Biofilme aufbauen sind die Zellen der Mikroorganismen und die sie umhüllende Schleimmatrix - auch EPS (extrazelluläre, polymere Substanzen) genannt - sowie darin integrierte anorganische Bestandteile. Obwohl man annehmen sollte, dass die Zellen selbst an erster Stelle wahrgenommen wurden, waren es häufig die anorganischen Bestandteile, die dem Betrachter auffällig erschienen und oft fälschlicherweise als Produkt rein chemischer Prozesse eingestuft wurden. Typische Beispiele sind die Biofilme, die sich auf den Filtern zur Enteisung und Entmanganung bei der Trinkwasseraufbereitung entwickeln. Die in diesen Filtern lebenden Bakterien, die auch in natürlichen Habitaten eine wichtige und vermutlich deutlich unterschätzte Rolle bei der Eisenoxidation spielen, werden typischerweise an den Einlagerungen von Eisen- bzw. Manganoxiden in der Umgebung der Zellen erkannt. Obwohl die Aktivität von solchen eisen- und manganoxidierenden Bakterien in Wasserfiltern schon seit gut 100 Jahren bekannt ist, werden selbst heute noch entsprechende Filter unter dem Gesichtspunkt der chemischen Oxidation betrieben. Ein Beispiel für eisenablagernde Bakterien in einem Biofilm aus der Oder ist in Abbildung 1

dargestellt. In der Gegenüberstellung von lichtmikroskopischem und rasterelektronenmikroskopischem Bild sieht man deutlich die enge Verknüpfung der mineralischen Bestandteile und der EPS, die gemeinsam eine strukturelle Komponente des sich entwickelnden Biofilms bilden.

Biofilme mit wenig anorganischen Einlagerungen werden für den Betrachter meist erst dann auffällig, wenn sie eine bestimmte Dicke überschritten haben und sich aufgrund der EPS-Ausscheidungen eine dicke Schleimschicht gebildet hat.

## **1.2 Nachweis von Biofilmen**

Zum Nachweis, zur Untersuchung und zur Dokumentation von Biofilmen ist heute ein breites Repertoire an Methoden verfügbar. Die bei weitem überwiegende Zahl der Methoden erfordert allerdings eine Entnahme der zu untersuchenden Oberfläche aus dem System, was bedeutet, dass der Biofilm nur zu einem einzelnen, definierten Zeitpunkt untersucht wird. Die Erfassung der dynamischen Prozesse während der Entwicklung und Reifung eines Biofilms kann mit diesen Methoden nur durch mehrfache Beprobung und Untersuchung verschiedener Oberflächen erreicht werden.

Es bestand schon seit vielen Jahren der Bedarf in unterschiedlichen technischen Systemen das Maß der Biofilmentwicklung (Biofouling) kontinuierlich und online zu erfassen. Diverse Methoden sind hierfür eingesetzt worden, wie zum Beispiel FTIR-Verfahren, die allerdings nur mit passenden Kristalloberflächen funktionieren, und optische Sonden. Die FTIR-Verfahren waren für die Praxis nicht einsetzbar, da die Kristalle nicht in jedem System einsetzbar und zu teuer waren. Die bisher eingesetzten optischen Sonden ergaben zwar eine Korrelation zum Beispiel von Reflexion oder Absorption mit der Zunahme des Biofilms, allerdings konnten die verschiedenartigen und komplexen Biofilme mit den bisherigen Sonden nicht ausreichend untersucht werden.

Die Fa. Optosens Berlin (Teilnehmer im Verbund) hat ein opto-spektroskopisches inline Messsystem entwickelt, das bis zu vier verschiedene optische Parameter bei bis zu vier verschiedenen Wellenlängen synchron zu messen gestattet. Durch die synchrone Messung von Absorption, Streuung, Fluoreszenz und Refraktion ist dieses System grundsätzlich sehr gut geeignet, DOC, Trübung und Fouling ohne Probenahme zu ermitteln und somit Bestandteil eines optimalen Antifoulingmanagement zu werden.

Zur Überprüfung der praktischen Eignung wurden mit diesem Messsystem erste grundlegende Untersuchungen zur Darstellung von Zusammenhängen zwischen Messsignalen der vorgestellten Messsonde und dem erwarteten Biofilmwachstum durchgeführt. Die Versuchsergebnisse sollten Hinweise auf das Einsatzpotential des Sensorsystems in wasserführenden Rohrnetzen geben und könnten ggf. Grundlage für weitere umfangreichere Studien sein.

## Chapter 2

# MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Versuchsanordnung

#### 2.1.1 Optischer Sensor

Für die Versuche wurde ein Spectro-Quad-Sensor der Fa. Optosens, Berlin eingesetzt.

Das Gerät besteht aus einem Messkopf, der kompakt an einem zylindrischen Rohr montiert ist, das die komplette Elektronik und Optoelektronik enthält.

Der Sensor ist für die kontinuierliche und synchrone Messung der Transmission, Streuung und Fluoreszenz geeignet. Optional kann auch die Refraktion ermittelt werden. Die Datenspeicherung erfolgt mit einem internen Datalogger und die Datenabfrage über eine serielle RS-232-Schnittstelle (PC).

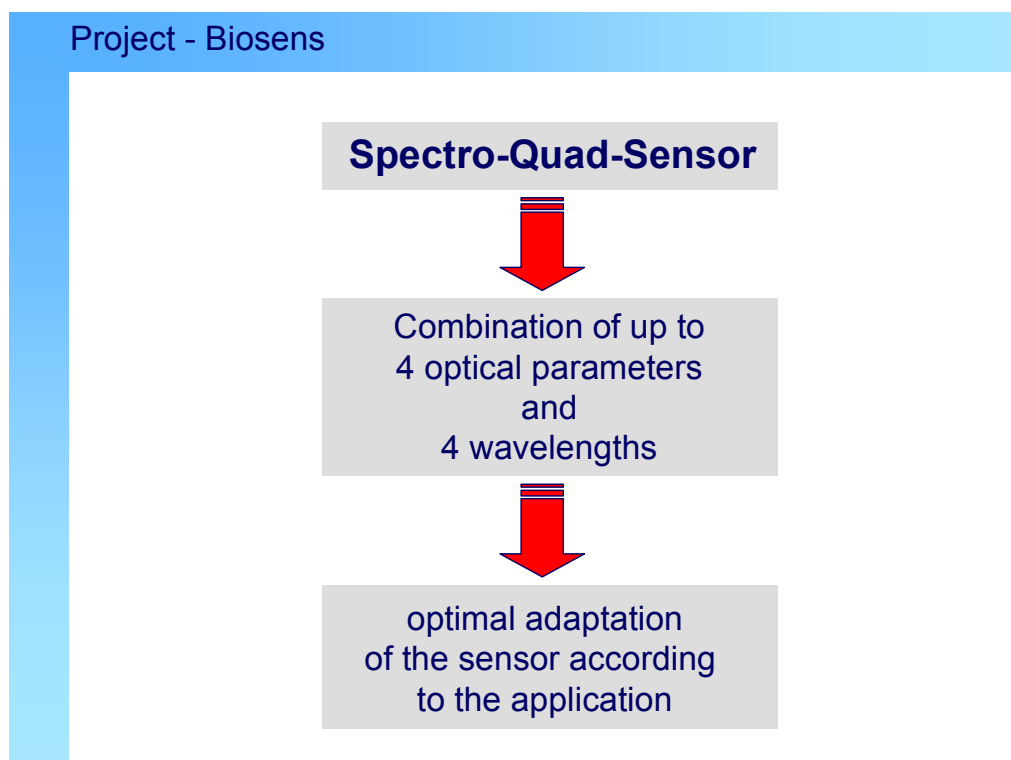
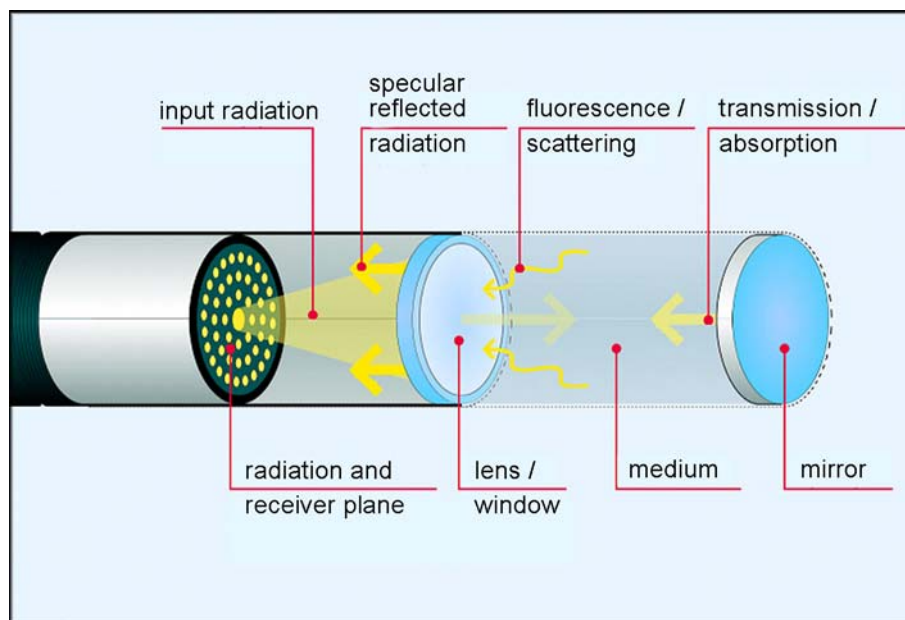


Abbildung 1 : Optischer Sensor – Eigenschaften

## Spectro-Quad-Sensor



**Abbildung 2: Optischer Sensor - Messkopf**

Die Eigenschaften sowie der Messkopf des Spectro-Quad-Sensors sind in den Abbildungen 1 und 2 dargestellt.

Im vorderen Teil des Sensormodules (siehe Abb. 2) befindet sich der Messkopf, der die Optik mit Linse/Schutzfenster und Spiegel/Schutzfenster enthält. Im zylindrischen Rohr befinden sich die Strahlungsquellen und Empfänger sowie die komplette elektronische Steuerung und Signalverarbeitung. Die Strahlungseinkopplung und der Strahlungsempfang werden mittels mehrerer Lichtwellenleiter in der Strahlungs- und Empfangsebene realisiert.

Das Sensormodul kann mit einer Druckdüse zur pneumatischen Reinigung der Fenster ausgestattet werden.

Der Messvorgang wird im Blitzbetrieb durchgeführt. In der Dunkelfase zwischen zwei Pulsen wird das Dunkelsignal gemessen. Parallel dazu wird ein Referenzsignal zur Charakterisierung der eingekoppelten Strahlungsintensitäten gemessen. Jeder Messwert wird bzgl. Dunkelsignal korrigiert und auf das Referenzsignal normiert. Die Transmission, Streuung und Fluoreszenz werden bei 3 verschiedenen UV-Wellenlängen und einer NIR-Wellenlänge gemessen.

### 2.1.2 Referenzsonden (Dummies)

Die mikrobiologischen Untersuchungen wurden mit Referenzsonden durchgeführt, die parallel zum optischen Sensor eingesetzt wurden. Diese Referenzsonden wurden mit zur Messsonde identischen Bewuchsoberflächen ausgestattet, haben aber keine Messfunktion.

Sie wurden nach einem vorgegebenen Zeitraster entnommen und für weitergehende mikrobiologische Untersuchungen zur qualitativen und quantitativen Entwicklung des Foulingprozesses verwendet.

### 2.1.3 Reaktor

Die Untersuchungen wurden in einem Rohrreaktor durchgeführt, der vom Medium durchströmt wurde. Der Reaktor besteht aus einem PVC-Rohr und ist mit diversen Stützen ausgestattet, die zur Aufnahme der optischen Sonde sowie 18 Referenzsonden dienen. Die ganze Anordnung ist auf ein fahrbares Aluminiumgestell montiert. Der Reaktor wird liegend mit einer Steigung von ca. 3% betrieben, um mit dem Wasser eingetragene Gasblasen auszuspülen. Zur besseren Verteilung der strömenden Flüssigkeit befindet sich hinter dem trichterförmigen Reaktoreingang eine Prallscheibe mit Löchern. In den Abb. 3 und 4 sind die Konstruktionszeichnung sowie der voll bestückte Rohrreaktor dargestellt.

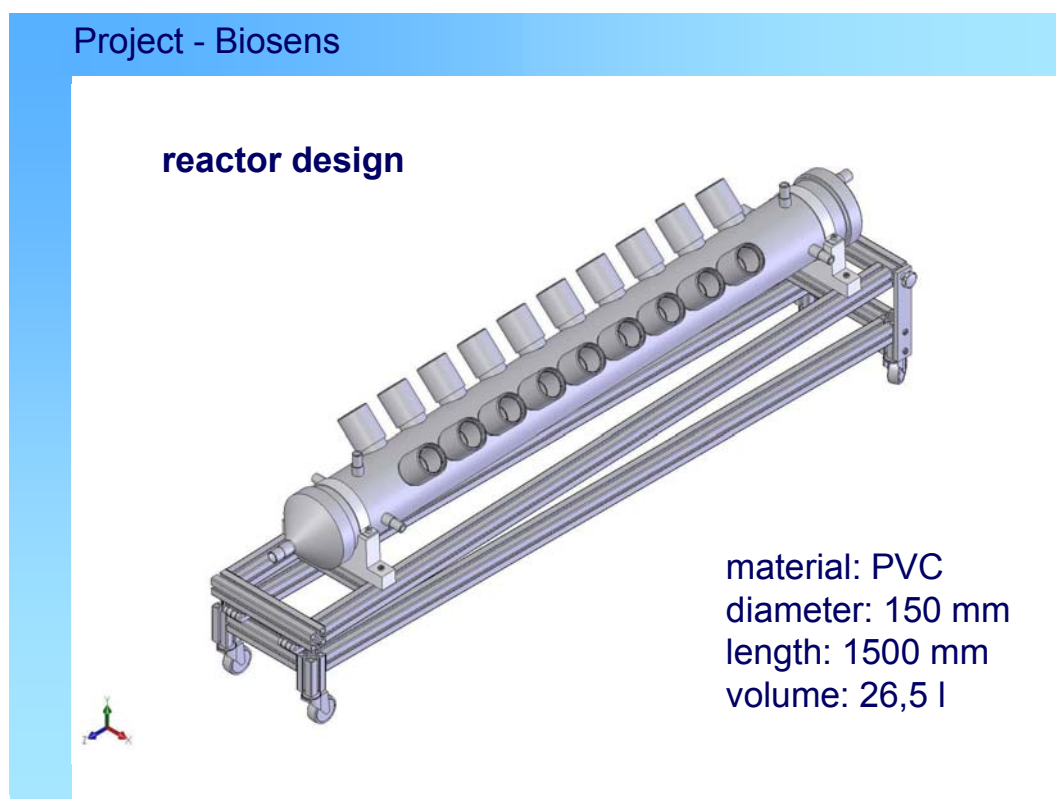


Abbildung 3: Rohrreaktor



### Reactor equipped with optical sensor and dummies



**Abbildung 4: : Rohrreaktor - voll bestückt**

## 2.2 Analytik

### 2.2.1 Spektroskopische Untersuchungen im Labor

Zur Untersuchung der optischen Eigenschaften des Foulingbelages auf den Referenzsonden und des Freiwassers wurden im Labor scannende Messgeräte eingesetzt.

Für die Aufnahme von Absorptionsspektren wurde ein Polychromatorsystem der Fa. Ocean Optics eingesetzt. Die Bestrahlung erfolgte mit einer kombinierten Deuterium / Wolfram-Halogen Lampe. Die Strahlungszuführung und -abführung wurde mit Hilfe von Lichtwellenleitern realisiert.

Für die Messung der spektral aufgelösten Fluoreszenz wurde das Gerätesystem Fluorolog der Fa. Jobin-Yvon verwendet. Die Fluoreszenz wurde mit einer 150W-Xenonlampe angeregt und mit einem empfindlichen Photomultiplier gemessen.

### 2.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Für die drei verschiedenen Versuchsdurchläufe:

- Reaktor im Klärwerk Ruhleben (Experiment 1),
- Reaktor an der TU Berlin, Durchfluss des Wassers im Kreislauf (Experiment 2)
- Reaktor an der TU Berlin, Durchfluss des Wassers ohne Kreislauf (Experiment 3)

wurden nach unterschiedlichen Zeiten Proben entnommen und an diesen verschiedene mikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Zu jedem Probenahmezeitpunkt wurde die Entwicklung des mit DAPI angefärbten Biofilms am Fluoreszenzmikroskop fotografisch dokumentiert. Zur Bestimmung der Heterogenität des Biofilms wurden im Experiment 1 je zwei parallele Proben einmal wöchentlich dem Reaktor entnommen. Um die Zusammensetzung des Biofilms zu untersuchen, wurden an den Proben die Gesamtzellzahl, sowie die Anteile der Eubakterien und die der  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untergruppen der Proteobakterien bestimmt. Weiterhin wurden rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Biofilms gemacht. Im Versuch 2 wurde die Biofilmstruktur an jeweils zwei parallelen Proben alle zwei bzw. drei Tage mikroskopisch untersucht und die Gesamtzellzahl und die Anteile der Eubakterien, sowie die der  $\beta$ -Proteobakterien bestimmt. Für das Experiment 3 wurden täglich Proben entnommen, um die Entwicklung der Gesamtzellzahl des Biofilms zu bestimmen.

#### 2.2.2.1 Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Gesamtzellzahl der Bakterien wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) bestimmt. Nach der Entnahme der Aufwuchsträger aus dem Reaktor wurde die Probe sofort in 3,7% Formaldehyd für 4 Stunden inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Proben kurz mit 1 x PBS Puffer gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Die Proben wurden für 20 min mit 10  $\mu$ l DAPI (10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup>) im Dunklen inkubiert. Das überschüssige DAPI wurde mit Aqua dest. abgespült und die Proben erneut getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Proben mikroskopisch im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Oberkochen, Deutschland) ausgezählt. Es wurden 20 mikroskopische Felder (100 x 100  $\mu$ m) zufällig ausgewählt und mindestens 1000 Zellen ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde für 1 mm<sup>2</sup> Aufwuchsträger berechnet.

#### 2.2.2.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Für die Fluoreszenz in situ Hybridisierung der Biofilme wurden rRNA gerichtete Oligonukleotidsonden, die mit dem Fluorochrom Indocarbocyanin (cy3) markiert waren, eingesetzt (Metabion, Planegg, Deutschland). Die verwendeten Sonden sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Nach der Entnahme der Probe aus dem Reaktor wurde die Probe sofort in 3,7% Formaldehyd für 4 Stunden fixiert. Nach der Fixierung wurden die Proben kurz mit 1 x PBS Puffer gewaschen und bei Raumtemperatur getrocknet. Zur Dehydrierung wurden die Proben einer aufsteigenden Ethanolreihe (50%, 80% und 96% Ethanol) unterzogen und danach bis zur vollständigen Verdunstung der Ethanols bei Raumtemperatur getrocknet. Pro eingesetzter Sonde wurden Verstärkungsringe übereinander auf den Objektträger geklebt, so dass eine Vertiefung für die Hybridisierung entsteht. Die Gebrauchslösung der Sonden wurde mit Hybridisierungspuffer (0.9 M NaCl, 20 mM

Tris/HCl (pH 8), 0.01% SDS), 35% Formamid; Roth, Karlsruhe, Deutschland) mit einer Stringenz von 35% hergestellt. Je 10 µl der jeweiligen Sondenlösung (5 ng/µl) wurden in die entsprechenden Vertiefungen auf den Objektträger gegeben und die Proben für 8 h bei 46 °C im Hybridisierungsöfen inkubiert. Anschließend wurden die Proben mit Waschpuffer (20 mM Tris/HCl, 0.01% SDS, 88 mM NaCl) für 20 min bei 46 °C gewaschen. Nach dem Waschen wurden die Objektträger mit Aqua dest. kurz abgespült und bei RT getrocknet. Nach der Trocknung wurden jeweils 10 µl DAPI (10 µg/ml) in die Vertiefungen gegeben und die Proben wurden für 5-10 min im Dunkeln inkubiert. Das überschüssige DAPI wurde mit Aqua dest. abgespült und die Proben bei RT getrocknet. Nach der Trocknung wurden die Proben mikroskopisch im Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop, Oberkochen, Deutschland) ausgezählt. Es wurden 20 mikroskopische Felder (100 x 100 µm) zufällig ausgewählt und mindestens 1000 Zellen ausgezählt. Die Anzahl der hybridisierten Zellen wurde auf 1 mm<sup>2</sup> Aufwuchsträger berechnet.

Sonde	Zielorganismen	Referenz
EUB 338	Domäne <i>Eubacteria</i>	Amann et al. (1990)
EUB II	<i>Planctomycetales, green-non sulfur bacteria</i>	Daims et al. (1999)
EUB III	<i>Verrucomicrobiales</i>	Daims et al. (1999)
ALF 1b	α-Unterklasse der <i>Proteobacteria</i>	Manz et al. (1992)
BETA 42a	β-Unterklasse der <i>Proteobacteria</i>	Manz et al. (1992)
GAM 42	γ-Unterklasse der <i>Proteobacteria</i>	Manz et al. (1992)

### Tabelle 1: Eingesetzte Oligonukleotidsonden

Die Sonden EUB 338, EUBII und EUB III wurden als Gemisch eingesetzt. Zusätzlich wurden die unmarkierten Oligonukleotidsonden GAM42a und BETA42a für kompetitive Hybridisierungen mit den Sonden BETA42a cy3 bzw. GAM42a cy3 verwendet (Kalmbach et al., 1997).

#### 2.2.2.3 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Die aus dem Reaktor entnommene Probe wurde in 1 □ PBS gewaschen und in eine in 10%-Schritten aufsteigende Iso-Propanol-Reihe je 20 min bis in 70%iges Iso-Propanol überführt. Bis zur Lufttrocknung wurden die Proben kurzzeitig bei 4 °C in 70%igem Iso-Propanol gelagert. Kurz vor der Lufttrocknung wurde die Iso-Propanol-Reihe in 10%-

Schritten bis zum 100%igen Iso-Propanol weitergeführt, so dass die Proben vollständig entwässert waren. Vor der REM-Untersuchung wurde die Probe gleichmäßig mit einer Goldschicht besputtert, um die Oberfläche leitfähig zu machen. Die REM Aufnahmen wurden an einem REM S-2700 (Hitachi, Japan) bei einer Beschleunigungsspannung der Elektronen von 20 kV aufgenommen.

### **2.2.3 Chemisch/physikalische Untersuchungen**

#### **2.2.3.1 CSB**

Der Chemische Sauerstoffbedarf (CSB) wurde während des 1. Experimentes kontinuierlich mit dem CSB-online-Analysator OXI-JET der Fa. UVT Ingenieurbüro, Berlin gemessen. Das Gerät arbeitet nach dem Prinzip der chemischen Oxidation mit Ozon. Eine Probenvorbereitung war nicht nötig, das Gerät arbeitet vollautomatisch.

In allen nachfolgenden Experimenten wurde der CSB nach der Dichromat-Methode mit dem Küvettentest LCK 314 (Fa. Hach Lange GmbH, Düsseldorf) bestimmt. Der angegebene Messbereich wurde durch Aufnahme einer Kalibrierkurve mit einer CSB-Benzoessäure-Standard-Lösung überprüft.

#### **2.2.3.2 TOC**

Die Bestimmung des gesamten organischen Kohlenstoffs (TOC) erfolgte mit dem TOC-Analysator TOC-5050A (Shimadzu, Japan), der nach dem Prinzip der thermischen Oxidation arbeitet. Nach Ansäuerung der Probe mit 2 molarer HCl (2 Tropfen auf 5 mL Probe, pH-Wert 2) wurde zunächst der anorganische Kohlenstoff-Anteil durch Ausblasen entfernt. Die Oxidation der Kohlenstoffverbindungen erfolgte im Sauerstoffstrom mit Hilfe eines Platinkatalysators bei ca. 680°C. Das gebildete CO<sub>2</sub> wurde mit einem NDIR-Detektor (Nondispersiv-Infarotgasanalysator) erfaßt. Der Meßfehler bei diesem Analysegerät liegt in der Regel bei dem DOC -Konzentrationsbereich von 1 mg/L bis 10 mg/L unterhalb von 2 %. Die DOC-Bestimmungsgrenze wurde für die Standardlösung von Kaliumhydrogenphthalat abhängig vom Katalysator-Zustand zu ca. 100 µg/L ermittelt.

#### **2.2.3.3 DOC Bestimmung**

Für die Bestimmung des DOC Gehalts des Reaktorwassers wurden im dritten Experiment zu jedem Probenahmezeitpunkt am vorderen Teil des Reaktors 50 ml Reaktorwasser entnommen. Bei zwei Probenahmen wurde ebenfalls am hinteren Auslauf des Reaktors eine Probe entnommen. Für die Probenahme wurden zuerst 100 ml des Vorlaufwassers verworfen, bevor die zu analysierenden Proben gezogen wurden. Die Wasserproben wurden durch einen 0,2 µm Filter filtriert und bis zu Analyse bei -20 °C aufbewahrt. Für die Analyse des DOC wurden jeweils vor und nach den Messungen MilliQ Wasser, sowie Proben mit einem Gehalt von 25; 50 und 100 ppm TOC vermessen. Die Messungen wurden mit einem Total Carbon Analyser TOC-5050A durchgeführt.

#### 2.2.3.4 BDOC

Die Bestimmung des BDOC erfolgte nach einer Methode von Servais et. al., 1989.

Das Prinzip der Methode beruht auf der Erfassung des Bakterienzuwachses einer zuvor steril filtrierten und anschließend mit autochthonen Bakterien angeimpften Abwasserprobe innerhalb von 4 Wochen bei 20 °C und Dunkelheit. Es wird die Abnahme der DOC- Konzentration durch bakterielle Oxidation des Kohlenstoffes gemessen.

#### 2.2.3.5 Calcium

Die Konzentration von Calcium in den Wasserproben wurde mit dem Flammenphotometer PFP 7 (Jenway, Essen) gemessen.

Brenngas: Methan 2.6 (Linde AG, Berlin)

- Vordruck: 1 bar
- Fuel: voll auf; coarse: 3

#### 2.2.3.6 Abfiltrierbare Stoffe

Die Bestimmung des Gehaltes an ungelösten Stoffen erfolgte nach DEV, H2, 1975.

Mittels eines Glasfaserfilters wurden die in der Probe enthaltenen ungelösten Stoffe abfiltriert und als Trockensubstanz gewogen.

#### 2.2.3.7 ATP Bestimmung

Die Bestimmung des ATP Gehalts des Durchflusswassers des Reaktors wurde mittels des BioFix® Lumi-10 Luminometers durchgeführt. Im Experiment 3 wurde an drei aufeinander folgenden Probenahmetagen Reaktorwasser entnommen, um den ATP Gehalt zu bestimmen. Es wurde am Ende bzw. am Anfang des Rohrreaktors eine 50 ml Probe gezogen, von der 0,1 ml für die ATP Bestimmung eingesetzt wurden. Die quantitative Bestimmung des ATPs wurde mittels einer Luciferin-Luciferase Reaktion durchgeführt. Das hierbei ausgestrahlte Licht wurde mit Hilfe des Luminometers gemessen und als relative Leuchteinheiten (RLU= relative light units) angegeben. Als Referenzwert wurde die RLU von Leitungswasser bestimmt.

## Chapter 3

### ERGEBNISSE

Die Untersuchungen erfolgten in zwei Abschnitten, wobei die Messsonde in einer Voruntersuchung in ein Pilotvorhaben eingebunden wurde, welches im Klärwerk Ruhleben bei den Berliner Wasserbetrieben durchgeführt wurde und die oxidative Behandlung von geklärtem kommunalem Abwasser zum Thema hatte.

Im zweiten Versuchsabschnitt wurden weitergehende Untersuchungen zur Biofilmentwicklung und Messsignaländerung der Sonde unter Laborbedingungen durchgeführt (Labor Prof. Dr. U. Szewzyk, Fachgebiet Umweltmikrobiologie, Institut für Technischen Umweltschutz, Technische Universität Berlin). Dazu wurden in einem Trinkwassersystem unter definierten Bedingungen Testsubstanzen zugesetzt, die zu einer Ausbildung eines Biofilmes führten.

#### 3.1 Experiment 1

Die ersten Untersuchungen mit dem Foulingssensor wurden über einen Zeitraum von zwei Monaten bei den Berliner Wasserbetrieben im Klärwerk Ruhleben durchgeführt. Für den Versuch wurde der gereinigte Ablauf der Kläranlage mit Hilfe einer Tauchpumpe kontinuierlich durch den Rohrreaktor gepumpt. Der Abwasservolumenstrom betrug 1 m<sup>3</sup>/h.

Dem Reaktor wurden regelmäßig Referenzsonden entnommen, um den Belag auf dem optischen Fenster mikrobiologisch zu untersuchen.

Der gereinigte Ablauf der Kläranlage sollte exemplarisch für ein Medium mit hoher Substratkonzentration dienen und zu einer schnellen Ausbildung des Biofilms führen, um somit kurzfristig erste Hinweise über die Funktion der optischen Sonde zu liefern.

Weiterhin diente dieses Experiment in erster Linie der grundlegenden Überprüfung des Ansprechverhaltens der Sonde in Bezug auf die Messproblematik und der erforderlichen ersten Abstimmung des optischen Systems.

Versuchsaufbau und Versuchsbedingungen sind in Abb. 5 skizziert.

### Experiment 1

#### Time:

June - July 2005, Berliner Wasserbetriebe, Klärwerk Ruhleben

#### Aims:

basic experiences in sensor response (e.g. temperature drift, photomultiplier sensitivity)

#### Conditions:

medium: effluent of the  
wastewater treatment works  
temperature: ambient  
pH: 7,3...7,5  
COD: 35...50 mg/l  
TOC: 20...34 mg/l  
DOC: 8...15 mg/l

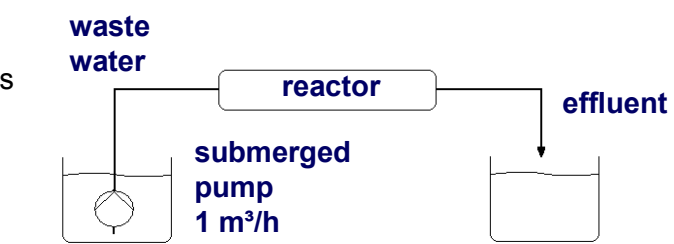


Abbildung 5: Versuchsaufbau Experiment 1

#### 3.1.1 Messverhalten der optischen Sonde

Die Abb.6 zeigt im oberen und mittleren Bild die Fluoreszenz und die Streuung als Funktion der Zeit. Auf dem unteren Diagramm ist die Zellzahl pro mm<sup>2</sup> in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt, die auf den optischen Fenstern der Referenzsonden gemessen wurde. Es ist ersichtlich, dass die Zellzahl mit der Zeit grundsätzlich ansteigt. Für die Fluoreszenz und die Streuung sind zwar Messwertänderungen zu beobachten, es können allerdings keine Korrelationen zum zeitlichen Verlauf der Zellzahl erkannt werden.

## Time Course of Fluorescence, Scattering and Cell Counts

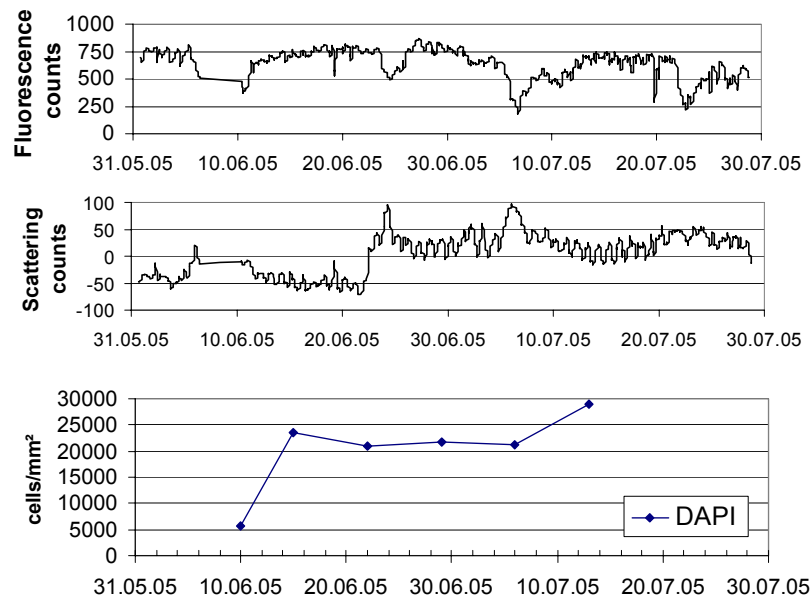


Abbildung 6: zeitlicher Verlauf von Fluoreszenz, Streuung und Entwicklung der Gesamtzellzahl des Biofilms im Experiment 1 (Klärwerk Ruhleben).

### 3.1.2 Gesamtzellzahl des Biofilms

Bei diesem Experiment (Klärwerk Ruhleben) konnte ein Anstieg der Gesamtzellzahlen des Biofilms gemessen werden. Die stationäre Phase des Zellwachstums wurde nach zwei Wochen erreicht. Es wurde eine Zunahme der Zellzahl von  $5,63E+03$  Zellen pro  $mm^2$  bis auf  $2,34E+04$  Zellen pro  $mm^2$  ermittelt (Abbildung 6)

Die Werte der Gesamtzellzahlen für diesen Versuch sind in Tabelle 2 dargestellt.

Reaktor Klärwerk	Datum	Zellen / $mm^2$	Staw
Klärwerk	10.06.2005	$5,63E+03$	$9,88E+01$
	15.06.2005	$2,34E+04$	$6,92E+01$
	22.06.2005	$2,08E+04$	$1,05E+02$
	29.06.2005	$2,17E+04$	$1,60E+02$
	06.07.2005	$2,13E+04$	$2,65E+02$
	13.07.2005	$2,90E+04$	$2,48E+02$

Tabelle 2: Gesamtzellzahl der Experiments 1 (Mittelwert mit Standardabweichung)



### 3.1.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung des Biofilms

Die Werte der mit der EUB Sonde hybridisierbaren Zellen (Eubakterien) lagen im Bereich von 40% bis 75% der mit DAPI bestimmten Gesamtzellzahl. Die Anteile der mit der  $\alpha$ - Proteobakterien variierten zwischen 43% und 5%. Die mit der BETA 42a ermittelten  $\beta$ -Proteobakterien hatten einen Anteil von 19% bis 65% der mit DAPI bestimmten Zellzahl. Die Werte der  $\gamma$ -Gruppen der Proteobakterien lagen im Bereich von 1% bis 65%. (Abbildung 7).

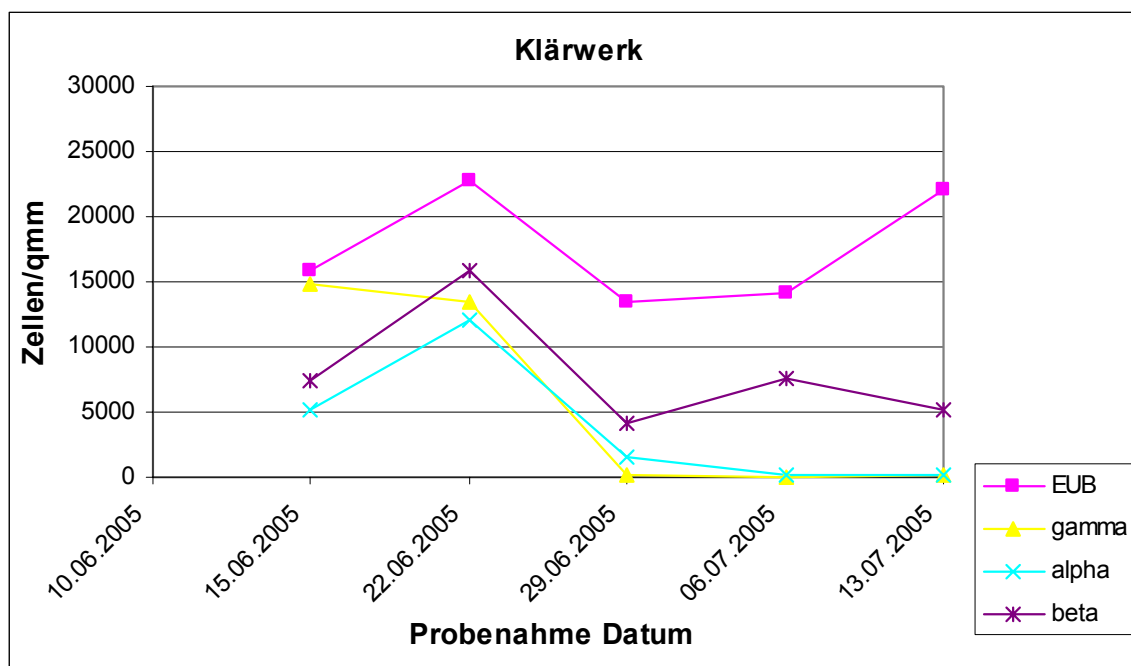
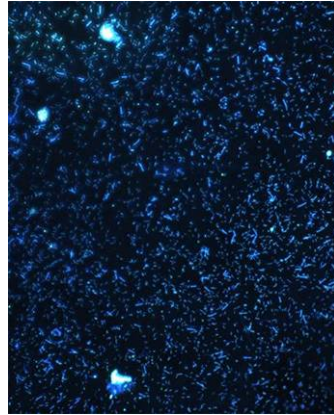
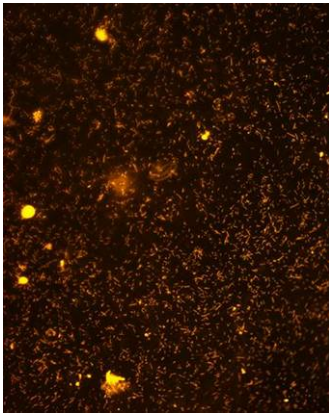


Abbildung 7: Entwicklung der Anzahl der hybridisierbaren Zellen des Biofilms des Experiments 1.

### 3.1.4 Fotografische Dokumentation des Biofilms

In 8 a und b sind Aufnahmen eines 29 Tage alten Biofilms der Kläranlage Ruhleben (Experiment 1) dargestellt. Die Abbildung zeigt einen identischen Ausschnitt der mit DAPI gefärbten Zellen des Biofilms, sowie die mit der EUB Sonde hybridisierten Eubakterien.

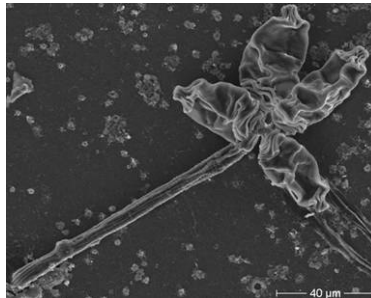
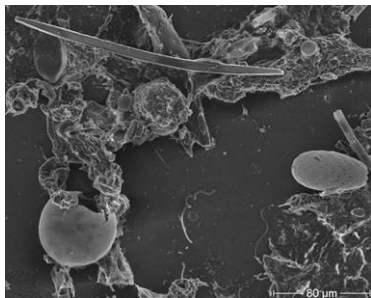


a)

b)

**Abbildung 8: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen eines 29 Tage alten Biofilms der Kläranlage Ruhleben (Experiment 1); a: DAPI Färbung, b: Hybridisierung mit EUB Sonde.**

In Abbildung 9 a-c sind unterschiedliche Bereiche eines Biofilms aus dem Klärwerk Ruhleben dargestellt. Auf den Abbildungen sind beschaltete Amöben, Diatomeen, Flagelaten (a), Glockentierchen der Gattung Vorticella (b), sowie Nematoden (c) zu erkennen. Die Vielfalt der Organismen stellt die große Heterogenität des Biofilms dar.



a)

b)

c)

**Abbildung 9: Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen des Biofilms der Kläranlage Ruhleben.**

Nach Abbruch der Untersuchungen wurde der Reaktor geöffnet und die optische Sonde ausgebaut. Abb. 10 zeigt jeweils eine photographische Aufnahme des optischen Fensters der Sonde sowie die Innenwand des Reaktors. Deutlich sind die Ablagerungen auf den Oberflächen zu erkennen.

**Biofilm development at the end of experiment 1**

optical window of the sensor

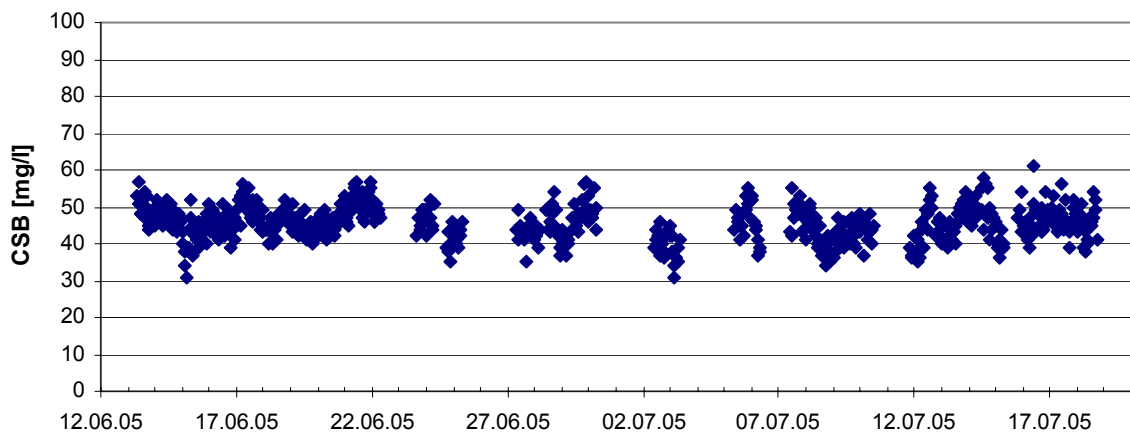


inner surface of the reactor

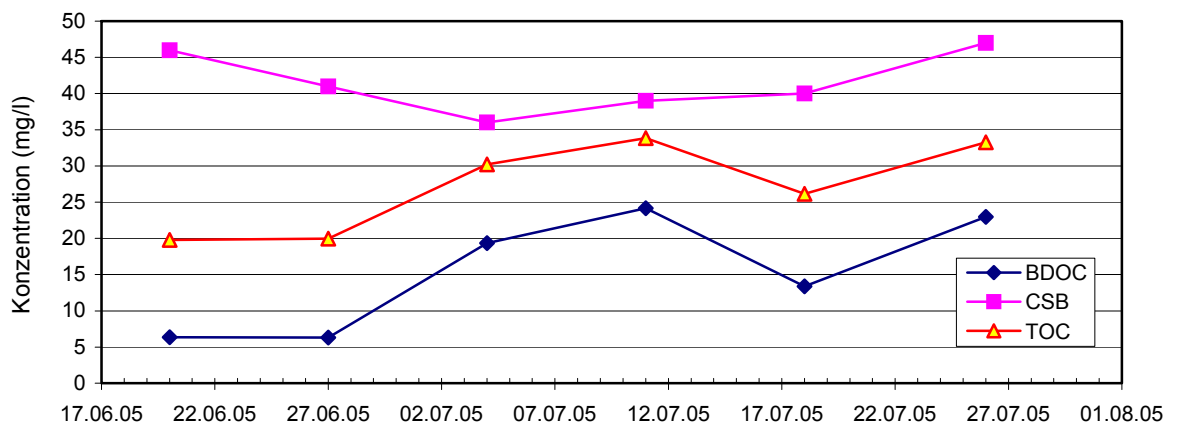
**Abbildung 10: Biofilmbildung auf dem optischen Fenster der Mess-Sonde und auf der Oberfläche des Rohrreaktors (Experiment 1)**

**3.1.5 Organische Parameter im Kläranlagenablauf**

Während des untersuchten Zeitraumes wurde der Chemische Sauerstoffbedarf des Abwassers kontinuierlich mit einem CSB-online-Analysator gemessen. Die gemessenen Werte zeigten relativ geringe Schwankungen und lagen im Mittel bei Werten zwischen 40 bis 50 mg/l (Abb. 11).



**Abbildung 11:** CSB-online-Messung (Ablauf Ruhleben, Experiment 1)



**Abbildung 12: BDOC, CSB, TOC (Ablauf Ruhleben)**

In Abb. 12 ist der zeitliche Verlauf der CSB-Werte sowie der TOC- und BDOC -Werte aus dem Kläranlagenablauf dargestellt. Vergleicht man die Analysenergebnisse mit den zeitlich zugeordneten Zellzahlbestimmungen aus dem DAPI-Test ab dem 20.06.2005 (Abb. 6), so ist zumindest bei den TOC- und BDOC-Werten eine übereinstimmende Tendenz im Kurvenverlauf zu erkennen.

### 3.2 3.2 Experiment 2

Nach Beendigung der Untersuchungen bei den Berliner Wasserbetrieben wurde der Reaktor gereinigt und desinfiziert, um die weiteren Versuche unter definierten Bedingungen im Labor mit Trinkwasser durchzuführen. Das optische System sowie die Auswertelektronik der optischen Sonde wurden aufgrund der Ergebnisse aus dem 1. Experiment nachjustiert.

Für dieses Experiment wurden ca. 100 l Trinkwasser in einem Kunststoffbehälter vorgelegt und mit einer Tauchpumpe für rund 4 Wochen durch den Reaktor im Kreis gepumpt (Volumenstrom: 1 m<sup>3</sup>/h). Anschließend wurde dem Trinkwasser eine sterile Nährstofflösung (R2A-Medium) über eine Schlauchpumpe zudosiert (0,1 l/h), um zu überprüfen, wie sich eine plötzliche Erhöhung des Nährstoffangebotes auf die Biofilmentwicklung auswirkt. Nach ca. 1 Woche musste dieser Versuch abgebrochen werden, weil sich in der Flüssigkeit im Kunststoffbehälter so viele Mikroorganismen angereichert hatten, dass es zu einer massiven Geruchsbelästigung kam und eine Gefährdung durch pathogene Keime nicht ausgeschlossen werden konnte. Diese starke Vermehrung der Mikroorganismen wurde vermutlich durch die Tauchpumpe hervorgerufen, die ihre Eigenwärme an das sie umgebende Wasser abgegeben und bis auf 35 °C erwärmt hatte.

Während des Untersuchungszeitraumes wurden dem Reaktor Referenzsonden entnommen und der Belag auf dem optischen Fenster weitergehend mikrobiologisch und spektroskopisch untersucht. In Abb. 13 ist der Versuchsaufbau dargestellt.

#### Project - Biosens

##### Experiment 2

Time:

03.08. - 08.09.2005, TU Berlin, lab of Prof. Szewzyk

Conditions:

medium: start up with tap water, later shift to nutrients (R2A medium)

temperature: ambient

pH: 7

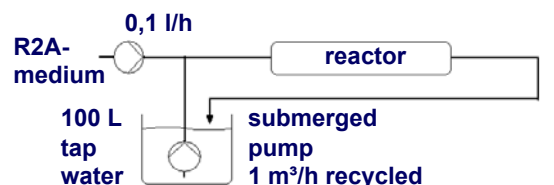


Abbildung 13: Versuchsaufbau Experiment 2

### 3.2.1 Messverhalten der optischen Sonde

Die Abb.14 zeigt im oberen Bild die mit dem Foulingssensor gemessene Absorption in Abhängigkeit von der Zeit. In der unteren Darstellung ist der zeitliche Verlauf der Zellzahl dokumentiert. Die Zellzahl auf den Glasoberflächen der Referenzsonden steigt im Verlauf der Zeit an. Die Werte für die Absorption steigen in diesem Zeitraum ebenfalls an. Das zeitliche Verhalten der Zellzahl und das der Absorption korrelieren. Etwa ab dem 1.9.05 ist diese Korrelation nicht mehr ersichtlich. Die Absorption steigt hier sehr steil an, die Zellzahl dagegen nicht. Eine Ursache dafür könnte die Tatsache sein, dass ab dem 1.9.05 infolge der Nährstoffzugabe ein rasantes Wachstum von Mikroorganismen im Freiwasser beobachtet wurde und damit die Messung der Absorption deutlich beeinflusst hat.

Diese Vermutung wird dadurch unterstützt, dass versuchsbegleitende spektroskopische Untersuchungen verschiedener Reaktorablaufproben im Labor mit zunehmender Versuchszeit ebenfalls einen starken Anstieg der Messwerte für Absorption, Fluoreszenz und Streuung zeigten.

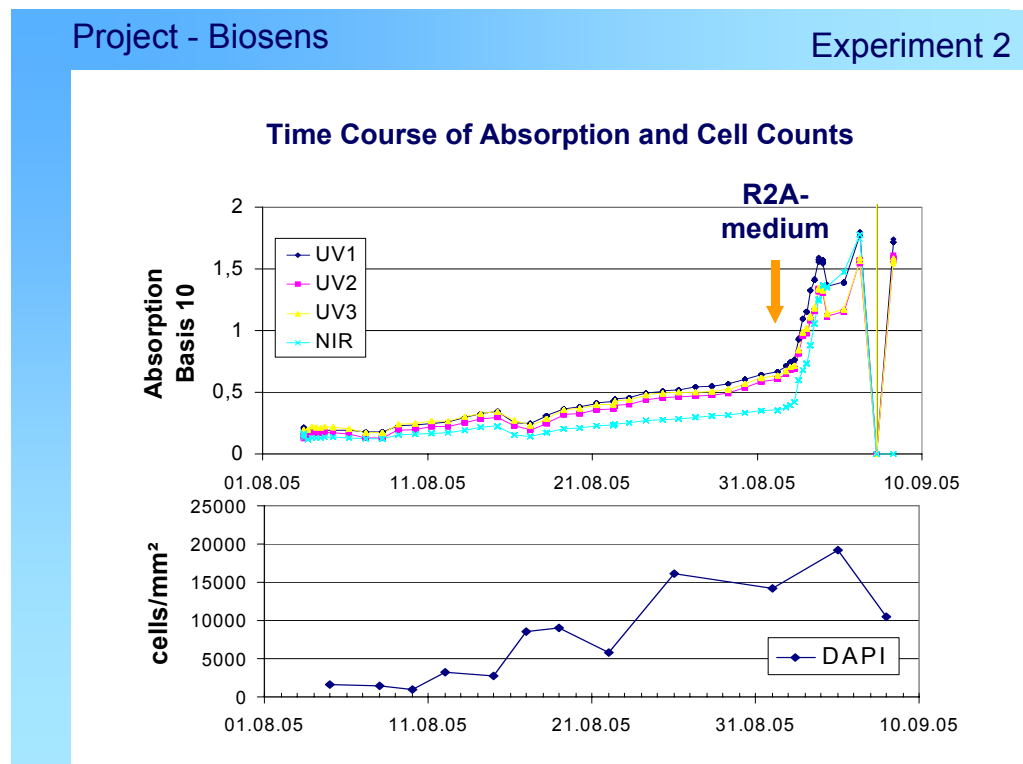
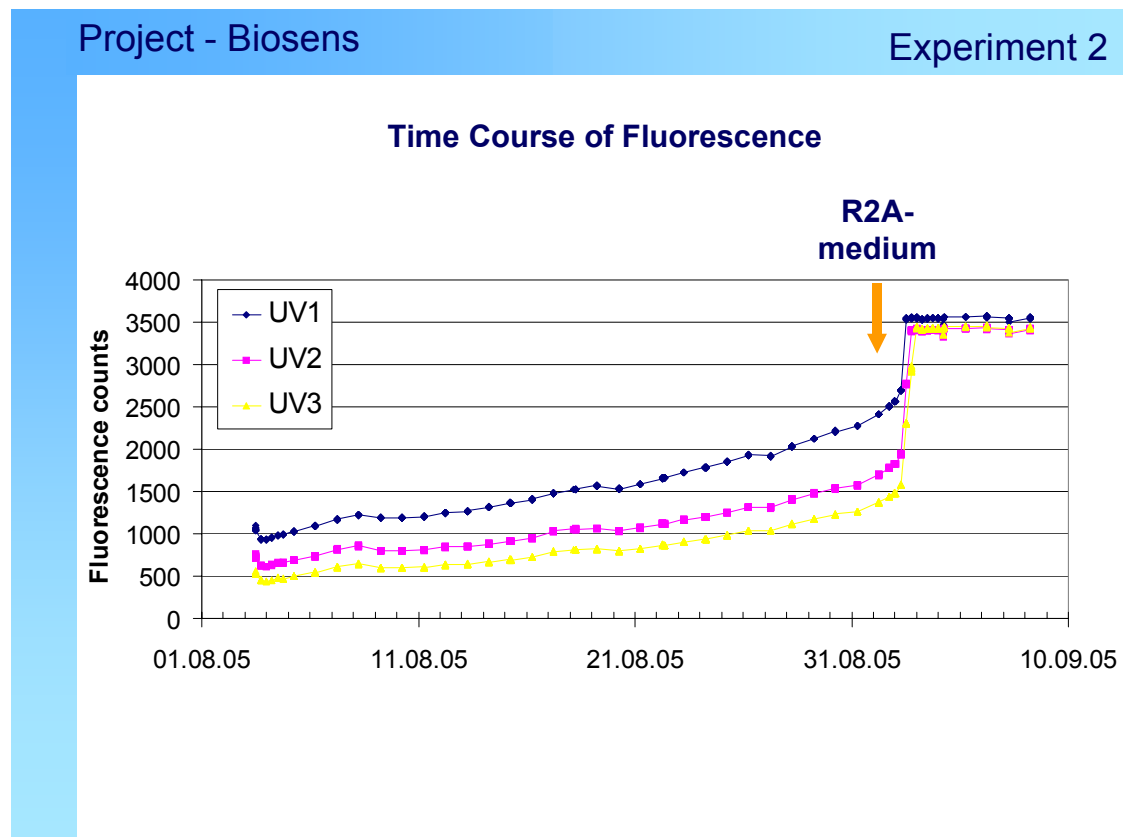
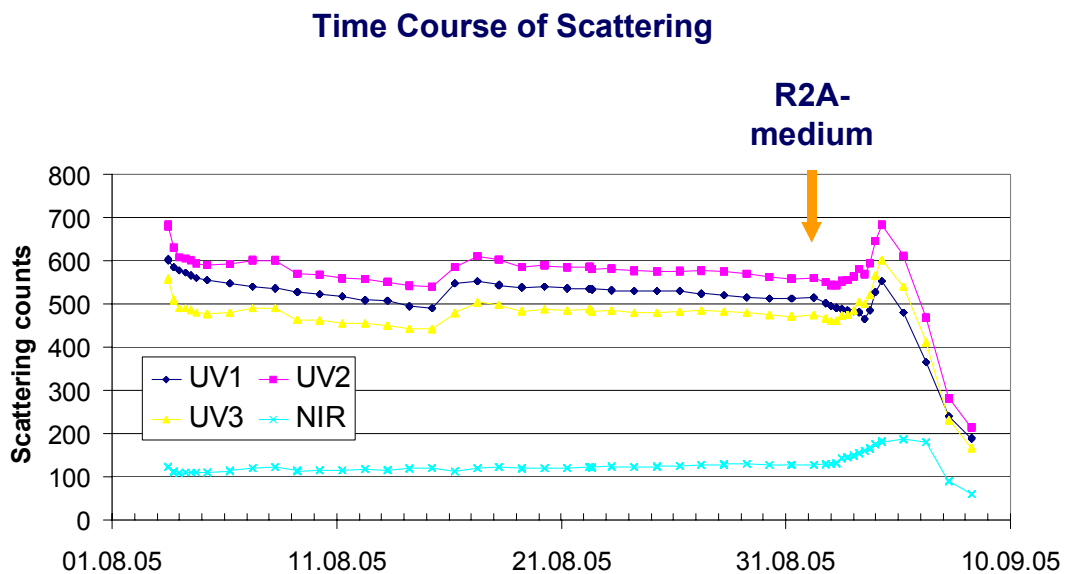


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Absorption bei verschiedenen Wellenlängen und Entwicklung der Gesamtzellzahl des Biofilms (Experiment 2)

Die Abb. 15 und 16 zeigen den zeitlichen Verlauf der Fluoreszenz und der Streuung. Während das Fluoreszenzverhalten dem der Absorption ähnelt, ist das der Streuung davon verschieden. Außerdem verhält sich die Streuung bei einer Wellenlänge im nahen Infrarotbereich (NIR) verschieden von den Messwerten, die für die Streuung bei unterschiedlichen Wellenlängen im ultravioletten Bereich erhalten wurden. Die UV-Streuung sinkt leicht ab. Die NIR-Streuung zeigt dagegen eine geringfügige Zunahme und steigt erst nach Zugabe der Nährstofflösung (R2A-Medium) deutlich an.



**Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei verschiedenen Wellenlängen (Experiment 2)**



**Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Streuung bei verschiedenen Wellenlängen (Experiment 2)**

Beide Phänomene, sowohl das unterschiedliche Verhalten von Streuung und Absorption bzw. Fluoreszenz bei verschiedenen Wellenlängen als auch die offensichtliche Korrelation zwischen Zellzahl und Absorption bzw. Fluoreszenz deuten darauf hin, dass die synchrone Verwendung verschiedener optischer Parameter bei verschiedenen Wellenlängen einen hohen Informationsgehalt zum Biofilm liefern. In einem 3. Versuch sollte u.a. diese Tatsache weiter untersucht werden.

### 3.2.2 Gesamtzellzahl des Biofilms

Die Werte der Gesamtzellzahl des Biofilms des 2. Experiments stiegen von  $1,46E+03$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  zu Versuchsbeginn auf  $1,42E+04$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  nach vier Wochen Laufzeit. Auch nach der Zugabe von R2A Medium zum Reaktor stieg die Gesamtzellzahl bis zum Versuchsende nicht weiter an (Abbildung 14).



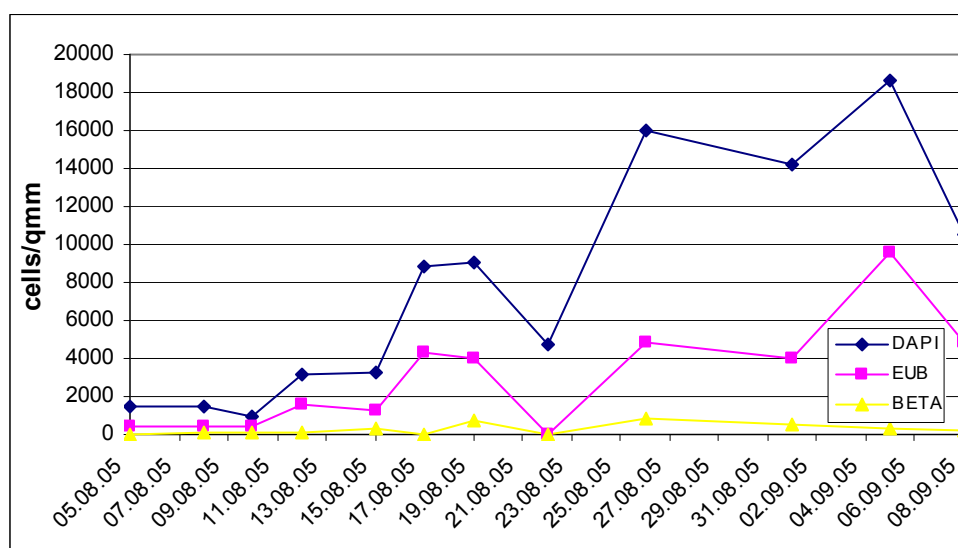
Die Werte der Gesamtzellzahlen für diesen Versuch sind in Tabelle 3 dargestellt.

**Tabelle 3: Gesamtzellzahl der Experiments 2 (Mittelwert mit Standardabweichung)**

Reaktorlauf I TU Berlin	Datum	Zellen / mm <sup>2</sup>	Staw
Reaktor ohne Medium	05.08.05	1,46E+03	1,40E+01
	08.08.05	1,42E+03	3,47E+01
	10.08.05	9,53E+02	1,36E+01
	12.08.05	3,18E+03	6,23E+01
	15.08.05	3,22E+03	4,70E+01
	17.08.05	8,80E+03	6,02E+01
	19.08.05	9,08E+03	6,82E+01
	22.08.05	4,76E+03	2,62E+01
	26.08.05	1,60E+04	6,27E+01
Reaktor mit Medium, Zugabe am 1.9.05	01.09.05	1,42E+04	9,57E+01
	05.09.05	1,86E+04	7,87E+01
	08.09.05	1,05E+04	9,07E+01

### 3.2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung des Biofilms

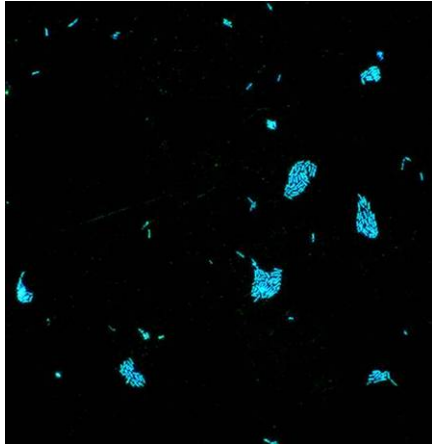
Der prozentuale Anteil der hybridisierbaren Bakterien im Experiment 2 variierte für den gesamten Versuchszeitraum im Bereich zwischen 30% und 50% der mit DAPI angefärbten Gesamtzellzahl. Der prozentuale Anteil der mit der BETA Sonde hybridisierbaren Zellen lag zwischen 2% und 17% (Abbildung 17).



**Abbildung 17: Entwicklung der Gesamtzellzahl und Anzahl der hybridisierbaren Eubakterien und  $\beta$ -Proteobakterien des Biofilms des Experiment 2.**

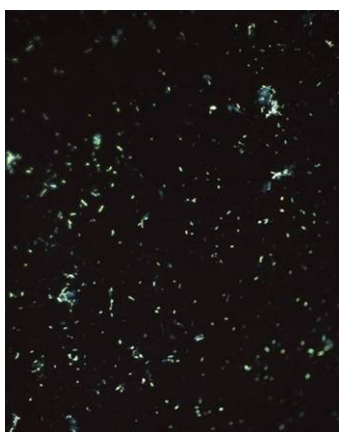
### 3.2.4 Fotografische Dokumentation des Biofilms

Im Experiment 2 wurde der Reaktor für 31 Tage mit Leitungswasser gespeist, danach erfolgte eine Substratzugabe (R2A Medium). Nach einer Entwicklungszeit von 15 Tagen konnte eine Aggregation der Zellen auf dem Aufwuchsträger festgestellt werden (Abbildung 18).

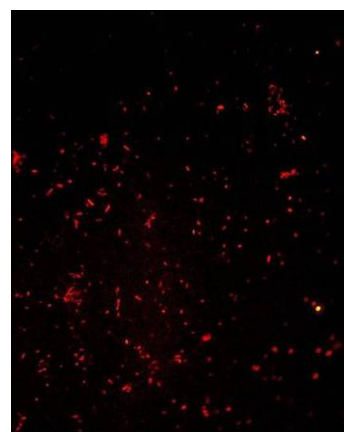


**Abbildung 18: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 15 Tage alten Biofilms ohne Substratzugabe (Experiment 2). Zellen DAPI gefärbt.**

In Abbildung 19 a und b sind epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Biofilms des Experiments 2 dargestellt. Nach der Substratzugabe konnte eine gleichmäßige Entwicklung des Biofilms auf dem Aufwuchsträger beobachtet werden.



a)



b)

**Abbildung 19: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines 38 Tage alten Biofilms; a: DAPI Färbung, b: Hybridisierung mit EUB Sonde.**

### 3.3 Experiment 3

Nach Reinigung und Desinfektion der gesamten Versuchsanlage erfolgte der Versuchsstart, indem frisches Trinkwasser mit einem Volumenstrom von 300 l/h im offenen Durchfluß durch den Rohrreaktor gepumpt wurde. Dem Trinkwasser wurde über eine Schlauchpumpe eine sterile Nährstofflösung (R2A-Medium) zudosiert (0,1 l/h), die nach einer Woche unterbrochen wurde, um im weiteren Verlauf des Experimentes die Auswirkung eines plötzlichen Nährstoffmangels auf den Biofilm zu untersuchen. Bei diesem Experiment wurde die Flüssigkeit nicht im Kreis gepumpt und an Stelle einer Tauchpumpe kam eine extern betriebene Kreiselpumpe zum Einsatz, um eine Erwärmung des Trinkwassers zu vermeiden.

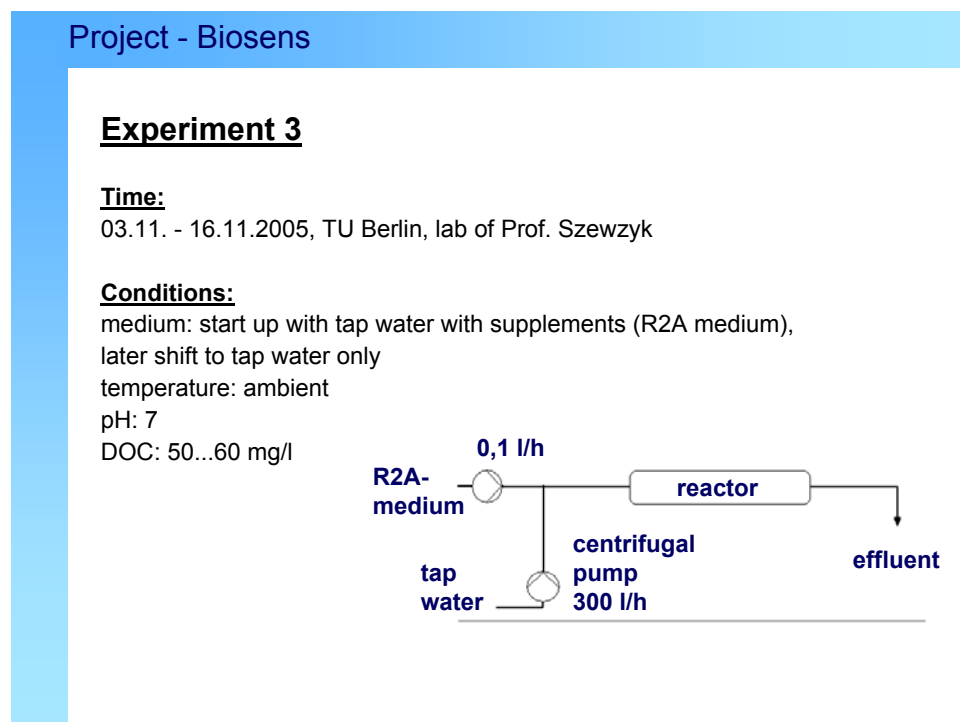
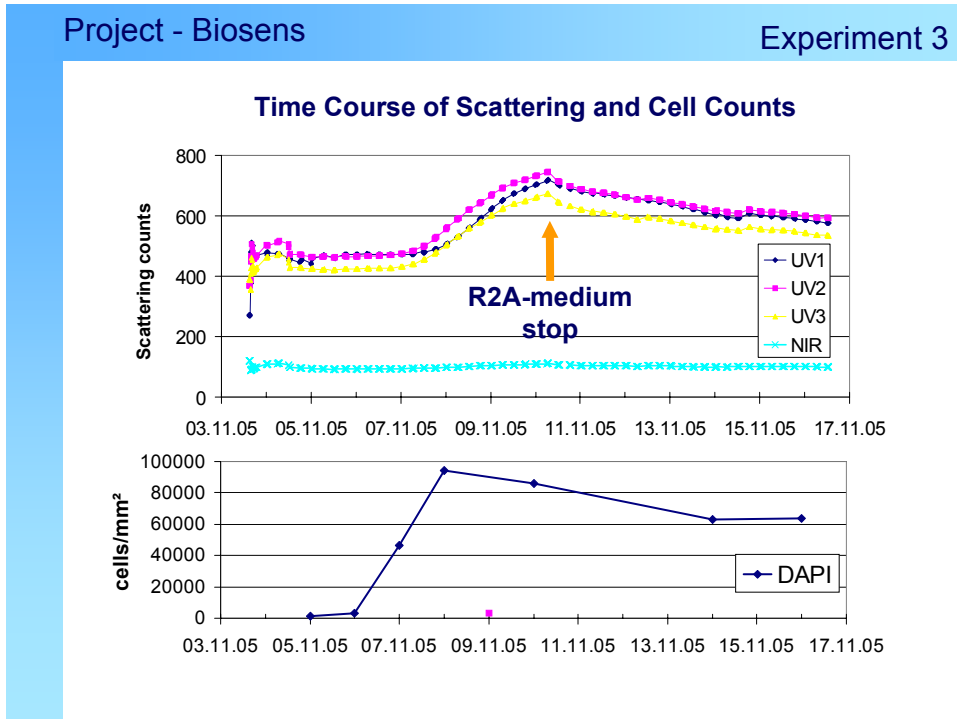


Abbildung 20: Versuchsaufbau Experiment 3

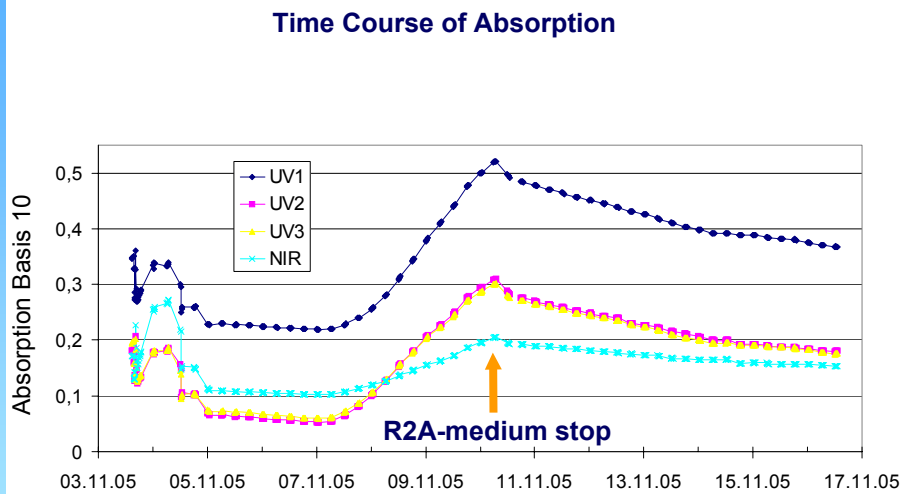
#### 3.3.1 Messverhalten der optischen Sonde

In Abb.21 sind im oberen Bild die Streuung und im unteren Bild die auf den optischen Fenstern der Referenzsonden gemessene Zellzahl in Abhängigkeit von der Zeit dargestellt. Auch hier ist es offensichtlich, dass das zeitliche Verhalten der Zellzahl einer typischen Biofilmformation folgt. Es korreliert mit dem Zeitverhalten der Streuung. Nach Abbruch der Nährstoffzugabe erfolgte kein weiteres Wachstum mehr. Die Werte für die

Zellzahl und Streuung nehmen leicht ab. Ein ähnliches Verhalten weist auch der Kurvenverlauf für die Absorption auf (Abb.22).

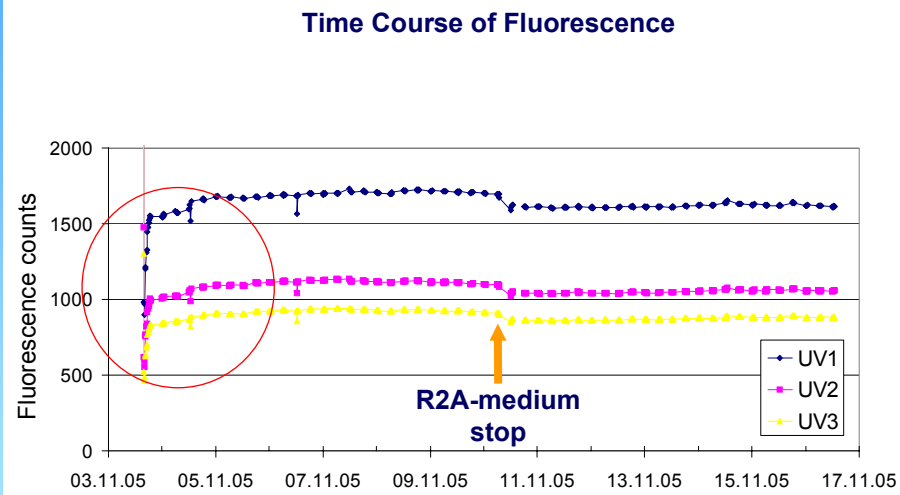


**Abbildung 21: Zeitlicher Verlauf der Streuung bei verschiedene Wellenlängen und Entwicklung der Gesamtzellzahl des Biofilms (Experiment 3)**

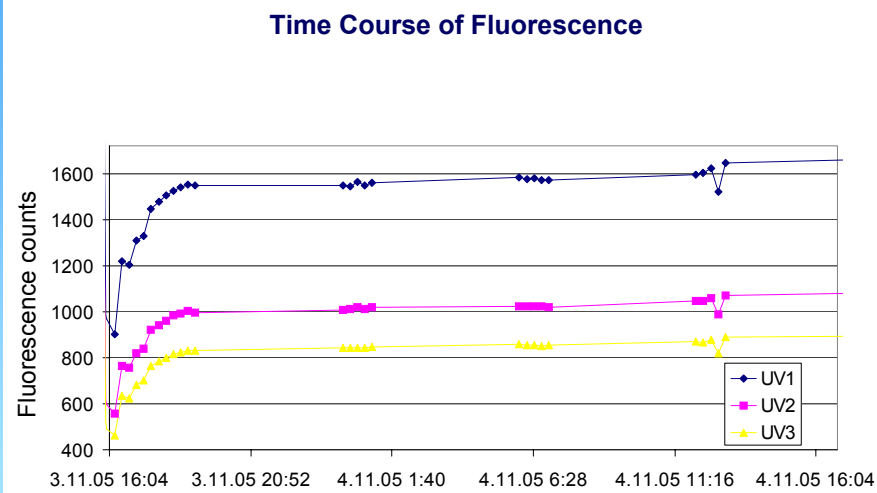


**Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Absorption bei verschiedenen Wellenlängen (Experiment 3)**

In Abb. 23 ist der zeitliche Verlauf der Fluoreszenzmessungen dargestellt, der offensichtlich ein deutlich anderes Verhalten als die Streuung und Absorption zeigt. In der unmittelbaren Anfangsphase des Foulingprozesses ist die Fluoreszenz durch einen extrem steilen Anstieg und in der danach folgenden Phase durch einen nur noch sehr geringen Anstieg gekennzeichnet.

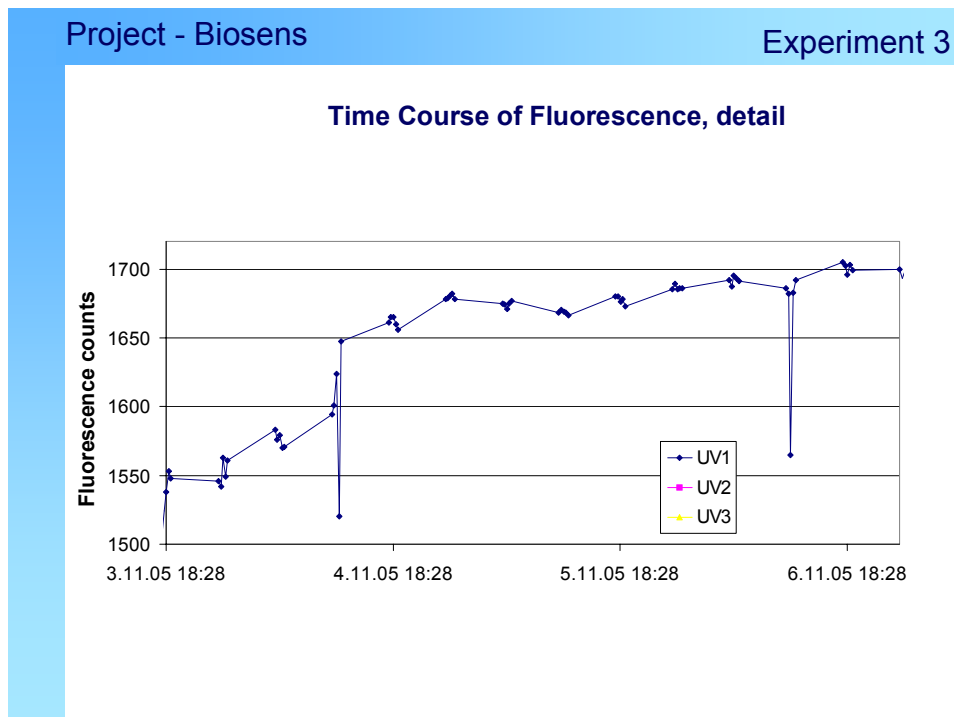


**Abbildung 23: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei verschiedene Wellenlängen (Experiment 3)**



**Abbildung 24: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei verschiedene Wellenlängen (zeitlicher Ausschnitt, Experiment 3)**

Der steile Anstieg ist in Abb. 24 mit einer größeren Auflösung dargestellt. Diese Phase kann als preconditioning phase bezeichnet werden, in der relativ schnell Adsorptionsprozesse ablaufen können, wie z.B. die Belegung des Glases mit Huminstoffen und Nährmedium. In der Abb. 25 ist die Fluoreszenz unmittelbar nach dieser preconditioning phase in einem weiteren Zeitfenster bzgl. der Fluoreszenzintensität stärker aufgelöst dargestellt. Die Fluoreszenz ähnelt hier einem typischen Biofilmformationsprozess, der eventuell durch fluoreszierende Mikroorganismen verursacht sein könnte.



**Abbildung 25: Zeitlicher Verlauf der Fluoreszenz bei verschiedenen Wellenlängen (zeitlicher Ausschnitt, Experiment 3)**

Während des Versuchszeitraumes wurden in definierten Zeitabständen Ablaufproben des Reaktors gezogen und im Labor bzgl. Absorption, Fluoreszenz und Streuung vermessen. Die Spektren variierten in nur kleinen Wertebereichen bei den Wellenlängen, bei denen auch der optische Foulingensensor arbeitet. Mit zunehmender Versuchsdauer konnte keine signifikante Änderung bzgl. der Signale für Absorption, Fluoreszenz und Streuung gemessen werden. Die in den Versuchen verwendete Nährstofflösung R2A hatte in der eingesetzten Verdünnung keinen messbaren Einfluss auf die optischen Eigenschaften des Freiwassers.

Im Gegensatz zum Freiwasser zeigten die Messwerte des Foulingensensors eine starke Dynamik und eine deutliche zeitliche Änderung der optischen Werte. Deshalb kann man davon ausgehen, dass die mit dem optischen Sensor gemessenen Werte primär durch die Belagsbildung auf dem Sensorfenster verursacht wurden.

Allgemein bestätigt das Experiment 3 die Ergebnisse aus dem 2. Versuch. So korrelieren einige optische Parameter mit der Zellzahl auf den Referenzsonden, andere zeigen bei

verschiedenen Wellenlängen ein unterschiedliches zeitliches Verhalten. Mehrere optische Parameter, die bei verschiedenen Wellenlängen gemessen wurden, beinhalten offensichtlich eine große Informationsvielfalt und könnten somit für eine umfassende Beurteilung und Überwachung von Foulingprozessen von großer Bedeutung sein.

### 3.3.2 Gesamtzellzahl des Biofilms

Im Versuch 3 stieg die Gesamtzellzahl der Bakterien des Biofilms von  $1,41E+03$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  an, bis sie am 5. Tag nach Versuchsbeginn mit  $9,43E+04$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  die stationäre Phase erreichte. Nach Beendigung der Mediumzugabe, acht Tage nach Versuchsbeginn, nahm die Gesamtzellzahl des Biofilms bis auf  $6,39E+04$  Zellen pro  $\text{mm}^2$  leicht ab (Abbildung 21).

Die Werte der Gesamtzellzahlen für diesen Versuch sind in Tabelle 4 dargestellt.

<b>Reaktorlauf II TU-Berlin</b>	<b>Datum</b>	<b>Zellen / <math>\text{mm}^2</math></b>	<b>Staw</b>
<i>Reaktor mit Medium</i>	05.11.05	$1,41E+03$	$1,72E+01$
	06.11.05	$3,32E+03$	$3,53E+01$
	07.11.05	$4,65E+04$	$3,36E+02$
	08.11.05	$9,43E+04$	$5,01E+02$
	09.11.05	$3,29E+03$	$3,28E+01$
	10.11.05	$8,58E+04$	$1,77E+03$
<b>Reaktor ohne Medium, Mediumstopp am 10.11.05</b>	14.11.05	$6,30E+04$	$4,09E+02$
	16.11.05	$6,39E+04$	$4,41E+02$

**Tabelle 4: Gesamtzellzahl im Biofilm des Experiments 3 (Mittelwert mit Standardabweichung)**

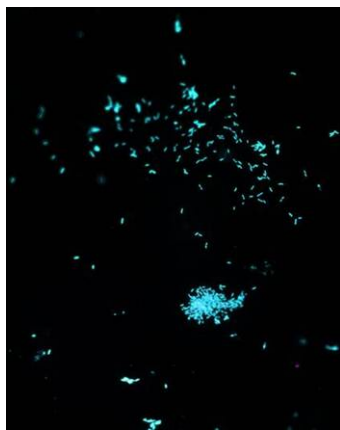


## Chapter 4

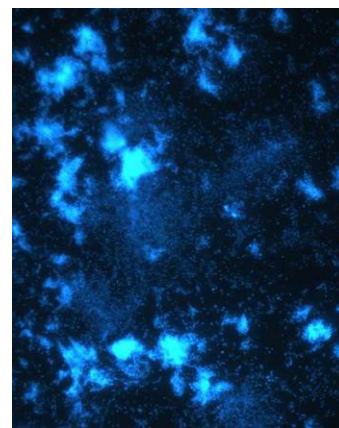
### ATP und DOC Bestimmung im Freiwasser

#### 4.1.1 Fotografische Dokumentation des Biofilms

Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahmen des Biofilms im dritten Experiment zeigen unterschiedliche Zellmorphologien mit und ohne Substratzugabe (Abbildung 26). Mit Substratzugabe sind nach 2 Tagen Entwicklung auf dem Aufwuchsträger aggregierte und einzeln vorliegende längliche stäbchenförmige Bakterien zu erkennen (Abbildung 26 a). Im 13 Tage alten Biofilm (ohne Substrat) werden kleine runde Zellen dokumentiert (Abbildung 26 b).



a)



b)

**Abbildung 26: Epifluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines mit DAPI gefärbten Biofilms; a: 2 Tage, mit Substrat; b: 13 Tage, ohne Substrat.**

Bei der Bestimmung des DOC Gehalts konnten keine Unterschiede zwischen dem DOC-Gehalt des Reaktorwassers am Reaktor-Einlass und -auslass ermittelt werden. Der ATP Gehalt des Leitungswassers wurde mit einer RLU= 30 bestimmt. Es konnte ein Ansteigen der ATP Menge im Verlauf des Versuchs beobachtet werden. Weiterhin nahm der Gehalt an ATP innerhalb des Reaktors um das vier- bzw. fünffache zu (Tabelle 5).

**Tabelle 5: DOC und ATP Gehalt des Durchflusswassers des Reaktors (Experiment 3)**

	<b>DOC [ppm]</b>		<b>ATP</b>	
	Inflow	Outflow	Inflow	Outflow
7.11.05	52	61	(30 LW)	123
8.11.05		52		259
9.11.05	49	53	167	810

## Chapter 5

### DISKUSSION

Die ersten Untersuchungen wurden an einem realen Ablauf der Kläranlage Ruhleben durchgeführt. Die sich entwickelnden Biofilme setzten sich daher aus der gesamten Vielfalt der in dem Wasser enthaltenen Organismen zusammen. Neben Bakterien, Pilzen und Protozoen waren makroskopisch sichtbare Tiere, insbesondere Schnecken, häufig zu finden. Diese Gemeinschaft aus Mikroorganismen und verschiedenen „Weidegängern“, die sich von den Bakterien ernähren, stellt die komplexeste Form eines Biofilms dar und wird oft als Aufwuchs bezeichnet. Die Komplexität dieser Biofilme rührt einerseits von den unterschiedlichen Wachstumsformen her, und andererseits vom Einfluss der Weidegänger, die Teile des Biofilms abweiden und damit Platz für Neubesiedelungen schaffen. Andere Teile des Biofilms werden nicht abgeweidet und somit können sich Organismen und Strukturen entwickeln, wie sie typisch sind für reife Biofilme. Somit ergibt sich ein Nebeneinander von Strukturen ganz unterschiedlicher Dicke und Dimension (Mikrometer bis Millimeter). Diese sowohl räumliche als auch zeitliche Heterogenität stellt für einen Biofilm offensichtlich die größtmögliche Komplexität dar.

Die Untersuchung, Dokumentation und Interpretation eines so komplexen Biofilms mit Hilfe eines optischen Sensors ist nur nach sorgfältigen Vorversuchen und der kombinierten Auswertung mikrobiologischer und physikalischer Daten möglich.

Die Untersuchungen, die anschließend im Labor des Fachgebiets Umweltmikrobiologie der TU Berlin durchgeführt wurden, dienten dazu, erste grundlegende Korrelationen zwischen mikrobiologischen Daten und den physikalischen Messwerten zu ermitteln. Um die Komplexität des Systems zunächst möglichst gering zu halten, wurden Biofilme in Trinkwassersystemen als Modell gewählt. Diese Biofilme wurden im Fachgebiet Umweltmikrobiologie schon seit vielen Jahren intensiv untersucht, sodass die zu erwartenden Strukturen überschaubar waren.

Nach entsprechender Kalibrierung der Sonde bzw. des Messgerätes konnte die Entwicklung des Biofilms sehr gut dokumentiert werden. Die mikrobiologischen Daten zu Dichte, Zusammensetzung und Struktur des Biofilms korrelierten sehr gut mit Absorptionsdaten der optischen Sonde. So konnte zum Beispiel das Wachstum der Mikroorganismen im Biofilm nach Zugabe von organischem Substrat anhand der physikalischen Parameter verfolgt werden.

Es zeigte sich allerdings auch, dass der Einsatz einer Sonde, die mehrere Messparameter gleichzeitig erfasst, die Möglichkeit eröffnet, Biofilme und Biofouling in sehr unterschiedlichen Systemen und Ausprägungen zu erfassen und zu interpretieren. Noch nicht alle physikalischen Parameter konnten eindeutig Strukturen oder Substanzklassen zugeordnet werden. Allerdings weisen die meisten Parameter Korrelationen mit den bisher ermittelten mikroskopischen und mikrobiologischen Daten auf, was darauf hindeutet, dass möglicherweise noch wesentlich differenziertere

Aussagen über den Zustand und die Zusammensetzung der Biofilme gemacht werden können. So ist zum Beispiel zu vermuten, dass einige der Absorptionsdaten mit dem Gehalt und Redoxzustand von NAD/NADH+H<sup>+</sup> korrelieren, was direkte Aussagen über den physiologischen Zustand der Mikroorganismen ermöglichen würde. Dies zeigte sich bei dem letzten Versuchsansatz (Experiment 3), als nach anfänglicher Substratzugabe und daraus resultierendem Wachstum des Biofilms die Zugabe von Nährstoffen unterblieb. Im mikroskopischen Bild zeigte sich für diese Phase der Substratlimitierung deutlich eine morphologische Anpassung der Bakterien (kleine Zellen) und eine konstante Dichte des Biofilms. Diese Befunde wurden durch die physikalischen Parameter ebenfalls dargestellt.

Auch die Einlagerung von anorganischen Komponenten, wie zum Beispiel Eisen- und Manganoxiden oder Mineralpartikeln, könnte anhand der Veränderungen spezifischer Signale erfasst werden. Redoxreaktionen, wie sie bei der Eisenoxidation bzw. -reduktion eine Rolle spielen, könnten erfassbar sein und damit die online Verfolgung und Dokumentation von Prozessen wie Korrosion, Verockerung und Abbauprozesse in Böden und Gewässern (Grundwasser, Oberflächenwasser) ermöglichen.

## **Chapter 6**

### **SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK**

Der optische Fouling-Sensor ist grundsätzlich für die Überwachung von Foulingprozessen an Oberflächen geeignet.

Für ein besseres und umfassendes Verständnis des Foulingprozesses ist es offensichtlich notwendig, mehrere optische Parameter und mehrere Wellenlängen in einem optischen Sensor zu aktivieren.

Weitere Untersuchungen sind notwendig, um Algorithmen und Kalibrierfunktionen zu entwickeln, die für die Steuerung von Antifoulingmaßnahmen in der praktischen Wasserwirtschaft nutzbar sind.

## Chapter 7

### LITERATUR

- Amann, R.I., Krumholz, L., Stahl, D.A., 1990. Fluorescent-oligonucleotide probing of whole cells  
for determinative, phylogenetic, and environmental studies in microbiology. *J. Bacteriol.*  
172, 762-770.
- Daims, H., Bruhl, A., Amann, R., Schleifer, KH., Wagner, M., 1999. Probe EUB338 is  
insufficient  
for the detection of all Bacteria: Development and evaluation of a more comprehensive  
probe set. *Syst. Appl. Microbiol.* 22, 434-444.
- Deutsche Einheitsverfahren zur Wasser-, Abwasser- und Schlammuntersuchung (DEV),  
1975.  
Bestimmung des Gehaltes an ungelösten Stoffen und ihres Glühverlustes. Ed.  
Fachgruppe Wasserchemie in der Gesellschaft deutscher Chemiker, Verlag Chemie, H2.
- Kalmbach, S., Manz, W., Szewzyk, U., 1997. Dynamics of biofilm formation in drinking  
water:  
phylogenetic affiliation and metabolic potential of single cells assessed by formazan  
reduction and in situ hybridization. *FEMS Microbiol. Ecol.* 22, 265-279.
- Manz, W., Amann, R.I., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.H., 1992. Phylogenetic  
oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and  
solutions. *Syst. Appl. Microbiol.* 15, 593-600.
- Servais P., Anzil A., Ventresque C.; 1989. Simple method for determination of  
Biodegradable  
Dissolved Organic Carbon in water. *Applied and Environmental Microbiology*, Oct. p.  
2732-2734