



Bayerisches Landesamt  
für Wasserwirtschaft

A large, stylized blue brushstroke graphic that starts as a thick, rounded shape on the left and tapers into a long, thin, slightly curved line extending towards the top right of the page.

**Charakterisierung von  
Fadenbakterien zur  
Bekämpfung von Schaum  
in Belebungsbecken**

Materialien Nr. 104 (Februar 2002)



**Charakterisierung von  
Fadenbakterien zur  
Bekämpfung von Schaum  
in Belebungsbecken**

Materialien Nr. 104 (Februar 2002)

**Herausgeber:** Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Lazarettstraße 67, D-80636 München,  
eine Behörde im Geschäftsbereich des Bayerischen Staatsministeriums für Landesentwicklung  
und Umweltfragen

**Bearbeitung:** Dipl. Biol. Margit Schade, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft  
Dr. Hilde Lemmer, Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft

**Digitaldruck:** Schwabinger Copy-Service, München  
Für den Druck wurde Recycling-Papier aus 100% Altpapier verwendet.

**Nachdruck und Wiedergabe – auch auszugsweise – nur mit Genehmigung des Herausgebers**

## Vorwort

Niedrig belastete Belebungsanlagen für Nitrifikation/Denitrifikation sowie biologische Phosphorelimination leiden vielerorts – insbesondere über die Wintermonate – unter einer starken Schaum- und Schwimmschlamm-Bildung. In der klassischen Mikroskopie fällt dabei meist eine starke Entwicklung von einer oder mehrerer der folgenden sechs Fadenbakteriengruppen auf: nocardioforme Actinomyceten, „*Microthrix parvicella*“, „*Nostocoida limicola*“, sowie Typ 0092, Typ 0041/0675 und Typ 1851.

Das vorliegende Untersuchungsprogramm hat sich daher die physiologische Charakterisierung einiger dieser Fadenbakterien zur Aufgabe gemacht, um dadurch Hinweise zur biologisch begründeten Bekämpfung dieser Bakterien zu erlangen. Damit kann der Bericht, insbesondere das Kapitel D, dem Praktiker Hilfestellung leisten, Absetzproblemen von belebtem Schlamm durch Schaumbildung zu begegnen.

Die Entwicklung und der Einsatz von Fluoreszenz-markierten Gensonden als neuer Methode zur verlässlichen taxonomischen Einordnung von Bakterien in einen „Stammbaum“ zeigte, dass Organismen, die in der klassischen Mikroskopie praktisch gleich aussehen, teils sehr unterschiedlichen Bakteriengruppen zuzuordnen sind. Dies erklärt die früher beobachteten z. T. widersprüchlichen Ergebnisse bei der Bekämpfung, da verschiedenartige Organismen unterschiedlicher Bekämpfungsmaßnahmen bedürfen. Als Beispiel dienen im vorliegenden Bericht Fadenorganismen des „Morphotyps *Nostocoida limicola*“, die z. T. zu den Hoch-GC-Bakterien gehören, die insbesondere in Anlagen mit hohem Eintrag an zuckerhaltigem Abwasser auftreten, dessen Vermeidung zugleich Bekämpfungsmaßnahme darstellt. Den den grünen Nichtschwefelbakterien angehörenden Vertretern dieser Gruppe hingegen ist durch Erniedrigung der Schlammbelastung zu begegnen. Actinomyceten können trotz Zugehörigkeit zu unterschiedlichsten Gattungen generell durch strikte Vermeidung des Zulaufs hoher Konzentrationen an langkettigen Fettsäuren zur Biologie eingedämmt werden. „*Microthrix parvicella*“ als der weitest verbreitete Fadenorganismus in Schaum-anlagen erwies sich als gegen Aluminiumsalze anfällig.

Wir bedanken uns an dieser Stelle bei allen Kläranlagenbetreibern, die uns während der Untersuchungen mit Rat und Tat zur Seite standen. Weiter gilt unser Dank dem Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen für die Finanzierung des Projekts.

Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft  
Abteilung „Stoffbewertung und Analytik“  
München, im Februar 2002



Dr. Reinhard Röder



## Dank

Ein herzliches Dankeschön geht an alle Kläranlagenbetreiber, die uns bei unserem Vorhaben tatkräftig unterstützt haben.

Der Fa. Vermicon, insbesondere Frau Dr. Beimfohr, danken wir für die taxonomischen Bestimmungen bzw. die Entwicklung von Gensonden für einige unserer Fadenbakterienisolate.

Für die Durchführung chemischer Analysen in Abwasser und Kulturmedien möchten wir Frau Dr. Laschka im Ref. 62 in unserem Hause sowie Frau Dipl. Chem. Dobler-Schnell am Lehrstuhl für Wassergüte und Abfallwirtschaft der TU München danken.

Unser besonderer Dank gilt der Mannschaft von Dr. Metzner in der Außenstelle Großlappen des Ref. 66, insbesondere Frau Gröbl und Frau Ressler für chemische Abwasseranalysen sowie Herrn Huber und Herrn Leppert für ihre Unterstützung bei der Beschaffung von Schlammproben.

Last not least möchten wir uns herzlich beim Bayerischen Staatsministerium für Landesentwicklung und Umweltfragen für die Förderung des Projekts bedanken, ohne die wir diese Arbeiten nicht hätten durchführen können.



## Inhalt

<b>Zusammenfassung</b> .....	1
<b>A Einleitung</b> .....	2
<b>B Material und Methoden</b> .....	3
1 Belebtschlämme .....	3
2 Isolierung der fadenförmigen Bakterien .....	3
2.1 Verwendete Medien .....	3
2.2 Vorbehandlung der Proben .....	4
2.3 Isolierungsmethoden .....	5
3 Charakterisierung der Isolate .....	6
3.1 Identifizierung anhand klassischer Florenanalysen .....	6
3.2 Phylogenetische Charakterisierung .....	6
4 Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) .....	7
4.1 Verwendete Lösungen .....	7
4.2 Zellernte der Reinkulturen .....	8
4.3 Fixierung der Proben .....	9
4.3.1 Paraformaldehydfixierung .....	9
4.3.2 Ethanolfixierung .....	9
4.4 <i>In situ</i> Einzelzellhybridisierung .....	9
4.4.1 Hybridisierungsprozedur .....	9
4.4.2 Enzym-Vorbehandlung .....	10
4.4.3 Hybridisierungs- und Waschpuffer .....	10
4.4.4 Verwendete Oligonukleotidsonden .....	11
4.5 Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie ..	11
5 Physiologische Untersuchungen an fadenförmigen Bakterien .....	12
5.1 Verwendete Medien .....	12
5.2 Abbau von C-Quellen in Erlenmeyerkolben .....	13
5.3 Abbau von C-Quellen in Mikrotiterplatten .....	13
5.3.1 Testdurchführung .....	13
5.3.2 Untersuchte C-Quellen in den Mikrotiterplatten .....	14
5.4 Abbau von C-Quellen durch " <i>Microthrix parvicella</i> " nach Rhamnolipid- Zugabe .....	16
5.4.1 Verwendete Medien .....	16
5.4.2 Rhamnolipid-Produktion durch <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027 .....	16
5.4.3 Rhamnolipid-Extraktion .....	16
5.4.4 Bestimmung der Rhamnolipid-Konzentration über L-Rhamnose-Messung .	17
5.4.5 Wachstumstests mit Rhamnolipid-Zugabe .....	17

<b>C</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b> .....	18
1	<i>"Nostocoida limicola"</i> .....	18
1.1	<i>"Nostocoida limicola"</i> -ähnliche Organismen aus der Gruppe der grünen Nichtschwefelbakterien .....	18
1.1.1	Morphologische Charakterisierung .....	18
1.1.2	Phylogenetische Charakterisierung .....	19
1.1.2.1	Taxonomische Einordnung aufgrund der Analyse der 16S rRNS .....	19
1.1.2.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung .....	20
1.1.3	Physiologische Charakterisierung.....	23
1.1.3.1	Wachstum in komplexen Nährmedien .....	23
1.1.3.2	Wachstum in Minimalmedien mit verschiedenen C- und N-Quellen .....	24
1.2	<i>"Nostocoida limicola"</i> -ähnliche Organismen aus dem Subphylum der Actinomyceten .....	25
1.2.1	Morphologische Charakterisierung .....	26
1.2.2	Phylogenetische Charakterisierung .....	26
1.2.2.1	Taxonomische Einordnung aufgrund der Analyse der 16S rRNS .....	26
1.2.2.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung .....	26
1.2.3	Physiologische Charakterisierung.....	27
1.2.3.1	Wachstum in komplexen Nährmedien .....	27
1.2.3.2	Wachstum in Minimalmedien mit verschiedenen C- und N-Quellen .....	28
1.2.3.3	Wachstum auf Biolog-Mikrotiterplatten .....	29
1.3	<i>"Nostocoida limicola"</i> -ähnliche Organismen - Zusammenfassung .....	32
2	<i>"Microthrix parvicella"</i> .....	33
2.1	Morphologische Charakterisierung .....	33
2.2	Phylogenetische Charakterisierung .....	33
2.2.1	Taxonomische Einordnung .....	33
2.2.2	Fluoreszenz <i>in situ</i> Hybridisierung .....	34
2.3	Physiologische Charakterisierung.....	34
2.3.1	Wachstum mit verschiedenen C- und N-Quellen .....	34
2.3.2	Abbau von C-Quellen durch <i>"Microthrix parvicella"</i> nach Rhamnolipid-Zugabe.....	36
3	Typ 0092.....	37
3.1	Morphologische Charakterisierung .....	37
3.2	Physiologische Charakterisierung.....	37
3.3	Phylogenetische Charakterisierung .....	38
4	Typ 0041/0675.....	39
4.1	Physiologische Charakterisierung.....	39
4.2	Phylogenetische Charakterisierung .....	40
5	Typ 1851.....	41

<b>D</b>	<b>Schlussfolgerungen und Hinweise für die Wasserwirtschaft</b> .....	42
1	Mikrobiologische Betrachtungen zur Abwasserreinigung früher und heute .	42
2	Charakterisierung von Fadenbakterien aus Schaum und Hinweise zur Bekämpfung.....	45
2.1	Nocardioforme Actinomyceten .....	45
2.2	<i>"Microthrix parvicella"</i> .....	46
2.3	<i>"Nostocoida limicola"</i> .....	47
2.4	Typ 0041/0675 .....	48
2.5	Typ 0092 .....	48
2.6	Typ 1851 .....	48
	Literatur .....	49
	Anhang .....	53



## Zusammenfassung

Niedrig belastete Belebungsanlagen für Nitrifikation/Denitrifikation sowie biologische Phosphorelimination leiden vielerorts unter einer starken Schaum- und Schwamm-schlamm-bildung. Dieses Problem geht meist mit der starken Entwicklung einer oder mehrerer der folgenden sechs Fadenbakteriengruppen einher, die in der klassischen Lichtmikroskopie als erstes ins Auge fallen und Ziel der vorliegenden Untersuchung waren: nocardioforme Actinomyceten, "*Microthrix parvicella*", "*Nostocoida limicola*", sowie die nach Eikelboom (1975) zunächst mit Typnummern versehenen Bakterien Typ 0092, Typ 0041/0675 und Typ 1851. Ähnlich aussehende Fadenorganismen dieser Gruppen, sog. "Morphotypen", erwiesen sich z.T. als nicht nahe verwandt und zu sehr verschiedenartigen Bakteriengruppen zugehörig, was auch verschiedene Konkurrenzmechanismen wahrscheinlich macht und damit unterschiedliche Bekämpfungsmaßnahmen erfordert. **Nocardioforme Actinomyceten** setzen sich trotz ihrer Vielseitigkeit bei der Verwertung verschiedener Abwasserinhaltsstoffe insbesondere bei hohem Eintrag von fett- und ölhaltigen Stoffen durch, deren Vermeidung daher probates Bekämpfungsmittel ist. "*Microthrix parvicella*" hat ein sehr eingeschränktes Nahrungsspektrum mit langkettigen Fettsäuren als Kohlenstoffsubstrat sowie reduzierten Stickstoff-, Phosphor- und Schwefelquellen und ist daher in anoxischen Denitrifikations- und anaeroben Bio-P-Zonen konkurrenzfähig. Der Zulauf vieler Schaumanlagen mit "*M. parvicella*" ist jedoch im Hinblick auf Fetteintrag unauffällig. Unsere Untersuchungen zeigten, dass Fettsäuren aus zerfallenden Zellen im Schlammstabilisierungsbereich bzw. organismenbürtige Biotenside als Nahrungsquelle dienen können. Zur "*M. parvicella*"-Bekämpfung wird also eine leichte Erhöhung der Schlammbelastung empfohlen. Weiter hat sich der Einsatz aluminiumhaltiger Fällmittel im Vergleich zu eisenhaltigen in einer Dosis um 3 g Al/(kg TS·d) bewährt. Ein Sauerstoffgehalt über 2 mg/l und ein Ammoniumgehalt unter 1 mg/l ist wesentlich zur Unterdrückung reduzierter Stickstoffquellen. Daher ist auch bei der Trübwasserrückführung für einen geringen Eintrag von Ammonium Sorge zu tragen. Fadenorganismen des Morphotyps "*Nostocoida limicola*", erwiesen sich als taxonomisch sehr unterschiedlich. Zur Gruppe der Hoch-GC-Bakterien gehörige Stämme treten insbesondere in Anlagen mit hohem Eintrag an zuckerhaltigem Abwasser auf, dessen Vermeidung Bekämpfungsstrategie darstellt. Zur Gruppe der grünen Nichtschwefelbakterien gehörige Stämme hingegen ist durch Erniedrigung der Schlammbelastung und damit stabilisierter Nitrifikation zu begegnen. Fadenbakterien der Typnummern **0041/0675, 0092 und 1851** konnten wegen ihres starken Aufwuchses nicht isoliert und daher nicht charakterisiert werden. Empirisch erwies sich das Angebot von partikulärem Substrat aus (anoxischen) Zonen ohne ausreichende Hydrolyse für Typ 0041/0675 förderlich.

## A Einleitung

Die Bildung hochviskoser Schäume ist in den letzten Jahren ein häufig beobachtetes Betriebsproblem von Kläranlagen nach dem Belebungsverfahren. Insbesondere die stickstoffeliminierenden Anlagen mit Nitrifikation/Denitrifikation, die zur Gewährleistung der Nitrifikation sehr niedrig belastet gefahren werden, aber auch Anlagen mit biologischer Phosphorelimination sind von diesem Phänomen betroffen. Die Schaumbildung betrifft dabei nicht nur Belebungsbecken und Nachklärung, sondern auch den Faulraum.

Schaumbildung kommt zustande, wenn die folgenden drei Faktoren im "richtigen" Verhältnis im Abwasser vorliegen: 1) fein verteilte Gasbläschen, 2) hydrophobe Abwasserbestandteile und 3) oberflächenaktive Substanzen. Im Anschluss an die Bildung gasgefüllter "Zellen" werden die Grenzflächen durch die Anlagerung von hydrophoben und/oder oberflächenaktiven Substanzen stabilisiert. Gasbläschen finden sich als Luft- oder Sauerstoffbläschen im Belebungsbecken, als gasförmige Stickstoffkomponenten in der Denitrifikationszone oder auch als Methan im Faulraum. Das bedeutet, dass im Zusammenspiel mit den anderen o.g. Faktoren in all den genannten Bereichen im System Schaum auftreten kann. Hydrophobe Inhaltsstoffe können über das Abwasser z.B. in Form von Fetten oder aliphatischen Kohlenwasserstoffen in die Anlage gelangen, ebenso wie oberflächenaktive Substanzen. Aber auch Bakterien können, insbesondere unter den im Niedriglast-Bereich herrschenden Mangelbedingungen wie niedrige Konzentration an Kohlenstoffsubstrat oder auch Sauerstoffmangel, biogene oberflächenaktive Stoffe produzieren oder ihre Zelloberfläche hydrophob, d.h. wasserabstoßend machen. Dadurch können sie Schaumbläschen nicht nur initiieren, sondern stabilisieren sie dadurch, dass sie sich aufgrund ihrer hydrophoben Zelloberfläche an Gas-Wasser-Grenzflächen anheften. Damit fördern sie die Tendenz des Schlammes zu flotieren.

Frühere Untersuchungen haben gezeigt, dass seit Einführung der niedrig belasteten Verfahrensweise der Nitrifikationsanlagen tendenziell eine Verschiebung der Bakteriengemeinschaft stattgefunden hat von typischen "Hochlast-Fadenbakterien" wie z.B. *Sphaerotilus natans* oder Typ 021N hin zu Vertretern, die bei niedriger Belastung überwiegen wie z.B. Gram-positive Bakterien. Diese zeichnen sich aufgrund ihres Gehalts an langkettigen Fettsäuren durch eine stark hydrophobe Zelloberfläche aus. In den klassischen mikroskopischen Schlammuntersuchungen zeigte sich, dass in Kläranlagen mit Schaumproblemen sechs Fadenbakterien eine wichtige Rolle spielen. "*Microthrix parvicella*" und nocardioforme Actinomyceten waren in flotierten Schlammfraktionen angereichert, aber auch "*Nostocoida limicola*" sowie Typ

0041/0765, 1851 und 0092 wurden häufig in schäumenden Belebtschlämmen gefunden.

Unabdingbare Voraussetzung zur gezielten Bekämpfung von Schaumproblemen ist eine biologische Charakterisierung der genannten Organismen. Zur Untersuchung der Milieu- und Substratbedingungen ist es notwendig, die Bakterien zu isolieren und zu kultivieren und ihre physiologischen Eigenheiten zu bestimmen. Weiterhin ist auch die taxonomische Zuordnung dieser Organismen von großem Interesse, da die Möglichkeit besteht, dass sich hinter einer Typ-Bezeichnung mehrere Bakteriengattungen und/oder –arten verbergen. Da diese durch rein morphologische Kriterien nicht aufgeschlüsselt werden können, wurden fluoreszenzmarkierte rRNS-gerichtete Oligonukleotidsonden entwickelt und eingesetzt.

## **B Material und Methoden**

### **1 Belebtschlämme**

Zur Isolierung von fadenförmigen Bakterien wurden Belebtschlämme verschiedener kommunaler sowie industrieller Kläranlagen (Papierindustrie, Tierkörperbeseitigungsanstalt) verwendet.

### **2 Isolierung der fadenförmigen Bakterien**

#### **2.1 Verwendete Medien**

Belebtschlammhydrolysat (HA; nach Eikelboom 1975):

Belebtschlamm der zweiten Stufe einer kommunalen Kläranlage wurde auf ein Trockengewicht von 20 g/l eingedickt und unter Zugabe von 10 ml 10 N NaOH/l für 60 min unter Rückflusskühlung gekocht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Neutralisation mit 36 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wurde der Schlamm bei 20 000 g für 30 min zentrifugiert und der Überstand anschließend für 15 min bei 121°C sterilisiert.

Zur Herstellung von Flüssigmedium wurde das Schlammhydrolysat mit aqua dest auf einen CSB-Wert von 2 g O<sub>2</sub>/l verdünnt und nach dem Autoklavieren mit 10 ml/l einer sterilfiltrierten Vitaminlösung (Thiamin 100 µg/l; Riboflavin 100 µg/l; Cyanocobalamin 5 µg/l; Biotin 5 µg/l; Pantothenat 100 µg/l; Folsäure 5 µg/l; Nicotinsäure 100 µg/l; Pyridoxin 100 µg/l Endkonzentration im Medium) versetzt. Bei der Herstellung von festem Medium wurde zusätzlich 12 g/l Bacto Agar zugegeben.

JV-Medium (nach van Veen, 1973):

Glucose 0,15 g/l;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g/l;  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  0,01 g/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,05 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,05 g/l; KCl 0,05 g/l;  $\text{CaCO}_3$  0,1 g/l; Bacto Agar 12 g/l; pH  $7,2 \pm 0,2$ . Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml/l einer sterilfiltrierten Vitaminlösung (Zusammensetzung siehe oben) zugesetzt.

R2A-Medium (nach Reasoner und Geldreich 1985):

Hefe-Extrakt 0,5 g/l; Proteose Pepton 0,5 g/l; Casamino Acids 0,5 g/l; Glucose 0,5 g/l; lösliche Stärke 0,5 g/l; Natriumpyruvat 0,3 g/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,3 g/l;  $\text{MgSO}_4$  0,05 g/l; Bacto Agar 15 g/l; pH  $7,2 \pm 0,2$ . Da viele Fadenbakterien niedrige Nährstoffkonzentrationen bevorzugen, wurde das R2A-Medium auch 1:5 sowie 1:10 verdünnt eingesetzt (die Konzentration an Bacto Agar von 15 g/l wurde jedoch beibehalten).

Microthrix-parvicella-Medium (MP; nach Slijkhuis 1983a):

Tween 80 4,0 g/l;  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  0,12 g/l;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,8 g/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  8,2 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,35 g/l; Lösung I 10 ml/l; Lösung II 10 ml/l; Bacto Agar 12 g/l. Lösung I enthält  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  7,5 g/l;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  0,3 g/l;  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  0,01 g/l. Lösung II enthält  $\text{CaCl}_2$  5,0 g/l;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,5 g/l;  $\text{H}_3\text{BO}_3$  0,01 g/l;  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  0,005 g/l;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,005 g/l.  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  und  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  wurden getrennt von den übrigen Bestandteilen sterilisiert und erst nach dem Autoklavieren zusammen mit 10 ml/l einer sterilfiltrierten Vitaminlösung zugegeben (Zusammensetzung siehe oben). Anschließend erfolgte die Einstellung des pH-Wertes auf  $8,0 \pm 0,2$ .

MSV A-Medium (nach Williams und Unz 1985):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  0,5 g/l;  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,1 g/l;  $\text{CaCl}_2 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  0,05 g/l;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0,11 g/l;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,085 g/l;  $\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$  0,002 g/l; EDTA 0,003 g/l; pH  $7,2 \pm 0,2$

## 2.2 Vorbehandlung der Proben

Die Belebtschlämme wurden vorbehandelt, um die Zahl an fadenförmigen Bakterien im Inokulum zu erhöhen. Dies ist notwendig, da fadenförmige Bakterien eine relativ langsame Wachstumsgeschwindigkeit besitzen und während der Kultivierung von anderen, schneller wachsenden Belebtschlamm-Bakterien überwachsen werden.

Die Anreicherung der fadenförmigen Bakterien erfolgte in Anlehnung an die Methode von Williams und Unz (1985). Dazu wurden die Belebtschlamm-Proben 1:5 in MSV A-Medium verdünnt (5 ml Belebtschlamm + 20 ml MSV A) und zur Zerkleinerung der Flocken und Filamente mit Ultraschall behandelt (15 Sekunden; 35 W). Anschlie-

ßend wurden die Proben 3 mal bei 1900 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand jeweils abgossen und das Pellet in MSV A-Lösung rückgelöst. Auf diese Weise wurde ein Großteil der freischwimmenden Bakterien entfernt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 300 g für 5 min wurde der Überstand entnommen und mikroskopisch auf das Vorhandensein fadenförmiger Bakterien überprüft. Durch die niedrigere Zentrifugationsgeschwindigkeit sedimentieren zwar die Flocken, Filamente verbleiben jedoch im Überstand. Durch diese Behandlung konnte die Zahl fadenförmiger Bakterien deutlich angereichert werden.

### 2.3 Isolierungsmethoden

Der Überstand des letzten Zentrifugationsschritts wurde zur Beimpfung der Selektivmedien (HA-, JV-, R2A- und MP-Medium) verwendet. Dabei wurden verschiedene Methoden angewandt:

#### Plattierungsmethode:

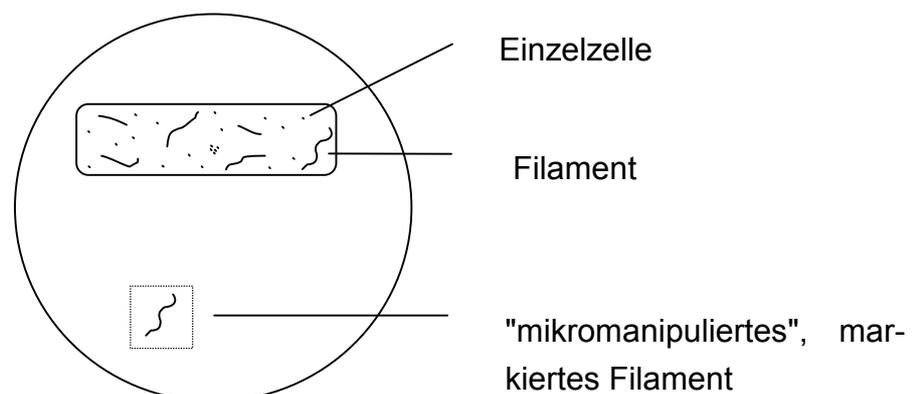
Aliquots aus dem Überstand (1, 2, 5, 10 bzw. 100 µl) wurden auf die Agaroberfläche pipettiert und mit einem Drigalsky-Spatel gleichmäßig verteilt.

#### Weichagarmethode:

Aliquots aus dem Überstand (1, 2, 5, 10 bzw. 100 µl) wurden in 2,5 ml 0,3% handwarmem Weichagar (NaCl 5 g/l; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,12 g/l; Phenolrot 0,02 g/l; Bacto Agar 3 g/l) suspendiert und auf den Nährmedien verteilt.

#### Mikromanipulation:

100 µl des Überstands wurden auf die Agaroberfläche pipettiert und durch Kippen der Petrischale zu einer längsförmigen Linie verteilt. Nachdem die Flüssigkeit in den Agar eingezogen war, wurden die Platten unter dem Umkehrmikroskop bei einer



100fachen Gesamtvergrößerung auf die Anwesenheit einzelner Filamente untersucht. Mit Hilfe von Mikronadeln, die in die Halterung eines Mikromanipulators eingespannt wurden, wurden einzelne filamentöse Bakterien aufgepickt und durch Ziehen über die Agaroberfläche von den übrigen Bakterien isoliert. Zur späteren Lokalisation dieser Filamente wurden deren Positionen auf der Agaroberfläche markiert. Die markierten Bereiche wurden anschließend mit Hilfe eines sterilen Skalpell aus geschnitten und auf frische Agarplatten übertragen.

Die beimpften Selektivmedien wurden dann bei 20-22°C für mehrere Wochen inkubiert und regelmäßig auf das Vorhandensein fadenförmiger Kolonien überprüft. Da die schwach kontrastierten Mikrokolonien auf der Agaroberfläche mit einem Stereomikroskop nur schwer zu erkennen sind, wurde ein inverses Phasenkontrastmikroskop zur Detektion der Kolonien verwendet (100fache Gesamtvergrößerung).

Mit Hilfe steriler Mikro-Glaskapillaren (fein ausgezogene Pasteurpipetten) wurden die Fäden wiederholt auf frische Agarplatten übertragen, bis Reinkulturen vorlagen.

### **3 Charakterisierung der Isolate**

#### **3.1 Identifizierung anhand klassischer Florenanalysen**

Als Differenzierungskriterien wurden bei der Florenanalyse morphologische Merkmale wie Kolonieform und -farbe sowie Bakterienform und Beweglichkeit mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops bestimmt. Daneben wurden die Gram- sowie die Neisserreaktion untersucht. Die physiologische Charakterisierung erfolgte über Tests auf das Vorhandensein von Katalase und Cytochromoxidase sowie über die Fähigkeit der Isolate, bestimmte C- und N-Quellen zu nutzen (siehe Kap. B.5).

#### **3.2 Phylogenetische Charakterisierung**

Zur phylogenetischen Analyse der isolierten Bakterienstämme wurden die Isolate zunächst in Flüssigmedien angezchtet, bis ein deutliches Zellwachstum erkennbar war. Anschließend wurde die Zellsuspension bei 5000 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet in 1 x PBS-Lösung ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  1,78 g/l;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,38 g/l; NaCl 7,6 g/l; pH 7,2) resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5000 g; 5 min) wurde der Überstand erneut abgegossen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

Die 16S rDNS der isolierten Stämme wurde mit Hilfe der PCR-Technik (polymerase chain reaction) amplifiziert und sequenziert (Snaidr et al. 1997). Die erhaltenen 16S

rDNS-Sequenzen wurden anschließend mit Hilfe des Programm-Paketes ARB der Technischen Universität München analysiert (Strunk und Ludwig 1997), um die phylogenetische Position der Isolate im Stammbaum zu ermitteln.

#### 4 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung (FISH)

Die Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung, kurz FISH genannt, ist eine Methode, bei der einzelne Bakterienzellen unter Einsatz von sogenannten Nukleinsäuresonden ohne Kultivierung direkt (z.B. in einer Wasser- oder Belebtschlammprobe) identifiziert werden können. Diese Nukleinsäuresonden sind einzelsträngige Nukleinsäuren, die spezifisch an definierte Zielnukleinsäuren, wie z.B. die rRNS der Bakterienzellen, binden (hybridisieren). Es handelt sich dabei um synthetisch hergestellte Oligonukleotidsonden. Oligonukleotide sind kurze Abschnitte von DNS mit einer Länge von etwa 15-25 Nukleotiden. Die Sonden sind weiterhin mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der die Detektion und Identifizierung der Bakterien ermöglicht. Als Farbstoffe werden z.B. Fluorescein oder der Carbocyaninfarbstoff Cy3 eingesetzt.

Die Nukleinsäuresonden müssen zunächst in die Bakterienzelle gelangen, um dort an das Zielmolekül binden zu können. Dabei stellen die Zellhüllen der Bakterien die erste Hürde dar. Deshalb werden die Bakterienzellwände durch Agentien wie Formaldehyd oder Ethanol für den Durchtritt durchlässig gemacht. Bei den Gram-positiven Bakterien, die eine sehr dicke Zellwand besitzen, ist eine zusätzliche Behandlung mit einem Enzym (Lysozym oder Mutanolysin) erforderlich. Sind die Nukleinsäuresonden in die Zellen eingedrungen, erfolgt die eigentliche Hybridisierung, bei der die Sonden an die rRNS-Zielmoleküle binden. Überschüssige und nicht gebundene Sonde wird in einem nachfolgenden Waschvorgang abgetrennt. Im Epifluoreszenzmikroskop lassen sich die markierten Bakterienzellen detektieren.

##### 4.1 Verwendete Lösungen

###### 1 x PBS:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  1,78 g/l;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  1,38 g/l; NaCl 7,6 g/l; pH 7,2

###### 3 x PBS:

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$  5,3 g/l;  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  4,1 g/l; NaCl 22,8 g/l; pH 7,2

###### 4%ige Paraformaldehyd-Lösung:

30 ml aqua dest wurden auf 60°C erwärmt und 2 g Paraformaldehyd (PFA) zugegeben. Anschließend wurde tropfenweise 1 N NaOH zugesetzt, bis das PFA gelöst war. Nach Zugabe von 16,6 ml 3 x PBS-Lösung wurde der pH mittels konzentrierter HCl auf 7,2 eingestellt.

Lysozym-Lösung (10 mg/ml):

Lysozym 5 mg; TE-Puffer 500 µl

Mutanolysin-Lösung (5000 U/ml):

Mutanolysin 1 mg; 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer 520 µl

0,1 M Kaliumphosphat-Puffer:

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 13,6 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 17,4 g; aqua dest 1000 ml; pH 6,8

DAPI-Stammlösung (100 µg/ml):

DAPI 1 mg; aqua dest 10 ml; in Eppendorfgefäße portionieren und bei –20°C einfrieren

DAPI-Arbeitslösung (1 µg/ml):

1:100-Verdünnung der DAPI-Stammlösung

5 M NaCl-Lösung:

NaCl 29,2 g; aqua dest 100 ml

1 M Tris/HCl-Lösung:

7,9 g Tris/HCl in ca. 30 ml aqua dest lösen, dann pH mit 5 N NaOH auf pH 8,0 einstellen und anschließend mit aqua dest auf 50 ml auffüllen

10%-SDS-Lösung:

SDS 5 g; aqua dest 50 ml; die Lösung wird sterilfiltriert

0,5 M EDTA-Lösung:

EDTA (Titriplex III) 9,3 g; aqua dest 50 ml; pH 8,0

TE-Puffer:

Tris/HCl 0,16 g; EDTA 0,037 g; aqua dest 100 ml; pH 8,0

## **4.2 Zellernte der Reinkulturen**

Aus Flüssigkulturen wurden 2 ml der Zellsuspension möglichst während der logarithmischen Wachstumsphase entnommen, um einen ausreichenden Ribosomengehalt pro Zelle zu gewährleisten. Wurden die Reinkulturen auf festen Medien angezchtet, wurde Zellmaterial mit einer sterilen Impföse entnommen und in 1 x PBS-Puffer suspendiert. Nach Zentrifugation (5000 g; 5 min) wurde der Überstand abgossen und das Zellpellet in 1 ml 1 x PBS-Puffer resuspendiert, erneut abzentrifugiert und das Pellet anschließend in 200 µl 1 x PBS-Puffer aufgenommen.

## 4.3 Fixierung der Proben

### 4.3.1 Paraformaldehydfixierung

Drei Teile frisch hergestellter, gekühlter Paraformaldehyd-Lösung (4%) wurden mit einem Teil der Reinkultursuspension bzw. der Belebtschlammprobe gemischt und für 3 h bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde bei 5000 g für 5 min zentrifugiert, das Pellet mit 1 ml 1 x PBS gewaschen, erneut zentrifugiert und nach einem weiteren Waschschrift in 1 x PBS aufgenommen und mit demselben Volumen eiskaltem, absolutem Ethanol versetzt. Die so fixierten Zellen wurden bei –20°C gelagert.

### 4.3.2 Ethanolfixierung

Ein Teil der Reinkultursuspension bzw. der Belebtschlammprobe wurde mit einem Teil eiskaltem, absolutem Ethanol versetzt, gut durchmischt und bei –20°C gelagert.

## 4.4 *In situ* Einzelzellhybridisierung

### 4.4.1 Hybridisierungsprozedur

2-10 µl der fixierten Proben (Reinkultur/Belebtschlamm/Schaum) wurden in die Aussparungen der unbehandelten, teflonbeschichteten Objektträger (Paul Marienfeld, Bad Mergentheim) pipettiert und an der Luft getrocknet. Danach wurden die Objektträger zur Dehydratisierung und Nachfixierung der Zellen für jeweils 3 min in 50%, 80% und 100% Ethanol getaucht (Ethanolreihe). Nach dem Trocknen der Objektträger wurden zur Hybridisierung auf jedes Feld 8 µl des auf 46°C vorgewärmten Hybridisierungspuffers und jeweils 1 µl der fluoreszenzmarkierten Oligonukleotidsonde (50 ng/µl) pipettiert und gründlich vermischt. Bei einer gleichzeitigen Hybridisierung mit zwei verschiedenen Sonden wurden mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen (Cy3 bzw. FLUOS) markierte Sonden eingesetzt. Anschließend wurden die Objektträger horizontal in eine vortemperierte Plastikbox, welche mit befeuchtetem Zellstoff ausgelegt wurde, gegeben und 1,5 h bei 46°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Danach wurden die Objektträger ohne Abwaschen des Hybridisierungspuffers in ein Probengefäß überführt, das mit 50 ml vorgewärmtem Waschpuffer gefüllt war und für 20 Minuten waagrecht liegend bei 48°C inkubiert. Die Objektträger wurden dann aus dem Waschpuffer entnommen, zur Spülung für 3 min in ein mit aqua dest gefülltes Probengefäß gegeben und anschließend an der Luft getrocknet.

Zur Visualisierung der Gesamtzellzahl wurde nach der Hybridisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI (4'6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid) nachgefärbt. Dazu wurden in jede Aussparung 40 µl der DAPI-Arbeitslösung pipettiert und 15 min bei 0°C inkubiert.

#### 4.4.2 Enzym-Vorbehandlung

Um ein ungehindertes Eindringen der Oligonukleotidsonde in die Zelle zu gewährleisten, ist bei verschiedenen Bakterien (insbesondere Gram-positiven Zellen) eine Vorbehandlung der Zellwand mit einem Enzym erforderlich. Bei Verwendung des Enzyms Lysozym wurden im Anschluss an die Ethanolreihe in jede Aussparung 30 µl der LysozymbLösung (10 mg/ml) getropft und 10-30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Alternativ ist auch eine Behandlung mit Mutanolysin möglich. Hier wurden die Aussparungen der Objektträger mit Mutanolysin-Lösung (5000 U/ml) überschichtet und 10-40 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit aqua dest ab gespült, getrocknet und einer weiteren Ethanolreihe unterzogen. Die weitere Hybridisierungsprozedur erfolgte wie oben beschrieben.

#### 4.4.3 Hybridisierungs- und Waschpuffer

<u>Hybridisierungspuffer:</u>	Formamid	x *	µl
	5 M NaCl	180	µl
	1 M Tris/HCl	20	µl
	<u>10% SDS</u>	<u>1</u>	<u>µl</u>
	aqua dest	ad 1000	µl

\* Der Hybridisierungspuffer wurde je nach benötigter Stringenz durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Formamid modifiziert. Unter B.4.4.4 sind die Formamidkonzentrationen für die verwendeten Oligonukleotidsonden aufgelistet.

<u>Waschpuffer:</u>	1 M Tris/HCl	1000	µl
	5 M NaCl	x **	µl
	10 % SDS	50	µl
	<u>0,5 M EDTA</u>	<u>500 ***</u>	<u>µl</u>
	aqua dest	ad 50 ml	

\*\* Die benötigte Stringenz wurde im Waschpuffer durch Variation der NaCl-Konzentration eingestellt (siehe auch B.4.4.4).

\*\*\* Bei geringen NaCl-Konzentrationen im Waschpuffer (ab 0,225 M NaCl) ist die Zugabe von EDTA im Waschpuffer nötig, da ansonsten bereits Spuren zweiwertiger Kationen die Stringenz durch ihre starke Hybridstabilisierung beeinflussen können.

#### 4.4.4 Verwendete Oligonukleotidsonden

Tabelle B.1: Verwendete Oligonukleotidsonden mit zugehörigen Formamidkonzentrationen im Hybridisierungspuffer sowie NaCl-Konzentrationen im Waschpuffer

Oligonukleotid-sonde	Formamid-Konz. [%] (Hybridisierungspuffer)	NaCl-Konz. in mol (Waschpuffer)	5 M NaCl auf 50 ml [µl] (Waschpuffer)	Referenz
EUB338	0*	0,900	9000	Amann et al. 1990
EUB338-II	0	0,900	9000	Daims et al. 1999
EUB338-III	0	0,900	9000	Daims et al. 1999
GNS1404	5	0,636	6300	Juretschko 2000
ALF1b	20* (bis 35)	0,225	2150	Manz et al. 1992
MPA60	20	0,225	2150	Erhart et al. 1997
MPA223	20	0,225	2150	Erhart et al. 1997
MPA645	20	0,225	2150	Erhart et al. 1997
MPA650	20	0,225	2150	Erhart et al. 1997
TM7905	20	0,225	2150	Hugenholtz et al. 2001
HGC1156	20	0,225	2150	Erhart et al. 1997
HGC69a	25	0,159	1490	Wagner et al. 1994a
TM7305	30	0,112	1020	Hugenholtz et al. 2001
BET42a	35	0,080	700	Manz et al. 1992
GAM42a	35	0,080	700	Manz et al. 1992
CF319a	35	0,080	700	Wagner et al. 1994b
AHW183	35	0,080	700	Schade et al. 2001
NLI256	35	0,080	700	Blackall, unveröffentlicht
PPx3	35	0,080	700	Snaidr 1997

\* Formamidkonzentration variabel

#### 4.5 Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen durch Epifluoreszenzmikroskopie

Die Objektträger wurden zur Verlangsamung von Ausbleicheffekten der Fluoreszenzfarbstoffe in Citifluor AF1 eingebettet und nach 10 min Inkubationszeit im Dunkeln unter dem Mikroskop (Axioplan, Zeiss) betrachtet. Es wurden Plan-Neofluar

Objektive mit 10-, 40- und 100facher Vergrößerung eingesetzt. Folgende Filterkombinationen (AHF Analysentechnik) wurden benutzt:

Tabelle B.2: Kenndaten der zur Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filtersysteme

<b>AHF-Nr.</b>	<b>Anregungsfilter</b>	<b>Farbteiler</b>	<b>Emissionsfilter</b>	<b>verwendbar für</b>
F11-000	D 360/40	400 DCLP	GG 420	DAPI
F41-007	HQ 545/30	Q 570 LP	HQ 610/75	CY3
F41-001	HQ 480/40	Q 505 LP	HQ 535/50	FLUOS

Die Ergebnisse der Fluoreszenzmikroskopie wurden fotografisch mit Hilfe einer digitalen Kamera (AxioCam Color, Zeiss) und der Bilderfassungssoftware AxioVision dokumentiert.

## 5 Physiologische Untersuchungen an fadenförmigen Bakterien

Um die Nährstoffansprüche der isolierten Reinkulturen zu ermitteln, wurde das Wachstum der Bakterienstämme in verschiedenen Nährmedien untersucht. Dabei wurden sowohl komplexe Nährmedien als auch Minimalmedien verwendet, denen verschiedene C- und N-Quellen zugesetzt wurden.

### 5.1 Verwendete Medien

Belebtschlammhydrolysat (HA; nach Eikelboom 1975):

siehe 2.1 (ohne Zugabe von Bacto Agar)

R2A-Medium (nach Reasoner und Geldreich 1985):

siehe 2.1 (ohne Zugabe von Bacto Agar)

MSV A-Medium (nach Williams und Unz 1985):

Zusammensetzung siehe 2.1

MSV N-Medium (modifiziert nach Williams und Unz 1985):

NaNO<sub>3</sub> 0,6 g/l; MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,1 g/l; CaCl<sub>2</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,05 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,11 g/l; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,085 g/l; FeCl<sub>3</sub> · 6 H<sub>2</sub>O 0,002 g/l; EDTA 0,003 g/l; pH 7.2 ± 0,2

NL-Medium (nach Nowak und Brown 1990):

Pepton 3 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,5 g/l; KNO<sub>3</sub> 0,07 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,05 g/l; CaCO<sub>3</sub> 0,05 g/l; pH 7.2 ± 0,2

NL A-Medium: NL-Medium ohne KNO<sub>3</sub>

NL N-Medium: NL-Medium ohne (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

## 5.2 Abbau von C-Quellen in Erlenmeyerkolben

Für die Wachstumsversuche wurden 25 ml des Flüssignährmediums mit 100 µl der Bakteriensuspension angeimpft und 4 Wochen bei  $22\pm 1^\circ\text{C}$  auf dem Rotationschüttler (110 UpM) inkubiert. Die Zellsuspension wurde durch Resuspendierung von zellulärem Material in 0,14 M NaCl hergestellt.

Komplexe Nährmedien:

Untersucht wurden das Belebtschlammhydrolysat-Medium (HA), welches auf unterschiedliche CSB-Konzentrationen eingestellt wurde, sowie R2A-Medium und verschiedene Verdünnungen des R2A-Mediums.

Minimale Nährmedien:

Minimalmedien wurden verwendet, um die Fähigkeit der Reinkulturen, verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoffquellen zu nutzen, zu untersuchen. Dem Minimalmedium, das verschiedene Salze sowie Vitamine enthält, wurden Glucose, Acetat, Citrat, Tween 80 bzw. Stärke zu einer Endkonzentration von 0,5 g/l sowie  $\text{NH}_4^+$  bzw.  $\text{NO}_3^-$  zugegeben. Folgende Minimalmedien wurden eingesetzt: MSV A, MSV N, NL, NL A, NL N.

## 5.3 Abbau von C-Quellen in Mikrotiterplatten

Der Abbau verschiedener Kohlenstoffquellen wurde auch in BIOLOG-Mikrotiterplatten (GN Microplates; ECO Microplates) untersucht. Diese Mikrotiterplatten enthalten in ihren Vertiefungen 95 (GN) bzw. 31 (ECO) verschiedene C-Quellen sowie jeweils eine Vertiefung ohne Kohlenstoffquelle als Negativkontrolle. Außerdem enthalten alle Vertiefungen zum Nachweis des Kohlenstoffabbaus den Redoxfarbstoff Tetrazoliumviolett.

### 5.3.1 Testdurchführung

Die Reinkulturen wurden auf festen Nährmedien angezchtet, bis genügend Zellmaterial vorhanden war. Anschließend wurden die Zellen mit sterilen Wattestäbchen oder Impfösen von den Platten abgeimpft und in steriler 0,85%iger NaCl-Lösung homogen suspendiert. Dabei muss darauf geachtet werden, dass keine Nährstoffe des Agarmediums in die Suspension überführt werden. Je zwei Trübungsstandards geben an, in welchem Bereich die Trübung der Suspension liegen soll. Mit Hilfe eines Turbidometers wurde die Trübung bei 590 nm gemessen und entsprechend des Standardbereichs eingestellt. Danach wurde die Suspension mit einer sterilen Pi-

pette in ein Reservoir überführt und mit einer 8-Kanal-Pipette in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert (150 µl pro Vertiefung). Die Platten wurden bei 22±1°C inkubiert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Isolate nach unterschiedlichen Zeiträumen (1 Tag – 2 Wochen) abgelesen.

Die Auswertung der Farbreaktionen erfolgte photometrisch bei 595 nm mit Hilfe eines Mikrotiterplatten-Lesegerätes (DigiScan Reader; Asys Hitech GmbH) sowie der Software DigiWin (Asys Hitech GmbH). Die gemessenen Extinktionswerte wurden mit dem Wert der Negativkontrolle korrigiert. Eine Einteilung in 4 Kategorien an Wachstumsintensität erfolgte anhand selbst festgelegter Schwellenwerte: < 0,060 (kein Wachstum); 0,060 – 0,149 (mäßiges Wachstum), 0,150 – 0,499 (Wachstum); > 0,500 (gutes Wachstum).

### 5.3.2 Untersuchte C-Quellen in den Mikrotiterplatten

In Tabelle B.3 sind die 31 Kohlenstoffquellen der ECO-Mikrotiterplatte aufgeführt, die nach ihrer Zugehörigkeit zu den Kohlenhydraten, polymeren Verbindungen, Carboxyl- und Aminosäuren, Aminen sowie phosphorylierten Chemikalien aufgelistet sind. Tabelle B.4 zeigt die 95 Kohlenstoffquellen der GN-Mikrotiterplatte. Diese enthalten neben einem größeren Spektrum an Substanzen aus den oben genannten Gruppen Substrate, die zu den Estern, Alkoholen, Amiden sowie aromatischen und bromierten Chemikalien gehören.

Tabelle B.3: Kohlenstoffquellen in ECO-Mikrotiterplatten

<u>Kohlenhydrate</u>	<u>Carboxylsäuren</u>	<u>Aminosäuren</u>
D-Cellulose	Brenztraubensäuremethylester	L-Arginin
α-D-Lactose	D-Glucosaminsäure	L-Asparagin
β-Methyl-D-glucosid	D-Galactonsäurelacton	L-Phenylalanin
D-Xylose	D-Galacturonsäure	L-Serin
i-Erythritol	2-Hydroxybenzoesäure	L-Threonin
D-Mannitol	4-Hydroxybenzoesäure	Glycyl-L-glutaminsäure
N-Acetyl-D-Glucosamin	γ-Hydroxybuttersäure	
	Itaconsäure	<u>Amine</u>
<u>Polymere</u>	α-Ketobuttersäure	Phenylethylamin
Tween 40	D-Äpfelsäure	Putrescin
Tween 80		
α-Cyclodextrin	<u>Phosphorylierte Chemikalien</u>	
Glycogen	Glucose-1-phosphat	
	D,L-α-Glycerolphosphat	

Tabelle B.4: Kohlenstoffquellen in GN-Mikrotiterplatten

<u>Kohlenhydrate</u>	<u>Carboxylsäuren</u>	<u>Aminosäuren</u>
N-Acetyl-D-galactosamin	Essigsäure	D-Alanin
N-Acetyl-D-glucosamin	cis-Aconitsäure	L-Alanin
Adonitol	Citronensäure	L-Alanyl-glycin
L-Arabinose	Ameisensäure	L-Asparagin
D-Arabitol	D-Galactonsäurelacton	L-Asparaginsäure
Cellobiose	D-Galacturonsäure	L-Glutaminsäure
i-Erythritol	D-Gluconsäure	Glycyl-L-asparaginsäure
D-Fructose	D-Glucosaminsäure	Glycyl-L-glutaminsäure
L-Fucose	D-Glucuronsäure	L-Histidin
D-Galactose	$\alpha$ -Hydroxybuttersäure	Hydroxy-L-prolin
Gentiobiose	$\beta$ -Hydroxybuttersäure	L-Leucin
$\alpha$ -D-Glucose	$\gamma$ -Hydroxybuttersäure	L-Ornithin
m-Inositol	p-Hydroxyphenylelessigsäure	L-Phenylalanin
$\alpha$ -Lactose	Itaconsäure	L-Prolin
Lactulose	$\alpha$ -Ketobuttersäure	L-Pyroglutaminsäure
Maltose	$\alpha$ -Ketoglutarsäure	D-Serin
D-Mannitol	$\alpha$ -Ketovaleriansäure	L-Serin
D-Mannose	D,L-Milchsäure	L-Threonin
D-Melibiose	Malonsäure	D,L-Carnithin
$\beta$ -Methylglucosid	Propionsäure	$\gamma$ -Aminobuttersäure
Psicose	Chinasäure	
D-Raffinose	D-Glucarsäure	<u>Aromatische Chemikalien</u>
L-Rhamnose	Sebacinsäure	Inosin
D-Sorbitol	Bernsteinsäure	Urocansäure
Saccharose		Thymidin
D-Trehalose	<u>Alkohole</u>	Uridin
Turanose	2,3- Butandiol	
Xylitol	Glycerol	<u>Bromierte Chemikalien</u>
		Brombernsteinsäure
<u>Ester</u>	<u>Amide</u>	
Mono-methylsuccinat	Bernsteinsäuremonoamid	<u>Amine</u>
Methylpyruvat	Glucuronamid	Phenylethylamin
	Alaninamid	2-Aminoethanol
<u>Polymere</u>		Putrescin
Glycogen	<u>Phosphorylierte Chemikalien</u>	
$\alpha$ -Cyclodextrin	D,L-Glycerolphosphate	
Dextrin	Glucose-1-phosphat	
Tween 80	Glucose-6-phosphat	
Tween 40		

## 5.4 Abbau von C-Quellen durch "*Microthrix parvicella*" nach Rhamnolipid-Zugabe

Es ist bekannt, dass mikrobiell produzierte Tenside (Biotenside) die Verfügbarkeit bestimmter Kohlenstoffquellen für Bakterien sowie den Abbau dieser Verbindungen verbessern können. Daher wurden Versuche durchgeführt, in denen den Nährmedien ein von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 produziertes Rhamnolipid zugegeben wurde, um zu untersuchen, ob dies das Wachstum von "*Microthrix parvicella*" verbessern kann. Die Rhamnolipid-Produktion sowie -Extraktion erfolgten in Anlehnung an Zhang und Miller (1992).

### 5.4.1 Verwendete Medien

#### P-Medium:

Bacto Pepton 5,0 g/l; Fleischextrakt 3,0 g/l; pH 7,2 ± 0,2

#### Kay's Minimal Medium (nach Zhang und Miller 1992):

NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 3,0 g/l; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2,0 g/l; Glucose 2,0 g/l; FeSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 2,5 mg/l; MgSO<sub>4</sub> 1,0 g/l; pH 7,2 ± 0,2

#### PPGAS-Medium (nach Zhang und Miller 1992):

NH<sub>4</sub>Cl 1,1 g/l; KCl 1,5 g/l; Tris/HCl 18,9 g/l; Glucose 5,0 g/l; Proteose Pepton 10,0 g/l; MgSO<sub>4</sub> 0,2 g/l; pH 7,2 ± 0,2

### 5.4.2 Rhamnolipid-Produktion durch *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

Der *Pseudomonas aeruginosa* Stamm ATCC 9027 wurde in 25 ml P-Medium angeimpft und für 24 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Induktion der Biotensid-Produktion wurde dann zunächst 1 ml des bewachsenen P-Mediums in 25 ml Kay's Minimal Medium angeimpft und ebenfalls 24 h bei 37°C im Wasserbad geschüttelt. Anschließend wurden 2 ml dieser Suspension zur Animpfung von 200 ml PPGAS-Medium verwendet und 60 h bei 37°C inkubiert.

### 5.4.3 Rhamnolipid-Extraktion

Das bewachsene PPGAS-Medium wurde zur Abtrennung der Zellen für 20 min bei 6800 g zentrifugiert, der Überstand abgegossen und das Pellet verworfen. Anschließend wurde der Überstand zur Präzipitation des Rhamnolipids mit konzentrierter HCl auf pH 2,0 angesäuert, 20 min bei 12100 g zentrifugiert und das Pellet in 0,05 M KHCO<sub>3</sub> (pH 8,6) rückgelöst. Nach einer erneuten Ansäuerung auf pH 2,0 wurde

nochmals zentrifugiert (12100 g; 20 min) und das Pellet in 10 ml 0,05 M KHCO<sub>3</sub> (pH 8,6) gelöst.

#### **5.4.4 Bestimmung der Rhamnolipid-Konzentration über L-Rhamnose-Messung**

Eine Abschätzung der Rhamnolipid-Konzentration erfolgte über eine Messung der L-Rhamnose nach der 6-Deoxyhexose-Methode (Chandrasekaran und BeMiller 1980). 1 ml des Rhamnolipid-Extrakts bzw. einer entsprechenden Verdünnung wurden mit 4,5 ml Schwefelsäure-Lösung (90 ml 97% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 15 ml aqua dest) gemischt und 10 min in kochendem Wasser erhitzt. Anschließend wurden die Proben in kaltem Wasser abgekühlt, jeweils 0,1 ml Thioglycolsäure-Lösung zugegeben (0,1 ml Thioglycolsäure + 2,9 ml aqua dest; frisch herstellen), gut durchmischt und 3 h im Dunkeln inkubiert. Die Messung der optischen Dichte erfolgte photometrisch bei 420 nm.

Eine Eichkurve wurde mit Hilfe einer Rhamnose-Standard-Lösung (40 µg/ml) erstellt. Dazu wurden Aliquots der Standard-Lösung (0 bis 1,0 ml in 0,1 ml Schritten) in Röhrchen pipettiert, jeweils auf 1,0 ml mit aqua dest aufgefüllt und gemäß obiger Anleitung behandelt.

#### **5.4.5 Wachstumstests mit Rhamnolipid-Zugabe**

Zu 25 ml des komplexen bzw. mit einer C-Quelle versetzten flüssigen Minimalnährmediums wurden Rhamnolipid zu einer Endkonzentration von 12 mg/l sowie 100 µl der "*Microthrix parvicella*"-Suspension zugegeben und für 4-6 Wochen bei 22 ± 1°C auf dem Rotationsschüttler (110 UpM) inkubiert.

## C Ergebnisse und Diskussion

Im Rahmen der Untersuchungen wurden insgesamt 68 Reinkulturen unterschiedlicher fadenförmiger Organismen aus 4 Kläranlagen isoliert (siehe Tab. C.1).

Tabelle C.1: Isolierte Reinkulturen aus Kläranlagen

Kläranlage	Isolat	Zahl der Isolate
Ansbach	" <i>Nostocoida limicola</i> "-ähnliche aus der Gruppe der grünen Nichtschwefelbakterien	10
	" <i>Nostocoida limicola</i> "-ähnliche aus dem Subphylum der Actinomyceten	3
	" <i>Microthrix parvicella</i> "	12
Berlin	" <i>Microthrix parvicella</i> "	9
	Typ 0092	24
Starnberg	" <i>Microthrix parvicella</i> "	9
Wolfratshausen	" <i>Microthrix parvicella</i> "	1

### 1 "*Nostocoida limicola*"

#### 1.1 "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen aus der Gruppe der grünen Nichtschwefelbakterien

10 Stämme "*Nostocoida limicola*"-ähnlicher Filamente wurden aus einer kommunalen Kläranlage mit geringem industriellen Anteil isoliert und auf Belebtschlammhydrolysat-Medium (HA) kultiviert.

##### 1.1.1 Morphologische Charakterisierung

Die Reinkulturen wuchsen auf HA-Medium als runde Kolonien mit einem leicht gekräuselten Rand (siehe Foto C.1; alle Fotografien sind im Anhang zu finden). Sie bildeten gewundene, unverzweigte Filamente ohne Scheide mit einem Durchmesser von 1,0 – 1,2 µm und konnten mehrere hundert µm lang werden (Foto C.2). Die Zellen waren oval bis scheibenförmig und färbten sich bei der Gramfärbung meistens positiv an. Gelegentlich zeigten einzelne Filamente eine negative Gramreaktion, in anderen Filamenten waren nur die Zellgrenzen Gram-positiv angefärbt (Foto

C.3/C.4). Die Neisserfärbung war meist negativ, gelegentlich enthielten einige Filamente Neisser-positive Granula (Foto C.5/C.6). Alle Stämme waren schwach Katalase-positiv und zeigten eine positive Cytochromoxidase-Reaktion.

Variable Gram- und Neisserreaktionen konnten auch bei anderen "*Nostocoida limicola*"-Isolaten beobachtet werden (Blackall et al. 2000). Die Filamente enthielten sowohl Gram-positive als auch Gram-negative Zellen, die Neisser-gefärbten Filamente waren entweder gleichmäßig positiv angefärbt oder enthielten positive Granula. Eine variable Gram- und Neisserreaktion von fadenförmigen "*Nostocoida limicola*"-ähnlichen Organismen in Belebtschlämmen wurde auch von Lemmer und Lind (2000) beschrieben, insbesondere in Schlämmen aus industriellen Kläranlagen.

## 1.1.2 Phylogenetische Charakterisierung

### 1.1.2.1 Taxonomische Einordnung aufgrund der Analyse der 16S rRNS

Die 16S rDNS von vier Isolaten wurde mittels PCR (polymerase chain reaction) amplifiziert, sequenziert und anschließend mit Hilfe des Programm-Paketes ARB analysiert, um die phylogenetische Position der Isolate im Stammbaum zu ermitteln. Alle vier Isolate wiesen die gleiche 16S rRNS Sequenz auf. Die phylogenetische Analyse ergab, dass die isolierten Stämme zur Gruppe der grünen Nichtschwefelbakterien gehören. In Abbildung C.1 ist die Position der "*Nostocoida limicola*"-ähnlichen Organismen innerhalb des phylogenetischen Stammbaums dargestellt.

Ein Ähnlichkeitsvergleich der 16S rRNS-Sequenzen zeigte, dass die Isolate mit keinem anderen bekannten Bakterienstamm nah verwandt sind. Mit 87% weist *Sphaerobacter thermophilus* die größte Sequenzähnlichkeit auf. Im Gegensatz dazu gehören die von Blackall und Mitarbeitern (2000) isolierten "*Nostocoida limicola*"-Stämme zum Subphylum der Actinomyceten und weisen viele Gemeinsamkeiten mit dem nichtfädigen, kokkoiden Bakterium *Tetrasphaera* spp. auf, das ebenfalls aus Belebtschlamm isoliert wurde (Maszenan et al. 2000). Seviour und Mitarbeiter (2001) identifizierten "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen, die zu den sogenannten "Niedrig-GC"-Bakterien (Bakterien mit einem niedrigen Gehalt an Guanin und Cytosin in ihrem genetischen Material) sowie solche, die zur Gruppe der *Planctomycetales* gehören. Des weiteren beschreiben Snaidr und Mitarbeiter (2001) "*Nostocoida*"-Filamente, die der Gruppe der alpha-Proteobakterien angehören. Diese Ergebnisse zeigen, dass "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen, die aus verschiedenen Belebtschlämmen isoliert wurden, Mitglieder vieler unterschiedlicher phylogenetischer Gruppen sind.

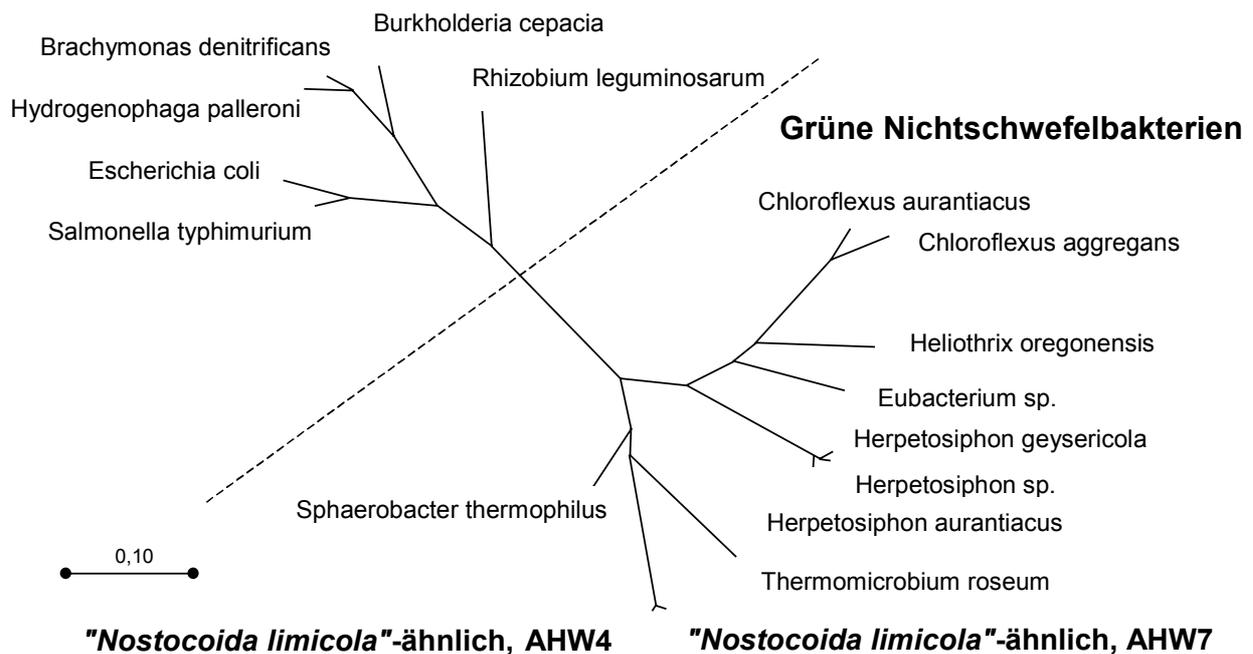


Abb. C.1: Auf vergleichender 16S rRNS-Sequenzanalyse basierender phylogenetischer Stammbaum (Parsimony-Verfahren) der grünen Nichtschwefelbakterien. Der Balken gibt 10% Sequenzdivergenz an

### 1.1.2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Mit Hilfe des Programm-Paketes ARB wurde eine spezifische Oligonukleotidsonde (AHW183) zur Detektion der Isolate entwickelt. Die Sondenspezifität sowie die optimalen Hybridisierungsbedingungen wurden anhand der vorhandenen Reinkulturen evaluiert. Unter stringenten Bedingungen (35% Formamid, 46°C) zeigten alle isolierten Stämme helle und starke Hybridisierungssignale. In Tabelle C.2 ist die Sequenz der Oligonukleotidsonde AHW183 aufgeführt.

Tabelle C.2: Sequenz und Position der Oligonukleotidsonde AHW183

Sonde	Sequenz (5' – 3')	Position <sup>1</sup> (16S rRNS)
AHW183	CCGACACTACCCACTCGT	183-200

<sup>1</sup> Position in der 16S rRNS von E.coli (Brosius et al. 1981)

Die *in situ* Hybridisierung mit der Oligonukleotidsonde PPx3, die "*Nostocoida limicola*"-Filamente detektiert, die zur alpha-Untergruppe der Proteobakterien gehören (Snaidr 1997), gab keine positiven Signale mit den isolierten Reinkulturen. Dies bestätigt, dass "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen mehreren verschiedenen phylogenetischen Gruppen angehören.

Anschließend wurde der Belebtschlamm, der zur Isolation der Reinkulturen verwendet wurde, mit der Oligonukleotidsonde AHW183 hybridisiert, um festzustellen, ob die isolierten Organismen auch im nativen Belebtschlamm vorhanden sind bzw. fadenförmiges Wachstum aufweisen. Es konnten filamentöse Bakterien nachgewiesen werden, die mit der Sonde AHW183 ein positives Hybridisierungssignal lieferten. Sie lagen meist im Inneren der Belebtschlammflocken. Die starke Fluoreszenz deutet darauf hin, dass diese Bakterien genügend Ribosomen enthalten, um durch *in situ* Hybridisierung detektiert zu werden und daher wahrscheinlich eine hohe Stoffwechselaktivität besitzen. Betrachtet man in Fotografie C.7 das Ergebnis der *in situ* Hybridisierung mit dem Phasenkontrastbild, so sieht man, dass die Filamente im Inneren der dicken Belebtschlammflocke ohne die spezifische Sondenfärbung nur schwer erkannt werden können.

AHW183 positive Filamente wurden auch in verschiedenen anderen kommunalen Belebtschlämmen entdeckt (siehe Tabelle C.3). So wurden u.a. auch zwei zweistufige kommunale Kläranlagen untersucht. Hier wurden zahlreiche "*Nostocoida limicola*"-Filamente in den Belebtschlämmen der hoch belasteten ersten Stufe gefunden, während diese Fäden in der niedrig belasteten zweiten Stufe kaum vorkamen. Dies ist in Übereinstimmung mit der Beobachtung, dass die Reinkulturen während der *in vitro* Wachstumsexperimente hohe Substratkonzentrationen bevorzugten (siehe C.1.1.3.1).

Im Gegensatz zum kommunalen Bereich wurden jedoch keine positiven Signale nach der Hybridisierung von Belebtschlämmen einer petrochemischen sowie einer Papierindustrie gefunden. Dies liegt möglicherweise an der Spezifität der Biozönose in Industrie-Belebtschlämmen. Diese Schlämme enthalten "*Nostocoida limicola*"-Organismen, die gut an die dort herrschenden Bedingungen sowie die Inhaltsstoffe des speziellen Abwassers angepasst sind und sich daher sehr wahrscheinlich taxonomisch von solchen aus kommunalen Anlagen unterscheiden.

Tabelle C.3: Einsatz von Oligonukleotidsonden zur Detektion "*Nostocoida limicola*"-ähnlicher Organismen aus der Gruppe der grünen Nichtschwefelbakterien (AHW183) und der Actinobakterien (NLI256) sowie Typ 0041-ähnlicher Filamente (TM7305/TM7905) in kommunalen und industriellen Belebtschlämmen

Kläranlage	Oligonukleotidsonde			
	AHW183	NLI256	TM7305	TM7905
<u>Kommunale Anlagen:</u>				
Aibling	-	±	+	+
Aldersbach	++	-	±	++
Ansbach	+	++	+	+
Berlin	-	-	-	-
Dachau	-	-	+	±
Fürstenfeldbruck	-	+++	++	±
Geiselbullach	-	-	+	±
Hirblingen	-	-	++	-
München I (Stufe 1)	++	-	-	±
München I (Stufe 2)	±	-	±	±
München II (Stufe 1)	+	-		
München II (Stufe 2)	±	-		
NN	±	+++		
Starnberg (BeIS)	++	-	±	±
Tegernsee (BeIS)	±	-		
Wolfratshausen (BeIS)	±	-	±	+
<u>Industrie-Anlagen:</u>				
Papierindustrie	-	-	-	-
Petrochemie	-	-	-	-
Süßwarenindustrie	-	+++		

### 1.1.3 Physiologische Charakterisierung

#### 1.1.3.1 Wachstum in komplexen Nährmedien

In Tabelle C.4 sind die Ergebnisse der Wachstumsversuche der Reinkulturen in den komplexen Nährmedien HA (Belebtschlammhydrolysat) sowie R2A aufgeführt. Das Wachstum wurde bei verschiedenen CSB-Konzentrationen und für HA auch bei unterschiedlichen pH-Werten gemessen.

Tabelle C.4: Wachstum der "*Nostocoida limicola*" Isolate in komplexen Nährmedien (+ Wachstum; ± mäßiges Wachstum; - kein Wachstum)

Medium	CSB [g O <sub>2</sub> /l]	pH	Wachstum
HA	4,0	7,2	+
HA	3,0	7,2	+
HA	2,0	7,2	+
HA	1,0	7,2	+
HA	0,4	7,2	±
HA	0,2	7,2	±
HA	2,0	6,0	+
HA	2,0	6,6	+
HA	2,0	7,2	+
HA	2,0	7,8	+
R2A	4,0	7,2	-
R2A	0,8	7,2	-

Die Wachstumsintensität wurde über eine Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 405 nm ermittelt und quantifiziert. In HA-Medium mit CSB-Konzentrationen zwischen 1 bis 4 g O<sub>2</sub>/l zeigten die Isolate gutes Wachstum, wobei dieses bei einer Konzentration von 1 g O<sub>2</sub>/l bereits signifikant reduziert war (siehe Abb. C.2). Bei noch niedrigeren CSB-Konzentrationen (0,2 bzw. 0,4 g O<sub>2</sub>/l) wurde nur sehr schwaches Wachstum beobachtet. Bei einer CSB-Konzentration von 2 g O<sub>2</sub>/l erfolgte ein gutes Wachstum in einem pH-Bereich von 6,0 – 7,8 (siehe Abb. C.3), das bei einem pH-Wert von 6,0 jedoch signifikant niedriger lag. Offensichtlich bevorzugen diese "*Nostocoida limicola*"-Isolate hohe Substratkonzentrationen. Das Wachstum dieser Organismen wird nicht unterstützt, wenn die Konzentration an Kohlenstoffquellen bzw. der pH-Wert niedrig sind. Damit sind sie in niedrig belasteten N/DN-Anlagen mit ausgeprägter Nitrifikationsleistung nicht konkurrenzfähig.

In R2A-Medium wurde das Wachstum weder bei einer CSB-Konzentration von 0,8 noch bei 4,0 g O<sub>2</sub>/l unterstützt.

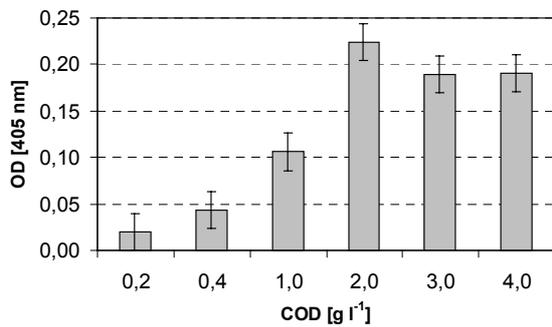


Abb. C.2: Wachstum der "*N. limicola*"-Isolate in HA-Medium bei verschiedenen CSB-Konzentrationen

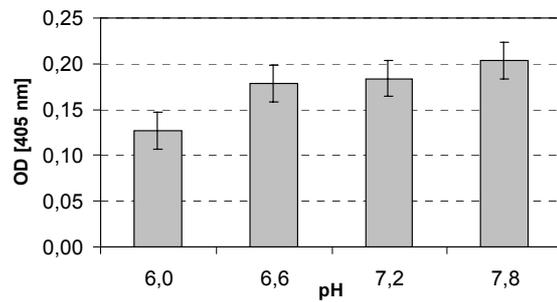


Abb. C.3: Wachstum der "*N. limicola*"-Isolate in HA-Medium bei verschiedenen pH-Werten

### 1.1.3.2 Wachstum in Minimalmedien mit verschiedenen C- und N-Quellen

In Tabelle C.5 sind eine Reihe von verschiedenen Kohlenstoff- und Stickstoffquellen aufgeführt, die in den Untersuchungen getestet wurden. Allerdings konnte in keinem Fall ein Wachstum der Reinkulturen beobachtet werden.

Tabelle C.5: Wachstum der "*Nostocoida limicola*"-Isolate in Minimalmedien, die verschiedene C- und N-Quellen enthalten

Medium	C-Quelle	N-Quelle	Wachstumsfaktoren	Wachstum
NL	Glucose	NH <sub>4</sub> / NO <sub>3</sub> / Pepton	Vitaminlösung	-
NL A	Glucose	NH <sub>4</sub> / Pepton	Vitaminlösung	-
NL N	Glucose	NO <sub>3</sub> / Pepton	Vitaminlösung	-
NL	Acetat	NH <sub>4</sub> / NO <sub>3</sub> / Pepton	Vitaminlösung	-
NL A	Acetat	NH <sub>4</sub> / Pepton	Vitaminlösung	-
NL N	Acetat	NO <sub>3</sub> / Pepton	Vitaminlösung	-
NL	Tween 80	NH <sub>4</sub> / NO <sub>3</sub> / Pepton	Vitaminlösung	-
NL A	Tween 80	NH <sub>4</sub> / Pepton	Vitaminlösung	-
NL N	Tween 80	NO <sub>3</sub> / Pepton	Vitaminlösung	-
MSV A	Acetat	NH <sub>4</sub>	Vitaminlösung	-
MSV N	Acetat	NO <sub>3</sub>	Vitaminlösung	-
MSV A	Citrat	NH <sub>4</sub>	Vitaminlösung	-
MSV N	Citrat	NO <sub>3</sub>	Vitaminlösung	-

Die Ergebnisse zeigen, dass die Isolate weder in dem synthetischen Komplexmedium R2A, noch in Minimalmedien, die verschiedene C- und N-Quellen enthielten, wachsen konnten. Das Wachstum wurde nur in dem aus Belebtschlamm hergestellten Medium HA unterstützt, was darauf hinweist, dass diese Organismen auf eine komplexe Nährstoffversorgung angewiesen sind. Vermutlich enthält dieses Medium spezielle Substrate oder Wachstumsfaktoren, die das Wachstum dieser Bakterien ermöglichen.

Vergleicht man diese Ergebnisse mit Wachstumstests, die von anderen Autoren mit "*Nostocoida limicola*"-Reinkulturen durchgeführt wurden, so können auch auf physiologischer Ebene große Unterschiede zwischen verschiedenen "*Nostocoida*"-Isolaten festgestellt werden.

So fanden Nowak und Brown (1990), dass Reinkulturen von "*Nostocoida limicola*" nur geringfügiges Wachstum in synthetischen Medien zeigten, die lediglich eine einzige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielten. Jedoch waren die Reinkulturen nach Zugabe von Pepton zu den Mineralmedien in der Lage, auf verschiedenen Kohlenhydraten zu wachsen (z.B. Glucose, Saccharose, Glycerol, Tween 80). Dagegen war das Wachstum auf Acetat und Citrat auch in Gegenwart von Pepton schwach. "*Nostocoida limicola*"-Stämme, die von Blackall und Mitarbeitern (2000) isoliert wurden, waren in der Lage, sowohl auf R2A als auch in synthetischen Medien, die verschiedene C-Quellen wie Glucose, Acetat, Glycerol und Tween 80 enthielten, zu wachsen. Keines dieser Isolate konnte mit Citrat oder Ölsäure als einziger C-Quelle wachsen.

Dies bestätigt ein weiteres Mal, dass die Gruppe "*Nostocoida limicola*" aus einer ganzen Reihe von Organismen besteht, die verschiedenen phylogenetischen Gruppen angehören und daher auch unterschiedliche physiologische Eigenschaften aufweisen.

## **1.2 "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen aus dem Subphylum der Actinomyceten**

3 Stämme einer weiteren Gruppe "*Nostocoida limicola*"-ähnlicher Filamente wurde aus derselben kommunalen Kläranlage mit geringem industriellen Anteil isoliert, aus der auch die zuvor beschriebenen Filamente stammten, und auf Belebtschlammhydrolysat-Medium (HA) kultiviert.

## 1.2.1 Morphologische Charakterisierung

Die Reinkulturen wuchsen auf HA-Medium als runde Kolonien mit einem leicht gekräuselten Rand (siehe Foto C.8). Sie bildeten gewundene, unverzweigte Filamente ohne Scheide mit einem Durchmesser von 1,0 – 1,2 µm und konnten mehrere hundert µm lang werden. (Foto C.9/C.10). Die Zellen waren oval bis scheibenförmig und zeigten meist eine positive Gramreaktion. Gelegentlich färbten sich einzelne Filamente bei der Gramfärbung rot an und enthielten blaue kreisförmige Einschlüsse oder blaue Zellränder. Bei der Neisserfärbung waren die Filamente meist gleichmäßig blaugrau – braunblau gefärbt, oft mit dunkelblauen Zellrändern. In einigen Fällen enthielten die Filamente auch blaue Granula. Alle Stämme waren Katalase-positiv und zeigten eine negative Cytochromoxidase-Reaktion.

## 1.2.2 Phylogenetische Charakterisierung

### 1.2.2.1 Taxonomische Einordnung aufgrund der Analyse der 16S rRNS

Die phylogenetische Analyse der 16S rRNS Sequenz des Isolats AN31 ergab, dass der isolierte Stamm zum Subphylum der Actinomyceten gehört. Ein Ähnlichkeitsvergleich der 16S rRNS-Sequenzen zeigte, dass der Faden sehr nah mit einem von Blackall und Mitarbeitern (2000) isolierten "*Nostocoida limicola*"-Stamm verwandt ist (98,5% Ähnlichkeit). Das bedeutet, dass diese Isolate nicht nur in Belebtschlamm in Australien zu finden sind, sondern auch in deutschen Kläranlagen vorkommen.

### 1.2.2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Mit Hilfe der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung konnten die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchung bestätigt werden.

Für die von Blackall und Mitarbeitern (2000) isolierten "*Nostocoida*"-Stämme wurde bereits eine spezifische Oligonukleotidsonde entwickelt (NLI256), die nach Hybridisierung mit den isolierten Reinkulturen AN26, AN29 und AN31 deutlich positive Signale lieferte (Foto C.11). Auch die Oligonukleotidsonde HGC1156, eine allgemeinere Sonde, die Bakterien mit einem hohen Gehalt an Guanin und Cytosin in ihrem genetischen Material ("Hoch-GC"-Bakterien) und somit auch Actinomyceten detektiert, zeigte eine positive Reaktion mit den isolierten Stämmen. *In situ* Hybridisierungen mit den Oligonukleotidsonden AHW183 und PPx3, die ebenfalls "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen detektieren, ergaben wie zu erwarten keine Signale,

da diese Sonden "*Nostocoida*"-ähnliche Fäden aus anderen taxonomischen Gruppen erfassen.

Die anschließende *in situ* Hybridisierung des Belebtschlammes, der zur Isolation der Reinkulturen verwendet wurde, mit der Sonde NLI256 ergab eine sehr große Anzahl positiver Filamente, die sowohl innerhalb als auch außerhalb der Belebtschlammflocken zu finden waren (siehe Foto C.12). Diese Filamente entsprachen morphologisch "*Nostocoida limicola*".

Im Folgenden wurden weitere Belebtschlämme kommunaler sowie industrieller Kläranlagen mit der Sonde NLI256 hybridisiert (siehe Tabelle C.3 in Kapitel C.1.1.2.2). Dabei zeigte sich, dass NLI256-positive "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen weder im Belebtschlamm der petrochemischen und der Papierindustrie noch in den meisten der untersuchten kommunalen Belebtschlämme zu finden waren. Interessanterweise wurden jedoch in zwei der kommunalen Anlagen riesige Mengen NLI256-positiver Filamente nachgewiesen. Neben kommunalem Abwasser erhält eine dieser Anlagen das Abwasser einer Colafabrik, die andere Anlage das eines Speiseeisherstellers. Auch im Belebtschlamm der Kläranlage einer Süßwarenindustrie dominierte der NLI256-positive Stamm "*Nostocoida limicola*". Der Kläranlagenzulauf enthielt in diesen Anlagen vermutlich hohe Mengen zuckerhaltiger Substrate, die das Wachstum dieser Organismen anscheinend stark begünstigten und so zu einem massenhaften Auftreten dieser Fäden führten.

### 1.2.3 Physiologische Charakterisierung

#### 1.2.3.1 Wachstum in komplexen Nährmedien

Das Wachstum der Reinkulturen AN26 und AN31 wurde sowohl in flüssigem R2A- als auch in Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium untersucht. Beide Stämme zeigten dabei gutes Wachstum, wobei dieses in R2A signifikant höher lag (siehe Abb. C.4).

Die Morphologie der Reinkulturen wurde durch die verschiedenen Medien deutlich beeinflusst. Auf HA-Medium wuchsen die Stämme als lange, verschlungene Filamente mit scheibenförmigen Zellen ( $\varnothing$  ca. 1,2  $\mu\text{m}$ ) und glichen in ihrer Morphologie den "*Nostocoida limicola*"-Organismen, die im Belebtschlamm gefunden werden. Auf R2A-Medium dagegen war die Morphologie der Stämme vollkommen anders. Sie wuchsen in Form von Zellknäueln, die aus kokkoiden Zellen bestanden, sowie sehr kurzen Filamenten. Die Zellen wiesen hier einen größeren Durchmesser auf

(1,5 – 1,8 µm). Dieses Phänomen wurde auch von Blackall und Mitarbeitern (2000) beobachtet, die ebenfalls eine unterschiedliche Morphologie ihrer Reinkulturen in verschiedenen Flüssigmedien feststellten. So wurden in R2A-Medium auch dort Zellklumpen, kurze Filamente sowie Cluster kokkoider Zellen gefunden.

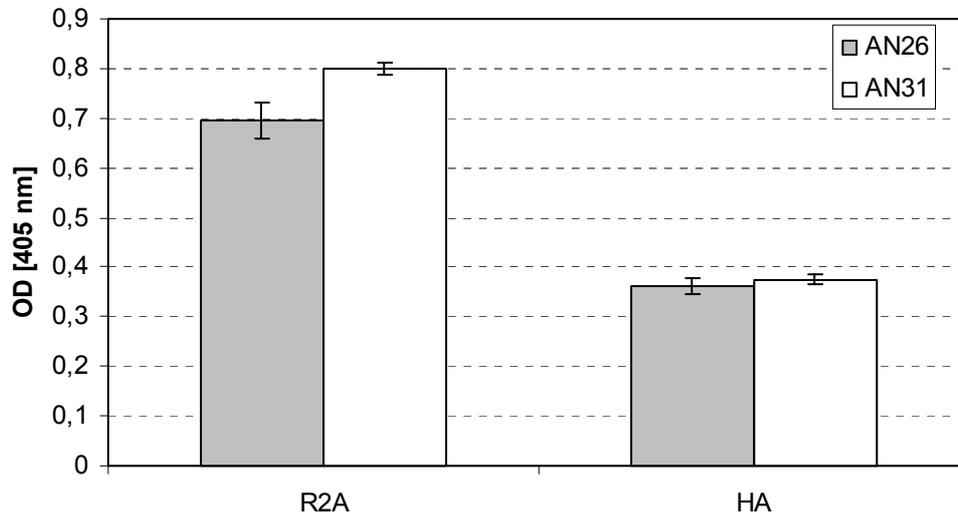


Abb. C.4: Wachstum der Isolate AN26 und AN31 in R2A- und HA-Medium

### 1.2.3.2 Wachstum in Minimalmedien mit verschiedenen C- und N-Quellen

Das Wachstum der Reinkulturen AN26 und AN31 wurde auch in Mineralsalzmedien untersucht, denen sowohl unterschiedliche Kohlenstoffquellen (Acetat, Citrat, Tween 80 bzw. Stärke) als auch Stickstoffquellen ( $\text{NH}_4^+$  bzw.  $\text{NO}_3^-$ ) zugegeben wurden. Dabei zeigte sich, dass Citrat von den Reinkulturen weder in Gegenwart von  $\text{NH}_4^+$  noch von  $\text{NO}_3^-$  abgebaut werden konnte. Acetat und Tween 80 konnten dagegen als C-Quelle genutzt werden, wobei der Abbau in  $\text{NH}_4^+$ -haltigem Medium signifikant höher lag. Das eindeutig beste Wachstum erfolgte jedoch mit Stärke als Kohlenstoff- und  $\text{NH}_4^+$  als Stickstoffquelle. In Gegenwart von  $\text{NO}_3^-$  war der Abbau der Stärke deutlich reduziert. In Abbildung C.5 sind diese Ergebnisse dargestellt.

Interessant war auch hier die unterschiedliche Morphologie der Reinkulturen beim Wachstum auf den einzelnen C-Quellen. Auf Acetat wuchsen die Isolate als stark verknäuelte Fäden mit scheibenförmigen Zellen und einem Durchmesser von ca. 1,5 µm. Auf Tween 80 dagegen waren die Fäden weniger stark verknäuelte. Eine vollkommen andere Morphologie zeigten die Reinkulturen beim Wachstum auf Stärke. Hier waren die Zellen kugelförmig mit einem Durchmesser von 1,5 – 2 µm und hingen meist in Klumpen zusammen, so dass die Fadenstruktur nicht eindeutig zu erkennen war. Aufgrund dieser Beobachtung, dass die Morphologie der Filamente je nach Substratangebot variieren kann, lassen sich die Fäden bei der herkömmlichen

mikroskopischen Schlammanalyse oft nicht eindeutig identifizieren. Der Einsatz von Oligonukleotidsonden ist hier hilfreich, da die Organismen unabhängig von ihrer morphologischen Struktur detektiert werden.

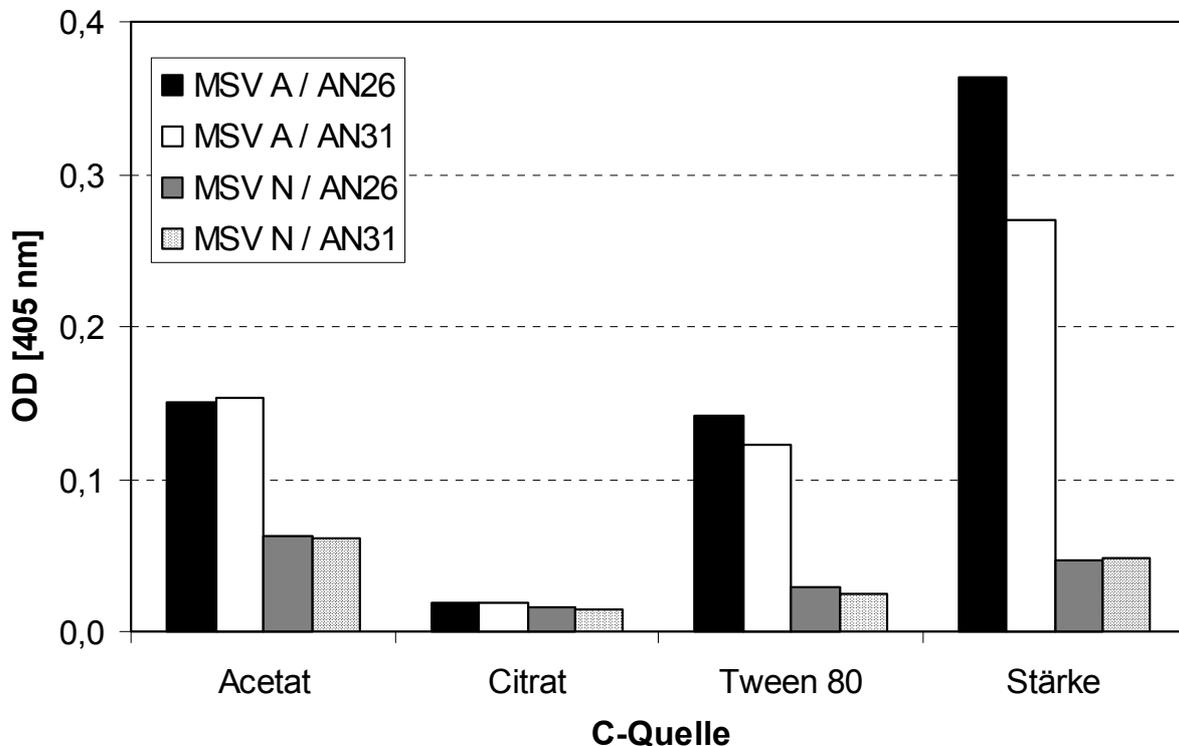


Abb. C.5: Wachstum der Isolate AN26 und AN31 in Mineralsalzmedien mit unterschiedlichen C- und N-Quellen (MSV A: Mineralsalzmedium mit  $\text{NH}_4^+$ ; MSV N: Mineralsalzmedium mit  $\text{NO}_3^-$ )

Ein Vergleich mit den Wachstumsuntersuchungen, die von Blackall und Mitarbeitern (2000) durchgeführt wurden, zeigt, dass die Reinkulturen nicht nur phylogenetisch nahe verwandt zueinander sind, sondern auch sehr ähnliche physiologische Eigenschaften aufweisen. So konnten deren Isolate ebenfalls in dem komplexen Nährmedium R2A sowie mit Acetat und Tween 80 als einziger C-Quelle wachsen, während Citrat nicht als Kohlenstoffquelle genutzt werden konnte.

### 1.2.3.3 Wachstum auf Biolog-Mikrotiterplatten

In Biolog-GN-Mikrotiterplatten wurde der Abbau von 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen durch die Stämme AN26, 29 und 31 untersucht. Die Ergebnisse dieser Abbauversuche sind in Tabelle C.6 dargestellt.

Tabelle C.6: Prozentualer Anteil der Stämme, die die jeweilige C-Quelle zum Wachstum nutzen können (in Klammern ist der Anteil aufgeführt, der nur mäßiges Wachstum zeigt)

C-Quelle		C-Quelle	
$\alpha$ -Cyclodextrin	100 (33)	p-Hydroxyphenylelessigsäure	0
Dextrin	100	Itaconsäure	33 (33)
Glycogen	100	$\alpha$ -Ketobuttersäure	67 (67)
Tween 40	100 (100)	$\alpha$ -Ketoglutarsäure	33 (33)
Tween 80	33 (33)	$\alpha$ -Ketovaleriansäure	100 (67)
N-Acetyl-D-galactosamin	0	D,L-Milchsäure	33 (33)
N-Acetyl-D-glucosamin	33 (33)	Malonsäure	33 (33)
Adonitol	0	Propionsäure	100 (33)
L-Arabinose	0	Chinasäure	0
D-Arabitol	0	D-Glucarsäure	0
Cellobiose	0	Sebacinsäure	33 (33)
i-Erythritol	0	Bernsteinsäure	0
D-Fructose	100	Brombernsteinsäure	100 (67)
L-Fucose	0	Bernsteinsäuremonoamid	33 (33)
D-Galactose	0	Glucuronamid	0
Gentiobiose	0	Alaninamid	0
$\alpha$ -D-Glucose	100	D-Alanin	33 (33)
m-Inositol	0	L-Alanin	33 (33)
$\alpha$ -D-Lactose	0	L-Alanyl-glycin	33 (33)
Lactulose	0	L-Asparagin	33 (33)
Maltose	100 (33)	L-Asparaginsäure	33 (33)
D-Mannitol	0	L-Glutaminsäure	0
D-Mannose	33 (33)	Glycyl-L-Asparaginsäure	33 (33)
D-Melibiose	0	Glycyl-L-Glutaminsäure	33 (33)
$\beta$ -Methyl-D-Glucosid	0	L-Histidin	67 (33)
D-Psicose	33 (33)	Hydroxy-L-Prolin	33 (33)
D-Raffinose	67	L-Leucin	0
L-Rhamnose	33	L-Ornithin	0
D-Sorbitol	33 (33)	L-Phenylalanin	67 (67)
Saccharose	67	L-Prolin	67 (67)
D-Trehalose	33 (33)	L-Pyroglutaminsäure	0
Turanose	33 (33)	D-Serin	0
Xylitol	0	L-Serin	33 (33)
Methyl-pyruvat	67 (67)	L-Threonin	0
Mono-methyl-succinat	100 (67)	D,L-Carnithin	0
Essigsäure	33 (33)	$\gamma$ -Aminobuttersäure	0
cis-Aconitsäure	33 (33)	Urocansäure	0
Citronensäure	33 (33)	Inosin	33 (33)
Ameisensäure	67 (67)	Uridin	33 (33)
D-Galactonsäurelacton	0	Thymidin	33 (33)
D-Galacturonsäure	33 (33)	Phenylethylamin	33 (33)
D-Gluconsäure	67	Putrescin	0
D-Glucosaminsäure	33 (33)	2-Aminoethanol	0
D-Glucuronsäure	33 (33)	2,3-Butandiol	33 (33)
$\alpha$ -Hydroxybuttersäure	0	Glycerol	33 (33)
$\beta$ -Hydroxybuttersäure	0	D,L- $\alpha$ -Glycerolphosphat	0
$\gamma$ -Hydroxybuttersäure	100 (67)	Glucose-1-phosphat	0
		Glucose-6-phosphat	33 (33)

Es zeigte sich, dass die Reinkulturen vor allem Polysaccharide ( $\alpha$ -Cyclodextrin, Dextrin, Glycogen) hervorragend als Kohlenstoffquelle verwenden können. So wurde bereits in den unter C.1.2.3.2 beschriebenen Versuchen beobachtet, dass die Isolate das Polysaccharid Stärke ausgezeichnet zum Wachstum nutzen konnten. Ebenfalls sehr gut abgebaut wurden die Kohlenhydrate Glucose, Fructose, Maltose, Raffinose und Saccharose sowie die Carboxylsäuren Gluconsäure und Propionsäure.

Ein, wenn auch schwächeres, Wachstum war mit den Carboxylsäuren Ameisensäure,  $\gamma$ -Hydroxybuttersäure,  $\alpha$ -Ketobuttersäure und  $\alpha$ -Ketovaleriansäure sowie den Esterverbindungen Mono-methylsuccinat und Methylpyruvat zu beobachten. Eine Reihe weiterer Carboxylsäuren (u.a. Essigsäure, Citronensäure, Galacturonsäure, Glucuronsäure, Milchsäure) konnte dagegen nur von jeweils einem Isolat als Kohlenstoffquelle zu einem mäßigen Wachstum genutzt werden. Das gleiche gilt für die meisten der getesteten Aminosäuren mit Ausnahme von Histidin, Prolin und Phenylalanin, die immerhin von je 2 Isolaten mäßig abgebaut wurden.

Vergleicht man die Ergebnisse der physiologischen Untersuchungen mit dem Vorkommen dieser Organismen im Belebtschlamm (siehe C.1.2.2.2), so fällt auf, dass diese in Anlagen dominierten, in denen der Zulauf vermutlich hohe Mengen zuckerhaltiger Substrate enthielt. Das ist im Einklang mit der Beobachtung, dass die Bakterien *in vitro* ihr stärkstes Wachstum auf verschiedenen Mono-, Di- und Polysacchariden zeigten. In den genannten Anlagen haben diese "*Nostocoida limicola*"-Filamente also optimale Substratbedingungen und vermutlich einen Wachstumsvorteil gegenüber anderen Belebtschlamm Bakterien.

Untersuchungen von Andreasen und Nielsen (1997) bestätigen, dass unter *in situ* Bedingungen tatsächlich eine Aufnahme von Glucose durch "*Nostocoida limicola*"-Organismen erfolgt. Mit Hilfe der sogenannten Mikroautoradiographie-Technik, bei der radioaktiv markierte Substrate eingesetzt werden, kann die Aufnahme dieser Substanzen in die Bakterienzelle direkt im Belebtschlamm beobachtet werden. Dabei zeigte sich, dass in einem der untersuchten Belebtschlämme die "*Nostocoida limicola*"-Filamente besonders stark mit Glucose und Ölsäure markiert waren, während die Markierung mit Acetat, Glycin und Leucin nur schwach war. Im Belebtschlamm einer anderen Anlage war zwar ebenfalls eine starke Substrataufnahme von Glucose und Ölsäure zu beobachten, Acetat, Glycin und Leucin wurden hingegen gar nicht aufgenommen. Auch hier zeigt sich wieder die Variabilität von "*Nostocoida limicola*"-Organismen, die in verschiedenen Kläranlagen unterschiedliche Substrataufnahmemuster aufweisen.

### 1.3 "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen - Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Untersuchungen wurden mehrere "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen isoliert. Dabei zeigte sich, dass diese sich sowohl phylogenetisch als auch physiologisch stark voneinander unterscheiden. Ein Vergleich mit Isolaten anderer Arbeitsgruppen bestätigt die große phylogenetische Diversität "*Nostocoida limicola*"-ähnlicher Organismen.

- Eine Gruppe unserer Isolate aus einer kommunalen Anlage gehört zu den **grünen Nichtschwefelbakterien**. Sie benötigen ein sehr komplexes Substrat in relativ hoher Konzentration und wachsen daher gerne innerhalb von Belebtschlammflocken. Sie wurden in mehreren kommunalen, nicht jedoch in industriellen Anlagen gefunden.
- Die anderen Isolate sind dem Subphylum der **Actinomyceten** zuzuordnen und weisen eine hohe phylogenetische Ähnlichkeit zu Isolaten von Blackall und Mitarbeitern (2000) auf. Sie unterscheiden sich auch physiologisch von den oben beschriebenen "*Nostocoida limicola*"-Stämmen aus der Gruppe der grünen Nichtschwefelbakterien. So bevorzugten sie Kohlenhydrate als Kohlenstoffquelle, wobei vor allem Polysaccharide hervorragend abgebaut wurden. Diese Stämme dominierten in Anlagen, deren Zulauf hohe Mengen zuckerhaltiger Substanzen enthielt. In industriellen Anlagen der Petrochemie und Papierverarbeitung konnten sie nicht nachgewiesen werden.
- Weiterhin sind "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen bekannt, die den sogenannten **"Niedrig-GC"-Bakterien** (Bakterien mit einem niedrigen Gehalt an Guanin und Cytosin in ihrem genetischen Material) zugehörig sind. Einige dieser Organismen sind Mitglieder der Gattung *Streptococcus*, die anderen sind nahe verwandt zu *Trichococcus flocculiformis* sowie *Lactosphaera pasteurii* (Liu et al. 2000).
- Liu und Mitarbeiter (2001) isolierten außerdem eine weitere Gruppe "*Nostocoida limicola*"-ähnlicher Bakterien aus der Gruppe der **Planctomycetales**.
- In Belebtschlämmen industrieller Anlagen wurden "*Nostocoida limicola*"-ähnliche Organismen gefunden, die der **alpha-Unterklasse** der Proteobakterien angehören und innerhalb dieser Gruppe eine neue Gattung (***Alisphaera***) bilden (Snaidr et al. 2001).

Zusammenfassend kann somit festgestellt werden, dass fadenförmige Bakterien, die in der klassischen Mikroskopie morphologisch als "*Nostocoida limicola*" identifiziert

werden, unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen angehören können. So dominieren v.a. in industriellen Anlagen mit Schaumproblemen andere "*Nostocoida*"-Stämme als in kommunalen Belebtschlamm. Aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu verschiedenen phylogenetischen Gruppen weisen die Stämme auch völlig unterschiedliche physiologische Eigenschaften und Wachstumsansprüche auf. Daher sind auch andere Bekämpfungsstrategien erforderlich, je nachdem, um welche "*Nostocoida*"-Art es sich handelt. Da eine korrekte Zuordnung dieser Bakterien mit konventionellen Methoden schwierig ist, erweist sich hier die Anwendung der Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung als hilfreich, bei der spezielle Sonden zur Identifizierung der "*Nostocoida limicola*"-Filamente eingesetzt werden. Sie ermöglichen darüberhinaus eine Identifikation verschiedener Morphotypen desselben Organismus, die z.B. bei unterschiedlichem Substratangebot vorliegen können.

## **2 "*Microthrix parvicella*"**

"*Microthrix parvicella*"-Reinkulturen wurden aus 4 verschiedenen kommunalen Anlagen isoliert und auf R2A-Medium kultiviert.

### **2.1 Morphologische Charakterisierung**

Die Reinkulturen wuchsen auf R2A-Medium als kleine, unregelmäßig geformte Kolonien, an deren Rand deutlich Filamente erkennbar waren (siehe Foto C.13). Die Bakterien bildeten dünne unverzweigte, stark gebogene bzw. geknäuelte Filamente ohne Scheide mit einem Durchmesser von 0,5-0,7 µm und konnten viele hundert µm lang werden (Foto C.14). Innerhalb der Filamente waren keine Zellsepten zu erkennen. Sie zeigten eine positive Gram- und Neisserreaktion (Polyphosphatgranula; siehe Foto C.15/C.16). Morphologie und Färbeverhalten dieser Isolate entsprechen dem Erscheinungsbild von "*Microthrix parvicella*" im Belebtschlamm.

### **2.2 Phylogenetische Charakterisierung**

#### **2.2.1 Taxonomische Einordnung**

"*Microthrix parvicella*"-Stämme wurden bereits von mehreren Autoren isoliert und charakterisiert (van Veen 1973; Eikelboom 1975; Slijkhuis 1983b; Blackall et al. 1994; Rossetti et al. 1997). Blackall und Mitarbeitern gelang es 1994, "*Microthrix parvicella*" aufgrund der Analyse der 16S rRNS taxonomisch einzuordnen. Das Bakterium wurde anhand der Ergebnisse in die Gruppe der Actinomyceten eingereiht. Da die Verzweigung im Stammbaum jedoch tief liegt, ist der Organismus nur

weitläufig mit den nocardioformen Actinomyceten verwandt. Die phylogenetische Position von "*Microthrix parvicella*" wurde von Rossetti und Mitarbeitern 1997 bestätigt, deren Isolate eine identische 16S rRNS Sequenz im Vergleich zu den australischen Stämmen aufwiesen.

## 2.2.2 Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung

Erhart und Mitarbeiter entwickelten 1997 vier Oligonukleotidsonden (MPA60, MPA223, MPA645 und MPA650) zur *in situ* Detektion und Identifikation von "*Microthrix parvicella*". Belebtschlämme aus verschiedenen Kläranlagen und Ländern zeigten nach der Hybridisierung mit diesen Sonden positive Reaktionen. Im Gegensatz zu den "*Nostocoida limicola*"-ähnlichen Bakterien, die Organismen unterschiedlichster phylogenetischer Gruppen enthalten, handelt es sich bei "*Microthrix parvicella*" immer um denselben Organismus. Hybridisierungen mit den Sonden HGC1156 und HGC69a, die Organismen aus der Gruppe der "Hoch-GC"-Bakterien detektieren (zu der auch die Actinomyceten gehören), lieferten nur für die Sonde HGC1156 positive Signale, nicht jedoch für die Sonde HGC96a (Erhart 1997).

Fluoreszenz *in situ* Hybridisierungen unserer isolierten Reinkulturen mit den "*Microthrix parvicella*"-Sonden sowie HGC1156 und HGC96a ergaben ebenfalls positive Reaktionen für alle getesteten Sonden mit Ausnahme von HGC96a. Dies bestätigt, dass es sich bei diesen Isolaten tatsächlich um "*Microthrix parvicella*" handelt (Foto C.17 und C.18).

Eine gleichzeitige Anfärbung der "*Microthrix parvicella*"-Filamente mit Gensonden und dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI ermöglicht zum einen die *in situ* Identifikation von "*Microthrix parvicella*" und zeigt auch, dass die Filamente oft Polyphosphat-Einschlüsse enthalten, die bei der DAPI-Färbung gelb angefärbt werden (Erhart et al. 1997). Häufig besitzen Filamente, die eine große Zahl dieser Einschlüsse enthalten, nur wenig Ribosomen und sind vermutlich wenig stoffwechselaktiv. Möglicherweise stellt diese Polyphosphat-Einlagerung eine Überlebensstrategie von "*Microthrix parvicella*" unter Stresssituationen dar.

## 2.3 Physiologische Charakterisierung

### 2.3.1 Wachstum mit verschiedenen C- und N-Quellen

Aufgrund des relativ schwachen und langsamen Wachstums der Reinkulturen stand nur sehr wenig Zellmaterial für Wachstumsversuche zur Verfügung. Insgesamt wur-

den 11 Isolate untersucht, von denen alle Wachstum in flüssigem R2A-Medium aufwiesen, das allerdings relativ schwach war. In den Mineralsalzmedien MSV A ( $\text{NH}_4^+$  als N-Quelle) und MSV N ( $\text{NO}_3^-$  als N-Quelle), die jeweils eine der Kohlenstoffquellen Acetat, Citrat bzw. Tween 80 enthielten, war in keinem Fall ein Wachstum zu beobachten. Vergleicht man diese Ergebnisse mit den Daten anderer Autoren, so stellt man fest, dass bezüglich des Wachstumsverhaltens von "*Microthrix parvicella*"-Reinkulturen unterschiedliche Beobachtungen gemacht wurden.

Slijkhuis (1983b) isolierte "*Microthrix parvicella*"-Stämme, die langkettige Fettsäuren (z. B. Ölsäure) sowie die Polyoxyethylensorbitan-Derivate dieser Fettsäuren (z. B. Tween 80) als Kohlenstoff- und Energiequelle bevorzugten. Im Gegensatz dazu wurden Kohlenhydrate und einfache organische Säuren wie Glucose, Fructose, Essigsäure, Citronensäure oder Milchsäure überhaupt nicht als Substrate genutzt. In Kombination mit Tween 80 verbesserten flüchtige Fettsäuren (z. B. Acetat, Butyrat) allerdings das Zellwachstum. Anscheinend besitzt "*Microthrix parvicella*" keine Enzyme zur Synthese langkettiger Fettsäuren. Aufgrund seiner Untersuchungsergebnisse entwickelte Slijkhuis (1983a) ein optimales Kultivierungsmedium für "*Microthrix parvicella*". Dieses Medium enthält neben verschiedenen Spurenelementen und Vitaminen Tween 80 als Kohlenstoffquelle, reduzierte N- und S-Verbindungen ( $\text{NH}_4^+$  bzw.  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) sowie Pepton. Das Pepton dient dabei nicht als C- oder N-Quelle, sondern schützt vermutlich die Zellen gegen die bakterizide Wirkung von Tween 80.

Ein Wachstum der Reinkulturen auf diesem speziellen Kultivierungsmedium wurde jedoch in der vorliegenden Untersuchung nicht beobachtet. Auch die Isolate von Seviour und Mitarbeitern (1994) sowie Tandoi und Mitarbeitern (1998) waren nicht in Lage, auf dem von Slijkhuis entwickelten Medium zu wachsen. Allerdings waren die Stämme dieser beiden Untersuchungen in R2A-Medium kultivierbar. Tandoi und Mitarbeiter (1998) stellten weiterhin ein Wachstum ihrer Reinkulturen auf verschiedenen einfachen und komplexen Kohlenstoffquellen wie Acetat, Pyruvat, Casaminoacids und Hefeextrakt fest. Hingegen erfolgte mit Glucose, Proteose Pepton, Ölsäure und Tween 80 kein Wachstum.

Eine Bestätigung der Ergebnisse von Slijkhuis (1983b) lieferten die Untersuchungen von Andreasen und Nielsen (1998). Mit Hilfe der Mikroautoradiographie-Technik wurde die Aufnahme verschiedener radioaktiv markierter Substrate *in situ* im Belebtschlamm verfolgt. Dabei zeigte sich, dass nur die langkettigen Fettsäuren Ölsäure und Palmitinsäure sowie zu einem gewissen Grad auch das Triglycerid Triölsäure von "*Microthrix parvicella*" aufgenommen wurden. Die flüchtigen Fettsäuren Acetat, Propionat und Butyrat, die normalerweise zu den leicht abbaubaren Kompo-

nenen im Abwasser gehören, wurden dagegen nicht aufgenommen. Das gleiche gilt für Glucose, Ethanol sowie die Aminosäuren Glycin und Leucin. Neben den oben genannten langkettigen Fettsäuren wurden noch zwei weitere komplexe organische Substrate getestet, das anionische Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) sowie der langkettige Fettalkohol Octadecanol. Auch für diese beiden Substrate konnte keine Aufnahme beobachtet werden. Das Aufnahme-System von "*Microthrix parvicella*" scheint also sehr spezifisch zu sein und sich auf ganz bestimmte langkettige Fettsäuren zu beschränken. Des Weiteren wurde festgestellt, dass Ölsäure nicht nur unter aeroben, sondern auch unter anoxischen und anaeroben Bedingungen aufgenommen wurde. Darüberhinaus zeigte sich, dass "*Microthrix parvicella*" in allen untersuchten Kläranlagen das gleiche Substrat-Aufnahme-Muster aufwies. Dies ist ein weiteres Indiz dafür, dass es sich bei diesem Faden immer um denselben Organismus handelt.

### 2.3.2 Abbau von C-Quellen durch "*Microthrix parvicella*" nach Rhamnolipid-Zugabe

Mikrobiell produzierte Tenside, sog. Biotenside, können die Verfügbarkeit bestimmter Kohlenstoffquellen für Bakterien sowie den Abbau dieser Verbindungen verbessern (Zhang und Miller 1992; Zhang und Miller 1994; Shreve et al. 1995). Untersuchungen von Al-Tahhan und Mitarbeitern (2000) zeigten, dass zwei Mechanismen wirksam sind, die den Abbau schlecht löslicher organischer Substanzen erhöhen. Zum einen können Biotenside hydrophobe Substanzen in Micellen-Strukturen lösen, was die Löslichkeit dieser Verbindungen im wässrigen Milieu und damit deren Verfügbarkeit für die Zelle erhöht. Zum anderen bewirken Biotenside, dass die Oberfläche der Bakterienzellen hydrophober wird, wodurch der Kontakt zwischen der Zelle und dem Substrat verbessert wird. Ein von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 produziertes Rhamnolipid wurde als Biotensid eingesetzt um zu untersuchen, ob damit das Wachstum von "*Microthrix parvicella*" gesteigert werden kann. Dieses Rhamnolipid, ein Glykolipid, gehört zu den am häufigsten isolierten Biotensiden (Cooper und Zajic 1980, zitiert nach Zhang und Miller 1992) und besteht aus einer Mischung von Rhamnolipiden, die einen oder zwei Rhamnosreste sowie zwei Lipidketten enthalten (Rendell et al. 1990, zitiert nach Zhang und Miller 1992).

Die Zugabe des Rhamnolipids zu verschiedenen Flüssigmedien bewirkte eine auffallende Steigerung der Biomasseproduktion von "*Microthrix parvicella*" in R2A-Medium sowie in Mineralsalzmedium mit Tween 80 als Kohlenstoffquelle. Dabei war das Wachstum mit  $\text{NH}_4^+$  als Stickstoffquelle größer als mit  $\text{NO}_3^-$ . Ein starkes Wachstum wurde auch in den Ansätzen beobachtet, die neben dem Mineralsalzme-

dium keine Kohlenstoffquelle, sondern nur das Rhamnolipid enthielten. Anscheinend konnte das Rhamnolipid von "*Microthrix parvicella*" auch als Substrat genutzt werden. Die "*Microthrix*"-Reinkulturen wuchsen als sehr große Filamentknäuel, die einen Durchmesser von bis zu 1 cm erreichten. Eine Analyse des Rhamnolipid-Extrakts mittels ICMS ergab, dass die 3 Fettsäuren Palmitinsäure (C16), Ölsäure (C18) und eine weitere ungesättigte C16-Fettsäure dominierten. Das Vorhandensein von Öl- und Palmitinsäure erklärt das Wachstum der Reinkulturen in Mineralsalzmedien, die neben dem Extrakt keine weiteren C-Quellen enthielten.

### **3 Typ 0092**

Aus dem Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage wurden 24 Kolonien auf Selektionsplatten identifiziert, die Typ 0092-Filamente enthielten. Diese wurden abgeimpft und auf Belebtschlammhydrolysat (HA)- bzw. R2A-Medium kultiviert. Das weitere Wachstum der Isolate war allerdings nur sehr schwach und es konnte bereits nach 2 Überimpfungsschritten bei den meisten dieser Isolate kein Wachstum mehr beobachtet werden. Daher konnten die Stämme nur morphologisch charakterisiert werden, da für physiologische Untersuchungen nicht genügend Zellmaterial zur Verfügung stand. Möglicherweise benötigen diese Bakterien für ihr Wachstum die Anwesenheit anderer Organismen, die auf den Selektionsplatten noch gegeben war, nicht jedoch nach dem Überimpfen auf frische Agarplatten.

#### **3.1 Morphologische Charakterisierung**

Die Typ 0092-Bakterien wuchsen als unregelmäßig geformte Kolonien mit wurzelförmigen Ausläufern (Foto C.19) und bildeten unverzweigte, gerade bis gebogene Filamente ohne Scheide und Aufwuchs mit einem Durchmesser von 0,8-1,0  $\mu\text{m}$  (Foto C.20). Innerhalb der Fäden konnten keine Zellsepten erkannt werden. Die Filamente zeigten eine negative Gramreaktion und färbten sich bei der Neisserreaktion gleichmäßig graublau an (positive Reaktion; siehe Foto C.21/C.22). Morphologie und Färbeverhalten dieser Isolate entsprechen somit dem Erscheinungsbild von Typ 0092 im Belebtschlamm.

#### **3.2 Physiologische Charakterisierung**

Die Isolate waren in der Lage, kurzfristig auf R2A- sowie auf Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium zu wachsen. Nach spätestens 2 Überimpfungsschritten stellten jedoch die meisten der Isolate das Wachstum ein. Daher war eine weitere physiologische Charakterisierung nicht möglich.

Auch Bradford und Mitarbeiter (1996) isolierten Typ 0092-Filamente, die allerdings ein gutes Wachstum auf R2A-Medium zeigten. Die völlig unterschiedliche Koloniemorphologie (gelb, glänzend, leicht gewölbt) legt jedoch die Vermutung nahe, dass es sich bei diesen Isolaten um eine andere Bakteriengruppe handelt (siehe auch C.3.3).

Horan und Mitarbeiter (1988) beschrieben ebenfalls Typ 0092-Isolate, die auch biochemisch charakterisiert wurden. Die Organismen waren Katalase- und Oxidase-positiv und spalteten Gelatine, Casein und Harnstoff, während Stärke nicht hydrolysiert werden konnte. Weiterhin konnten sie aus Arginin Ammonium abspalten und waren DNase sowie Phosphatase-positiv.

### 3.3 Phylogenetische Charakterisierung

Die vergleichende Analyse der 16S rRNS der von Bradford und Mitarbeitern (1996) isolierten Typ 0092-Filamente ergab, dass diese zur *Cytophaga*-Untergruppe des *Flexibacter-Cytophaga-Bacteriodes*-Phylum gehören, mit *Cytophaga columnaris* als nächstem Verwandten (96,9% Ähnlichkeit). Ein Vergleich der Sequenz dieser Typ 0092-Fäden mit der CF319a-Sonde (Manz et al. 1994; Wagner et al. 1994b), die Mitglieder des *Cytophaga-Flavobacterium*-Clusters detektiert, ergab eine hundertprozentige Übereinstimmung.

Die Anwendung dieser Sonde in einem industriellen sowie einem kommunalen Belebtschlamm mit starkem Auftreten von Typ 0092 erbrachte jedoch keine positiven Signale mit diesen Organismen. Allerdings wurden auch mit der allgemeinen *Bacteria*-Sonde keine positiven Reaktionen erzielt. Ein möglicher Grund hierfür wäre, dass die Sonde nicht in die Bakterien eindringen konnte. Aufgrund der Zugehörigkeit der Typ 0092-Filamente zur Gruppe der Gram-negativen Bakterien dürfte das Eindringen der Sonde jedoch kein Problem darstellen, da diese Organismen nur über eine dünne Zellwand verfügen. Dennoch wurden verschiedene Vorbehandlungsmethoden getestet, die die Durchlässigkeit der Bakterienzellwand erhöhen. Allerdings waren weder die Behandlung mit verschiedenen Enzymen (Lysozym bzw. Mutanolysin) noch unterschiedliche Enzymkonzentrationen und Inkubationszeiten erfolgreich. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass der Grund für das Fehlen einer positiven Reaktion in einem Nichteindringen der Sonde in die Bakterienzelle liegt.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass diese Typ 0092-Filamente einer Bakteriengruppe angehören, die nicht von der *Bacteria*-Sonde erfasst wird. So stellten bereits

Daims und Mitarbeiter (1999) fest, dass wichtige Bakteriengruppen wie die *Planctomycetales*, die *Verrucomicrobia* sowie verschiedene Organismen der grünen Nichtschwefelbakterien keine Reaktion mit der 1990 von Amann und Mitarbeitern entwickelten EUB338-Sonde zeigten und ergänzten daraufhin diese Sonde durch zwei weitere EUB338-Sonden, um auch diese Bakteriengruppen zu detektieren. Möglicherweise gehören die in dieser Untersuchung beobachteten Typ 0092-Fäden einer noch unbekanntem Organismengruppe an, die von den momentan verfügbaren *Bacteria*-Sonden nicht erfasst wird.

Ein Vergleich der Ergebnisse der morphologischen, physiologischen und taxonomischen Untersuchungen mit denen anderer Autoren weist darauf hin, dass es sich bei den Reinkulturen des Typs 0092 vermutlich um unterschiedliche Bakteriengruppen handelt.

## **4 Typ 0041/0675**

### **4.1 Physiologische Charakterisierung**

Die Isolation von Typ 0041/0675 erweist sich aufgrund des bakteriellen Aufwuchses als sehr schwierig, da die Fäden meist mit den Aufwuchsorganismen vergesellschaftet bleiben oder wegen ihres langsamen Wachstums von diesen überwuchert werden. Dennoch waren einige Autoren in der Lage, Reinkulturen von Typ 0041/0675 zu isolieren (Eikelboom 1975; Trick 1982; Williams und Unz 1985). Trick (1982) beschreibt, dass ihre Isolate in den meisten Fällen auch nach zahlreichen Trennungsschritten mit anderen Bakterien vergesellschaftet blieben und zudem nur über einen begrenzten Zeitraum zu kultivieren waren. Die Reinkulturen von Eikelboom (1975) und Williams und Unz (1985) bildeten auf SCY-Medium rosafarbene Kolonien mit einem Durchmesser von 1 mm. Die Fäden bestanden aus quadratischen bis zylindrischen Zellen und waren von einer Scheide umgeben.

Physiologische Untersuchungen zeigten, dass Acetat und Glycerin als Kohlenstoffquelle genutzt wurden, während hochmolekulare Substrate wie Stärke, Cellulose, Agar, Chitin und Tween 80 nicht verwertet wurden (Trick 1982). Die Anwendung der Mikroautoradiographie-Technik, bei der die Substrataufnahme direkt im Belebtschlamm untersucht wurde, ergab, dass die Typ 0041/0675-Filamente unter aeroben Bedingungen Glucose und in den meisten Fällen auch die Aminosäure Leucin aufnahmen. Glycin wurde dagegen nur von wenigen Fäden, Acetat und Ölsäure von überhaupt keinem Faden aufgenommen. Unter anoxischen Bedingungen waren die gleichen Tendenzen zu beobachten, während die Filamente unter anaeroben Bedin-

gungen keine oder nur eine geringe Substrataufnahme zeigten (Thomsen et al. 2001).

## 4.2 Phylogenetische Charakterisierung

Eine phylogenetische Zuordnung von Typ 0041/0675 aufgrund der Analyse der 16S rDNS liegt bis jetzt noch nicht vor. Allerdings wurden mit Hilfe der FISH-Technik unter Anwendung der Oligonukleotidsonden TM7305 und TM7905 Filamente identifiziert, die morphologisch Typ 0041 entsprechen (Hugenholtz et al. 2001). TM7 ist eine Division der *Bacteria*-Domäne und umfasst unkultivierte Bakterien, deren Sequenzen mittels kultivierungsunabhängiger PCR Klon-Studien ermittelt wurden. Diese Klone sind in der Umwelt weit verbreitet und wurden in den unterschiedlichsten Habitaten entdeckt (Boden, Grundwasser, Süßwasser, Meerwasser, menschliche Mundhöhle). Auch im Belebtschlamm sind TM7-Bakterien weit verbreitet, wie durch FISH-Analysen gezeigt wurde. Dabei wurden verschiedene Morphotypen beobachtet, wie Stäbchen, Kokken und verschiedene fadenförmige Organismen, u.a. auch ein Gram-positives Filament mit Scheide und Aufwuchs, das sehr wahrscheinlich zu Typ 0041 gehört (Hugenholtz et al. 2001).

In der vorliegenden Untersuchung wurden Belebtschlämme mehrerer kommunaler und industrieller Kläranlagen mit den Oligonukleotid-Sonden TM7305 und TM7905 hybridisiert (siehe Tabelle C.3 in Kapitel C.1.1.2.2). Dabei wurden Typ 0041-Filamente nachgewiesen, die ein positives Signal mit den Sonden lieferten. Allerdings wurden in einigen Belebtschlämmen trotz Vorhandensein von Typ 0041/0675-Fäden nach klassischer mikroskopischer Schlammanalyse mit den beiden Sonden keine Filamente detektiert. In anderen Schlämmen reagierte ein Teil der Typ 0041/0675-Organismen positiv, während der Rest keine positive Reaktion zeigte. Fotografie C.23 zeigt ein positiv getestetes Typ 0041-Filament mit Aufwuchs.

Auch Thomsen und Mitarbeiter (2001) identifizierten mit der TM7-gruppenspezifischen Sonde Typ 0041-Filamente in zwei Kläranlagen, wobei 14-16% dieser Filamente ein positives Signal lieferten. Die restlichen Typ 0041-Fäden hybridisierten zwar mit der allgemeinen *Bacteria*-Sonde EUB338, aber nicht mit einer der 10 gruppenspezifischen Sonden, die getestet wurden. So bleibt die phylogenetische Zugehörigkeit der meisten dieser Filamente unbekannt. In dieser Untersuchung wurden auch die Aufwuchsorganismen charakterisiert. Dabei zeigte sich, dass diese eine hohe phylogenetische Diversität aufweisen. 44% der Bakterien konnten zugeordnet werden und gehören verschiedenen Gruppen an wie z.B. den alpha-, beta- und delta-Proteobakterien, dem *Cytophaga-Flavobacterium*-Cluster sowie den Gram-po-

sitiven Bakterien mit einem hohen Gehalt an Guanin und Cytosin ("Hoch-GC"-Bakterien).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass sich der 0041-Morphotyp sehr wahrscheinlich aus mehreren verschiedenen Species zusammensetzt. Einige der Typ 0041-Filamente gehören der TM7-Division der *Bacteria*-Domäne an, während die phylogenetische Zugehörigkeit eines Großteils momentan noch unbekannt ist. Daher ist eine Identifikation dieses Fadentyps, die nur auf morphologischen Kriterien beruht, ungenügend und eine Entwicklung weiterer rRNS-Sonden zur Detektion der noch nicht charakterisierten Typ 0041-Filamente erforderlich.

## 5 Typ 1851

Auch Filamente vom Typ 1851 besitzen häufig einen bakteriellen Aufwuchs, so dass sich die Isolation dieser Fäden ähnlich wie im Falle von Typ 0041/0675 als sehr schwierig erweist.

Kohno und Mitarbeiter (2001) beschreiben die Isolation von 5 Stämmen des Typs 1851 aus Belebtschlamm. Die Kolonien waren orange pigmentiert und wiesen eine deutlich filamentöse Struktur auf. Die Filamente mit einem Durchmesser von ca. 1 µm erreichten eine Länge von mehreren Millimetern. Die Gram- und meist auch die Neisserfärbung lieferten eine negative Reaktion. Beim Wachstum in flüssigen sowie auf festen Nährmedien zeigten die Filamente unterschiedliche morphologische Strukturen (spiralenförmige, gewundene und seilförmige Filamente) sowie eine gleitende Bewegung, Phänomene, die nicht in nativem Belebtschlamm beobachtet wurden. Weitere physiologische Untersuchungen zeigten, dass neben Pyruvat eine ganze Reihe von Zuckern von den Isolaten gut als Kohlenstoffquellen genutzt wurden, u.a. Glucose, Fructose, Mannose, Maltose, Treharose, Melibiose, Raffinose, Arabinose und Xylose. Die Analyse der 16S rDNS-Sequenzen ergab eine Zugehörigkeit dieser Isolate zur *Chloroflexus*-Untergruppe, die zu den grünen Nichtschwefelbakterien gehören.

## D Schlussfolgerungen und Hinweise für die Wasserwirtschaft

### 1 Mikrobiologische Betrachtungen zur Abwasserreinigung früher und heute

Absetzschwierigkeiten des belebten Schlammes bestehen seit der Einführung des Belebungsverfahrens. Zu Beginn der Anwendung dieses Verfahrens war die einzige Anforderung an die Abwasserreinigung der Abbau der Kohlenstoffverbindungen, d.h. eine Erniedrigung des BSB<sub>5</sub>-Gehalts. Die dafür betriebenen Anlagen waren Hochlastreaktoren im Schlammbelastungsbereich über 0,3 kg BSB<sub>5</sub>/(kgTS · d) mit einem Schlammalter zwischen 0,5 und 5 Tagen, Systeme, die heutzutage nur noch im Industriebereich eine Rolle spielen. In diesen Anlagen fallen in der klassischen mikroskopischen Schlammuntersuchung häufig fadenförmig wachsende Bakterien auf, die Blähschlammereignisse hervorrufen, d.h. voluminöse Schlämme, die sich in der Nachklärung schwer absetzen. Typische Vertreter dieser "Hochlast"-Fadenbakterien sind *Sphaerotilus* spp., *Haliscomenobacter hydroxsis* oder Schwefelbakterien wie *Thiothrix* sp. (siehe Tab. D.1, Spalte 1 und 2).

Tab. D.1: Stoffwechselgruppen fadenbildender Bakterien in belebtem Schlamm und wichtige Selektionsfaktoren (aus Lemmer und Lind 2000)

Schwefelbakterien	Hochlast-Bakterien	Niedriglast-Bakterien
Typ 021 N	<i>Sphaerotilus</i> spp.	Typ 1851
Typ 0914	Typ 1701	" <i>M. parvicella</i> "
<i>Thiothrix</i> sp.	<i>Haliscomenobacter hydroxsis</i>	Typ 0041 / 0675
<i>Beggiatoa</i> sp.	Typ 0961	" <i>N. limicola</i> " I / II / III
	Typ 021 N	nocardioforme Actinomyceten
	Typ 1863	
Reduzierte Schwefelverbindungen	B <sub>TS</sub> > 0,15 kg BSB <sub>5</sub> / (kg TS · d)	B <sub>TS</sub> < 0,15 kg BSB <sub>5</sub> / (kg TS · d)
Faulprozesse	N/P- Mangel	Hydrophobie der Zelloberfläche
	O <sub>2</sub> -Mangel	Hydrophobes Substrat
	volle Durchmischung	Oberflächenaktive Stoffe

Diese Organismen wurden schon früh mikrobiologisch charakterisiert, da sie auch mit klassischen Kultivierungsmethoden relativ leicht zu erfassen waren, d.h. sie konnten auf festen Nährmedien isoliert und leicht weitergezüchtet werden. Viele dieser Organismen wurden daher eingehend in Reinkultur untersucht und sind physiologisch, d.h. was ihre Nahrungsansprüche betrifft, gut charakterisiert. Auch wachstumskinetisch, d.h. was ihre Wachstumsgeschwindigkeit und Substrataufnahmeraten betrifft, sind sie sehr genau beschrieben. Dadurch konnten für diese

Organismengruppe auch gezielte Bekämpfungsmaßnahmen formuliert werden (Zusammenstellung s. Lemmer und Lind 2000). Es hat sich herauskristallisiert, dass diese Organismen gut mit Stickstoff- und Phosphormangel sowie Sauerstoffmangel zurechtkommen, weshalb ein Ausgleich evtl. einseitigen Nährstoffangebots nach der Faustregel  $BSB_5:N:P$  von 100:5:1 sowie die Einhaltung eines Sauerstoffschwellenwerts von etwa 2 mg/l im Belebungsbecken ihren Konkurrenzvorteil und damit die Probleme in vielen Fällen beseitigt. Weiter zeigten die Untersuchungen an Reinkulturen, dass diese "Hochlast"-Fadenbakterien sehr effektiv gelöstes Substrat aus der Wasserphase aufnehmen können, weswegen sie in Systemen mit gleichmäßiger  $BSB_5$ -Verteilung entscheidende Konkurrenzvorteile haben. Daraus ergab sich als äußerst effektive Bekämpfungsmaßnahme die Einrichtung eines "Substratgradienten", d.h. hohe Belastung dort, wo Zulauf und Rücklaufschlamm zusammenkommen, was sich im Anlagenbau durch Einrichtung einer Pfropfenströmung oder besser noch durch den Einbau eines "Selektors", d.h. einer hochbelasteten Vorzone im Bereich einer Raumbelastung von  $10 \text{ kg } BSB_5 / (\text{m}^3 \cdot \text{d})$ , bewerkstelligen lässt.

Ganz andere Verhältnisse haben wir heute auf den Kläranlagen. Die Anforderung an die Abwasserreinigung beinhaltet jetzt neben einer noch weiter reichenden Entfernung von Kohlenstoffverbindungen auch die Entfernung von Stickstoff und Phosphor. Um eine stabile Nitrifikation zu gewährleisten, musste daher die Schlammbelastung drastisch heruntergefahren werden auf eine BTS um  $0,15 \text{ kg } BSB_5 / (\text{kgTS} \cdot \text{d})$  und darunter mit einem Schlammalter von 20 Tagen und darüber. Weiter wurden anoxische bzw. anaerobe Zonen für die Denitrifikation bzw. biologische Phosphorentfernung eingerichtet. All diese Maßnahmen bedeuten für die Bakterien des belebten Schlammes Stressbedingungen, da zum einen durch die niedrige Belastung gelöstes Nährsubstrat in der Wasserphase praktisch nicht mehr zur Verfügung steht. Zum anderen herrscht für aerobe Bakterien in anoxischen und anaeroben Teilbereichen Stress wegen Sauerstoffmangels. Der Mangel an gelöstem Substrat in der Wasserphase bedeutet, dass die Bakterien in den heutigen Anlagen dort keine Nahrung mehr finden. Sie sind also entweder auf partikuläres Substrat angewiesen oder auf solches, das an Grenzflächen adsorbiert, beispielsweise an die Oberfläche einer Belebtschlammflocke. Das bedeutet, dass heute im Vergleich zu Hochlastanlagen Adsorptionsprozessen und der Hydrolyse partikulären Substrats für die Nährstoffversorgung eine wesentlich wichtigere Rolle zukommt. Aus der mikrobiologischen Literatur ist bekannt, dass Bakterien auf Stress durch Substratmangel häufig mit zwei "physiologischen Maßnahmen" reagieren: 1) sie machen sich wasserabstoßend, d.h. hydrophob, um dadurch eine bessere Anheftung an nährstoffangereicherte Grenzflächen zu erlangen, 2) sie produzieren oberflächenaktive Stoffe, um die Verfügbarkeit von nicht in Wasser gelöstem Substrat zu erhöhen, z.B. "Lösen" von fett-

artigen Substanzen. Dies trägt, wie eingangs kurz beschrieben, auch zur Bildung von grenzflächen-stabilisierten Gasbläschen bei, d.h. Schaum, der nicht mehr zerfällt oder durch Wasser nieder zu spritzen ist. Daher sind wir heute im kommunalen Bereich meist nicht mehr mit Blähschlammereignissen konfrontiert, sondern mit starker Schaumbildung auf den Belebungsbecken und Schwimmschlamm, d.h. flotierten Schlammschichten im Nachklärbecken. Hierzu tragen sowohl Einzelbakterien als auch solche bei, die zur Fadenbildung befähigt sind (Lemmer et al. 2000).

Letztere fallen in der klassischen Lichtmikroskopie natürlich als erstes ins Auge. Daher hat sich mittlerweile eine Gruppe von ca. sechs Fadenbakterien herauskristallisiert, denen wir bei Schaumereignissen immer wieder begegnen: nocardioforme Actinomyceten, "*Microthrix parvicella*", "*Nostocoida limicola*", sowie die nach Eikelboom (1975) zunächst mit Typnummern versehenen Bakterien Typ 0092, Typ 0041/0675 und Typ 1851 (s. Tab. D.1, Spalte 3). Diese "Niedriglast"-Bakterien gehören meist zur Gruppe der Gram-positiven Bakterien, was nicht verwundert, da diese Organismen sich aufgrund ihrer Zellwandeigenschaften besonders leicht hydrophob gestalten und damit im Umfeld heutiger Anlagen besser konkurrieren können. Als Antwort auf diese Entwicklung haben sich – wie oben für Blähschlammereignisse im Hochlastbereich beschrieben – Mikrobiologen ans Werk gemacht, um diese Fadenbakterien zu charakterisieren und, entsprechend dem Vorgehen in Sachen Blähschlamm, differenzierte Hinweise zur gezielten Bekämpfung geben zu können.

Es zeigte sich jedoch, dass diesen Organismen allein mit klassischen Methoden der Mikrobiologie, sowohl im Hinblick auf ihre Physiologie als auch auf ihre Taxonomie, nicht mehr beizukommen ist. Da sie in ihrem Umfeld "niedrig belastete Kläranlage" partikuläres Substrat oder solches nutzen, das an die "Matrix" Belebtschlammflocke adsorbiert oder dort eingebettet ist, bereitet es Probleme, dieses mit klassischen Kultivierungsmethoden nachzustellen. Da diese meist auf gleichmäßig verteiltem Substrat in Flüssig- oder Festmedien beruhen, sind die Organismen damit oft schlecht zu einem für physiologische und wachstumskinetische Versuche hinreichenden Wachstum zu bewegen. Daher konnten auch in den vorliegenden Untersuchungen Isolate nur durch "mechanische" Anreicherung über Ausschwemmen oder durch manuelles Isolieren auf Festmedien mit Hilfe von Mikromanipulation gewonnen werden, was knifflig und zeitaufwendig ist. Auch die Weiterzucht erwies sich als weit aufwendiger als bei "Hochlastbakterien" und war nicht immer erfolgreich. Weiter mussten aufgrund des langsamen Wachstums alle physiologischen Tests als "Langzeit"-Versuch über mehrere Wochen angelegt werden. Daher lag in der vorliegenden Untersuchung das Hauptaugenmerk zunächst auf zwei der o.g. Organismen, "*Nostocoida limicola*" und "*Microthrix parvicella*".

Bei der taxonomischen Einordnung kommen mittlerweile nicht mehr die klassischen numerischen Methoden über Gewichtung morphologischer und physiologischer Kriterien, sondern ausschließlich molekularbiologische Methoden zum Einsatz. Die moderne Bakterientaxonomie erschließt "Stammbäume" aus dem Verwandtschaftsgrad wichtiger "konservativer" Bereiche des genetischen Materials. Durch diese Methoden konnten auch unsere Isolate z.T. taxonomisch eingeordnet werden. Dabei zeigte sich, dass ein von Eikelboom (1975) beschriebener "Morphotyp", d.h. Fadenbakterien gleichen Aussehens bei Anwendung der klassischen Lichtmikroskopie, oft keine eindeutige taxonomische Zuordnung hat, sondern dass sich dahinter sehr verschiedene Bakteriengruppen verbergen können. Für den Praktiker bedeutet dies, dass auch die Bekämpfung solcher Organismen voraussichtlich unterschiedlicher Maßnahmen bedarf.

## **2 Charakterisierung von Fadenbakterien aus Schaum und Hinweise zur Bekämpfung**

### **2.1 Nocardioforme Actinomyceten**

Diese Bakteriengruppe wurde schon in unseren früheren Untersuchungen physiologisch genau charakterisiert, da sie die einzige Gruppe der Niedriglast-Bakterien ist, die sich gut kultivieren lässt. Hier wurden auch grundlegende Erkenntnisse zur Hydrophobierung der Zelloberfläche und die Produktion oberflächenaktiver Substanzen durch diese Organismen (Biotenside) gewonnen (Lemmer 1986, Lemmer und Baumann 1988a, b, Lemmer et al. 2000). Florenanalysen mit molekularbiologischen Methoden haben bestätigt, dass die in Schaumanlagen auftretenden nocardioformen Actinomyceten vielen verschiedenen Gattungen zuzuordnen sind und oft auch dann im Schlamm vorliegen, wenn sie in der klassischen mikroskopischen Schlammuntersuchung nicht aufzufinden sind, weil sie nicht als der typisch hirschgeweihartig verzweigte Faden wachsen (Müller et al. 2001). All diese Actinomyceten haben sich jedoch aufgrund ihres breiten Nahrungsverwertungsspektrums als physiologisch sehr ähnlich erwiesen.

In der Kläranlage kann daher der "Morphotyp Actinomyceten" bekämpft werden. So hat sich, da die Organismen zum Aufbau einer hohen Biomassekonzentration eine hohe Konzentration an Substrat benötigen, als durchschlagende Maßnahme vielerorts bewährt, den Eintrag ihrer Leibspeise, d.h. Fette und Öle, in die Kläranlage bzw. das Belebungsbecken zu verringern.

## 2.2 "*Microthrix parvicella*"

Die taxonomische Charakterisierung ergab, dass "*Microthrix parvicella*"-Isolate weltweit große genetische Ähnlichkeit haben. Sie erwiesen sich als weitläufig mit nocardioformen Actinomyceten verwandt (Blackall et al. 1994). Auch unsere Isolate ergaben mit den in der Literatur veröffentlichten Gensonden positive Signale, d.h. sie sind der gleichen genetischen Einheit zuzuordnen. Reinkulturen dieses Organismus wurden in den 80er Jahren von Slijkhuis (1983) sehr genau charakterisiert. Als wichtigste Wachstumsfaktoren wurden langkettige Fettsäuren wie Ölsäure als Kohlenstoffquelle sowie reduzierte Stickstoff-, Phosphor- und Schwefel-Quellen eingegrenzt, was heute durch mikroautoradiographische Methoden *in situ*, d.h. direkt im unbeeinflussten belebten Schlamm bestätigt wurde (Andreasen und Nielsen 2000). Das macht "*Microthrix parvicella*" in Nitrifikations-/Denitrifikationsanlagen und anaeroben Zonen zur biologischen Phosphorentfernung extrem konkurrenzfähig, zumal auch nachgewiesen wurde, dass das an sich aerobe Bakterium auch im Anoxischen und Anaeroben zur Aufnahme von Substrat fähig ist (Andreasen und Nielsen 2000).

Durch die taxonomische Gleichartigkeit sind ähnliche Bekämpfungsmaßnahmen möglich. Zunächst ist aufgrund der Vorliebe des Bakteriums für langkettige Fettsäuren der Eintrag solcher Verbindungen möglichst gering zu halten. Dies gilt insbesondere für die Wintermonate, in denen "*Microthrix parvicella*" in sehr vielen Anlagen überhand nimmt, wohl aufgrund der verringerten Hydrolyse- und Abbauraten langkettiger Fettsäuren. Neben der Verwendung langkettiger Fettsäuren aus dem Zulauf ist, wie unsere Untersuchungen zeigten, "*Microthrix parvicella*" durchaus auch in der Lage, von Belebtschlammorganismen ausgeschiedene oberflächenaktive Substanzen wie Rhamnolipide als Substrat zu verwerten und damit hohe Biomassekonzentrationen aufzubauen. Das bedeutet, dass auch die Produktion von Biotensiden, wie sie beispielsweise in sehr niedrig belasteten Schlammstabilisierungsanlagen häufig ist, zu einem Anwachsen der "*Microthrix parvicella*"-Population beitragen kann. Als wichtige Bekämpfungsmaßnahme ist neben einer leichten Erhöhung der Schlammbelastung zu empfehlen, eisenhaltige Fällmittel zeitweise durch aluminiumhaltige zu ersetzen. Eikelboom empfiehlt eine Dosierung von etwa 3 mg Al/(gTS · d) (pers. Mitt.). Im sehr niedrigen Belastungsbereich unter 0,05 kg BSB<sub>5</sub>/(kg TS · d) wird in den Niederlanden erfolgreich das sog. BCFS-Verfahren angewandt. Dabei wird im Anschluss an eine strikt anaerobe Phase ein ppropfendurchströmter anoxischer Selektor, dann eine in Abhängigkeit vom BSB<sub>5</sub>/N-Verhältnis flexible anoxische Phase geschaltet, die aus einem separaten rein anoxischen Reaktor und einer flexiblen Zone in einem anoxisch/aeroben Reaktor besteht. Ziel dieser Konfiguration ist es, eine simultane Denitrifikation/Nitrifikation zu vermeiden. Dadurch und durch die Einstel-

lung einer hohen Sauerstoffkonzentration von über 1,5 mg/l sowie einer niedrigen Ammoniumkonzentration von unter 1 mg/l in der aeroben Zone kann "*Microthrix parvicella*" erfolgreich zurückgedrängt werden (Kruit et al. 2001, Brandse 2001).

### 2.3 "*Nostocoida limicola*"

Zur Abklärung der taxonomischen Zugehörigkeit war die klassische Mikroskopie nicht ausreichend. Daher kamen molekularbiologische Methoden zum Einsatz (Schade et al. 2001). Wie auch in der Literatur beschrieben, verbirgt sich hinter dem "Morphotyp *Nostocoida limicola*" eine Vielzahl an verschiedenen Organismen. So fanden Blackall und Mitarbeiter (2000) sie zu den sog. "Hoch-GC"-Bakterien zugehörig, das sind solche mit einem hohen Gehalt an Guanin und Cytosin in ihrem genetischen Material, Seviour et al. (2001) zu den "Niedrig-GC"-Bakterien, Snaidr et al. (2001) zur alpha-Gruppe der Proteobakterien. Einige der "*Nostocoida limicola*"-Isolate der vorliegenden Untersuchung erwiesen sich zum einen als zur Gruppe der grünen Nichtschwefelbakterien zugehörig, die komplexes Substrat in relativ hoher Konzentration, Ammonium als Stickstoffquelle sowie einen pH-Wert über 6 bevorzugen, weshalb sie in sehr niedrig belasteten N/DN-Anlagen mit guter Nitrifikationsleistung nicht konkurrenzfähig sind. Andere Isolate gehörten zu den "Hoch-GC"-Bakterien. Sie bevorzugten als Kohlenstoffquelle Kohlenhydrate, insbesondere Polysaccharide, sowie ebenfalls Ammonium als Stickstoffquelle. Daher ist es nicht verwunderlich, dass sie vorwiegend in Anlagen mit hohem Eintrag an zuckerhaltigem Abwasser (Getränke-, Speiseeis-, Süßwarenindustrie) gefunden wurden. Diese Substratvorlieben wurden auch *in situ* durch Mikroautoradiographie im unbeeinflussten Schlamm nachgewiesen (Andreasen und Nielsen 2000).

Aufgrund der taxonomischen Vielfalt ist vor der Bekämpfung des "Morphotyps *Nostocoida limicola*" eine Abklärung der Bakteriengruppe nötig, der die Organismen angehören. Dies ist zuverlässig nur mit den aktuellen Fluoreszenzmethoden möglich und zunächst noch Fachpersonal vorbehalten. Allgemein hat sich erwiesen, dass "*Nostocoida limicola*"-artige Bakterien am oberen Ende des Niedriglastbereichs angesiedelt sind, d.h. eine Erniedrigung der Belastung könnte Erleichterung bringen. Weiter ist der Eintrag hoher Konzentrationen an Kohlenhydraten als bevorzugtes Substrat im Zulauf zur Kläranlage zu überprüfen und evtl. durch Vorreinigung beim entsprechenden Einleiter zu unterbinden.

## 2.4 Typ 0041/0675

Auch bei Bakterien dieses "Morphotyps" sind aufgrund der hohen Diversität sehr unterschiedliche biologische Eigenschaften und damit auch unterschiedliche Bekämpfungsmaßnahmen zu erwarten. Hierzu gibt es allerdings nur wenig gesicherte Erkenntnisse, da eine Isolierung dieser Bakterien aufgrund ihres massiven Aufwuchses praktisch nicht möglich ist. Auffallend ist, dass in dänischen Kläranlagen vorwiegend Typ 0041/0675 vorkommt. Der Fadenorganismus tritt dabei insbesondere dann auf, wenn einer Mischzone, in der Zulauf und Rücklaufschlamm zusammentreffen, eine anoxische Zone folgt. Daher wird vermutet, dass Typ 0041/0675 partikuläres Substrat bevorzugt, das im Falle verzögerter Hydrolyse noch in großem Ausmaß vorliegt (Eikelboom und Andreasen 1995). Diese Fadenorganismen machen im Vergleich zu den anderen allerdings nur geringe Probleme. Daher ist – wenn schon das Auftreten von Fadenbakterien nicht gänzlich zu vermeiden ist - anzustreben, die Populationen von Fadenbildnern hin zu Typ 0041/0675 zu verschieben.

## 2.5 Typ 0092

Der in der klassischen Mikroskopie als Typ 0092 bezeichnete "Morphotyp" erwies sich als zu verschiedenen Bakteriengruppen zugehörig. Da die in den vorliegenden Untersuchungen gewonnenen Isolate nur wenige Zellpassagen überlebten, waren physiologische Untersuchungen nicht möglich. Das wenige Zellmaterial wird momentan zur Ermittlung der taxonomischen Zugehörigkeit verwendet. Diese Arbeiten sind noch im Gang.

Auffällig ist, dass Typ 0092 häufig im Sommer "*Microthrix parvicella*" "ersetzt", und zwar offenbar immer dann, wenn die Nitrifikation wieder voll einsetzt und somit vorwiegend Nitrat als Stickstoffquelle vorliegt.

## 2.6 Typ 1851

Der Organismus wurde aufgrund des starken Aufwuchses bisher nicht isoliert. Daher ist er weder taxonomisch noch physiologisch charakterisiert.

Für eine Zusammenstellung der bisher verfügbaren Informationen sei auf Lemmer und Lind (2000) verwiesen.

## Literatur

- Al-Tahhan, R.A., Sandrin, T.R., Bodour, A.A., Maier, R.M. (2000). Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3262-3268
- Amann, R.L., Binder, B.J., Olson, R.J., Chisholm, S.W., Devereux, R., Stahl, D.A. (1990). Combination of 16S ribosomal RNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1919-1925
- Andreasen, K., Nielsen, P.H. (1997). Application of microautoradiography to the study of substrate uptake by filamentous microorganisms in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3662-3668
- Andreasen, K., Nielsen, P.H. (1998). In situ characterization of substrate uptake by *Microthrix parvicella* using microautoradiography. *Wat. Sci. Tech.* 37, 19-26
- Andreasen, K., Nielsen, P.H. (2000). Growth of *Microthrix parvicella* in nutrient removal activated sludge plants: studies of in situ physiology. *Wat. Res.* 34, 1559-1569
- Blackall, L.L., Seviour, E.M., Cunningham, M.A., Seviour, R.J., Hugenholtz, P. (1994). "*Microthrix parvicella*" is a novel, deep branching member of the Actinomycetes subphylum. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, 513-518
- Blackall, L.L., Seviour, E.M., Bradford, D., Rossetti, S., Tandoi, V., Seviour, R. (2000). '*Candidatus Nostocoida limicola*', a filamentous bacterium from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 703-709
- Bradford, D., Hugenholtz, P., Seviour, E.M., Cunningham, M.A., Stratton, H., Seviour, R.J., Blackall, L.L. (1996). 16S rRNA analysis of isolates obtained from gram-negative, filamentous bacteria micromanipulated from activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 19, 334-343
- Brandse, F. (2001). Die Lösung des "Microthrix parvicella"-Problems. *Verbandsbericht 539*, Verband der Schweizer Abwasser- und Gewässerschutzfachleute, Luzern, 20. Sept. 2001
- Brosius, J., Dull, T.L., Sleeter, D.D., Noller, H.F. (1981). Gene organization and primary structure of a ribosomal operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 148, 107-127
- Chandrasekaran, E.V., BeMiller, J.N. (1980). Constituent analysis of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.* 8, 89-96
- Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.-H., Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all *Bacteria*: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *System. Appl. Microbiol.* 22, 438-448
- Eikelboom, D.H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Wat. Res.* 9, 365-388

- Eikelboom, D.H., Andreasen, K. (1995). Survey of filamentous population in nutrient removal plants in four European countries. Report TNO-MW-R95/090, TNO Delft, Niederlande.
- Erhart, R. (1997). In situ Analyse mikrobieller Biozönos in Abwasserreinigungsanlagen. Dissertation Technische Universität München
- Erhart, R., Bradford, D., Seviour, R.J., Amann, R., Blackall, L.L. (1997). Development and use of fluorescent in situ hybridization probes for the detection and identification of "*Microthrix parvicella*" in activated sludge. System. Appl. Microbiol. 20, 310-318
- Horan, N.J., Bu'Ali, A.M., Eccles, C.R. (1988). Isolation, identification and characterization of filamentous and floc-forming bacteria from activated sludge flocs. Environ. Technol. Lett. 9, 449-457
- Hugenholz, P., Tyson, G.W., Webb, R.I., Wagner, A.M., Blackall, L.L. (2001). Investigation of candidate division TM7, a recently recognized major lineage of the domain *Bacteria* with no known pure-culture representatives. Appl. Environ. Microbiol. 67, 411-419
- Juretschko, S. (2000). Mikrobielle Populationsstruktur und -dynamik in einer nitrifizierenden / denitrifizierenden Belebtschlammanlage. Dissertation Technische Universität München
- Kohno, T., Sei, K., Mori, K. (2001). Characterization of type 1851 organism isolated from activated sludge samples. Poster presentation 3. IWA Int. Spec. Conf. "Microorganisms in activated sludge and biofilm processes", Rom, June 13-15, 2001
- Kruit, J., Hulsbeek, J., Visser, A. (2001). Bulking sludge solved?! Proc. 3. IWA Int. Spec. Conf. "Microorganisms in activated sludge and biofilm processes", S. 344-352, Rom, 13.-15. Juni 2001
- Lemmer, H. (1986). The Ecology of Scum Causing Actinomycetes in Sewage Treatment Plants. Wat. Res. 20, 531-535
- Lemmer, H., Baumann, M. (1988 a). Scum actinomycetes in sewage treatment plants. Part 2. The effect of hydrophobic substrate. Wat. Res. 22, 761-763.
- Lemmer, H., Baumann, M. (1988 b). Scum actinomycetes in sewage treatment plants. Part 3. Synergisms with other sludge bacteria. Wat. Res. 22, 765-767.
- Lemmer, H., Lind, G. (2000). Blähschlamm, Schaum, Schwimmschlamm. F. Hirthammer Verlag München,
- Lemmer, H., Lind, G., Müller, E., Schade, M., Ziegelmayr, B. (2000). Scum in activated sludge plants: Impact of non-filamentous and filamentous bacteria. Acta hydrochim. hydrobiol. 28 (1), 34-40
- Liu, J.R., Burrell, P., Seviour, E.M., Soddell, J.A., Blackall, L.L., Seviour, R.J. (2000). The filamentous bacterial morphotype '*Nostocoida limicola*' I contains at least two previously described genera in the low G+C gram positive bacteria. Syst. Appl. Microbiol. 23, 528-534
- Liu, J.-R., McKenzie, C.A., Seviour, E.M., Webb, R.I., Blackall, L.L., Saint, C.P., Seviour, R.J. (2001). Phylogeny of the filamentous bacterium '*Nostocoida limicola*' III from activated sludge. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 51, 195-202

- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K.-H. (1992). Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions. *System. Appl. Microbiol.* 15, 593-600
- Manz, W., Wagner, M., Amann, R., Schleifer, K.-H. (1994). In situ characterization of the microbial consortia active in two wastewater treatment plants. *Wat. Res.* 28, 1715-1723
- Maszenan, A.M., Seviour, R.J., Patel, B.K.C., Schumann, P., Burghardt, J., Tokiwa, Y., Stratton, H.M. (2000). The isolates of novel phosphate-accumulating Gram-positive cocci, obtained from activated sludge, belong to a new genus *Tetrasphaera* gen. nov., and description of two new species, *Tetrasphaera japonica* sp. nov. and *Tetrasphaera australiensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 593-603
- Müller, E., Lind, G., Lemmer H. (2001). Comparative bacteria community analysis of municipal and industrial activated sludge and scum: FISH vs. classical findings. Poster presentation 3. IWA Int. Spec. Conf. "Microorganisms in activated sludge and biofilm processes", Rom, June 13-15, 2001, accepted
- Nowak, G., Brown, G.D. (1990). Characteristics of *Nostocoida limicola* and its activity in activated sludge suspension. *Res. J. Wat. Pollut. Control. Fed.* 62, 137-142
- Reasoner, D.J., Geldreich, E.E. (1985). A new medium for the enumeration and subculture of bacteria from potable water. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 1-7
- Rossetti, S., Christensson, C., Blackall, L.L., Tandoi, V. (1997). Phenotypic and phylogenetic description of an Italian isolate of "*Microthrix parvicella*". *J. Appl. Microbiol.* 82, 405-410
- Schade, M., Beimfohr, C., Lemmer, H. (2001). Phylogenetic and physiological characterization of a *Nostocoida limicola*-like organisms isolated from activated sludge. Proceedings 3. IWA Int. Spec. Conf. "Microorganisms in activated sludge and biofilm processes", Rom, 13.-15. Juni 2001, 54-60, accepted
- Seviour, E.M., Williams, C., DeGrey, B., Soddell, J.A., Seviour, R.J., Lindrea, K.C. (1994). Studies on filamentous bacteria from Australian activated sludge plants. *Wat. Res.* 28, 2335-2342
- Seviour, R.J., Liu, J.-R., Seviour, E.M., McKenzie, C.A., Blackall, L.L., Saint, C.P. (2001). The *Nostocoida limicola* story: resolving the phylogeny of this morphotype responsible for bulking in activated sludge. Proceedings 3. IWA Int. Spec. Conf. "Microorganisms in activated sludge and biofilm processes", Rom, 13.-15. Juni 2001, 68-74
- Shreve, G.S., Inguva, S., Gunnam, S. (1995). Rhamnolipid biosurfactant enhancement of hexadecane biodegradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol. Mar. Biol. Biotechnol.* 4, 331-337
- Slijkhuys, H. (1983a). *Microthrix parvicella*, a filamentous bacterium isolated from activated sludge: cultivation in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 832-839
- Slijkhuys, H. (1983b). The physiology of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella*. Dissertation Landbouwhogeschool, Wageningen, Nederlande

- Snaidr, J. (1997). Phylogenie und in situ Identifizierung von Bakterien im Belebtschlamm von biologischen Abwasserreinigungsanlagen. Dissertation Technische Universität München
- Snaidr, J., Amann, R., Huber, I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1997). Phylogenetic analysis and in situ identification of bacteria in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 2884-2896
- Snaidr, J., Beimfohr, C., Levantesi, C., Rossetti, S., van der Waarde, J., Geurkink, B., Eikelboom, D., Lemaitre, M., Tandoi, V. (2001). Phylogenetic analysis and in situ identification of *Nostocoida limicola*-like filamentous bacteria in activated sludge from industrial wastewater treatment plants. *Proceedings 3. IWA Int. Spec. Conf. "Microorganisms in activated sludge and biofilm processes"*, Rom, 13.-15. Juni 2001 61-67
- Strunk, O., Ludwig, W. (1997). ARB software package; <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB>
- Tandoi, V., Rossetti, S., Blackall, L.L., Majone, M. (1998). Some physiological properties of an italian isolate of "*Microthrix parvicella*". *Wat. Sci. Tech.* 37, 1-8
- Thomsen, T.R., Kjellerup, B.V., Nielsen, J.L., Nielsen, P.H. (2001). In situ studies of physiology and phylogeny of Eikelbooms type 0041 in activated sludge. *Proceedings 3. IWA Int. Spec. Conf. "Microorganisms in activated sludge and biofilm processes"*, Rom, 13.-15. Juni 2001, CD212.pdf
- Trick, I. (1982). Untersuchungen an fadenförmigen Bakterien aus Blähschlamm. Dissertation Universität Hohenheim
- VanVeen, W.L. (1973). Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 39, 189-205
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K.-H. (1994a). Development of an rRNA-targeted oligonucleotide probe specific for the genus *Acinetobacter* and its application for in situ monitoring in activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 792-800
- Wagner, M., Amann, R., Kämpfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N., Schleifer, K.-H. (1994b). Identification and *in situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 17, 405-417
- Williams, T.M., Unz, R.F. (1985). Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 273-282
- Zhang, Y., Miller, R.M. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3276-3282
- Zhang, Y., Miller, R.M. (1994). Effect of a *Pseudomonas* rhamnolipid biosurfactant on cell hydrophobicity and biodegradation of octadecan. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 2101-2106

# Anhang



## Anhang

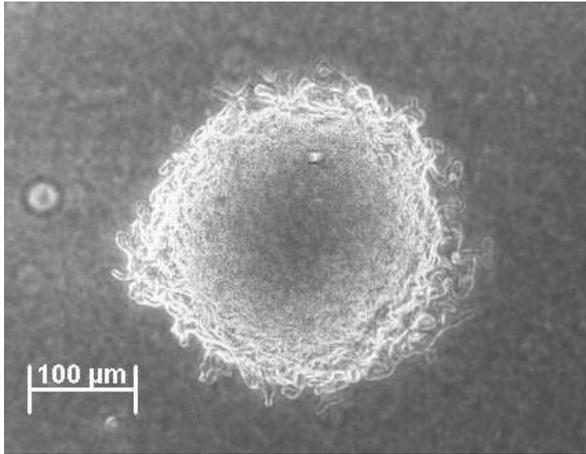


Foto C.1: Kolonie des "*Nostocoida limicola*" Isolats AHW4 (HA-Medium; Umkehrmikroskopie; 100 x)

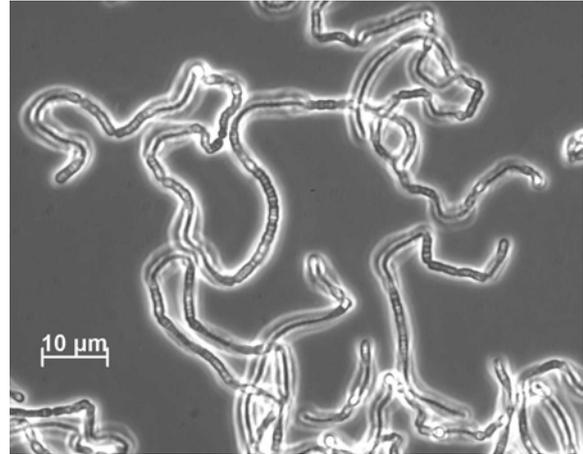


Foto C.2: "*Nostocoida limicola*" Filament AHW4 (HA-Medium; Phasenkontrast-mikroskopie; 1000 x)



Foto C.3: Gram positiv gefärbtes "*N. limicola*"-Filament (Hellfeld; 1000 x)



Foto C.4: Negative Gramreaktion bzw. positiv gefärbte Zellgrenzen in "*N. limicola*"-Filamenten (Hellfeld; 1000 x)



Foto C.5: Negative Neisserfärbung des "*N. limicola*"-Filaments (Hellfeld; 1000 x)



Foto C.6: "*N. limicola*"-Filament mit positiven Neissergranula (Hellfeld; 1000 x)

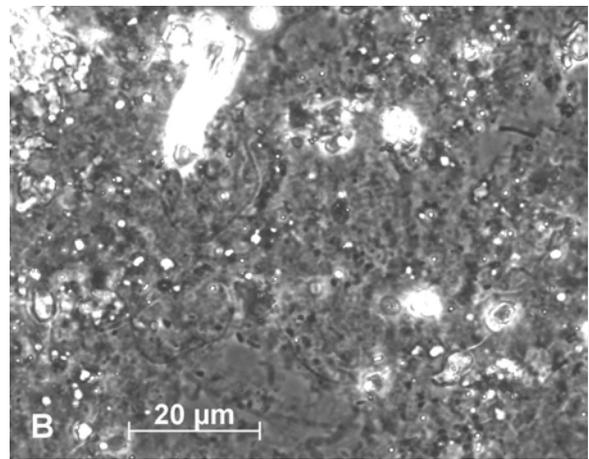
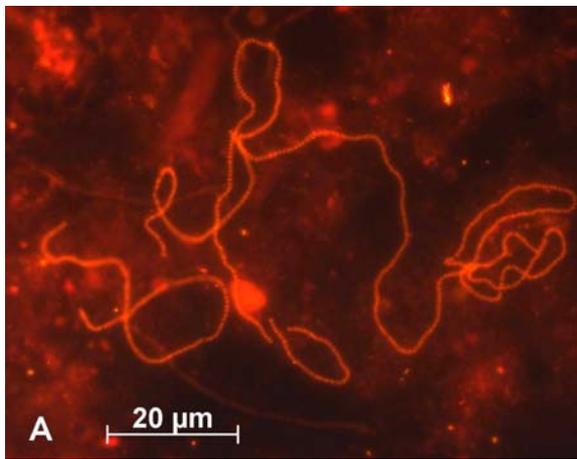


Foto C.7: *In situ* Identifizierung eines "*Nostocoida limicola*"-Filaments im Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage.

- (A) *In situ* Hybridisierung mit der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde AHW183 (Epifluoreszenzmikroskopie; 1000 x).
- (B) Phasenkontrastmikroskopie; 1000 x

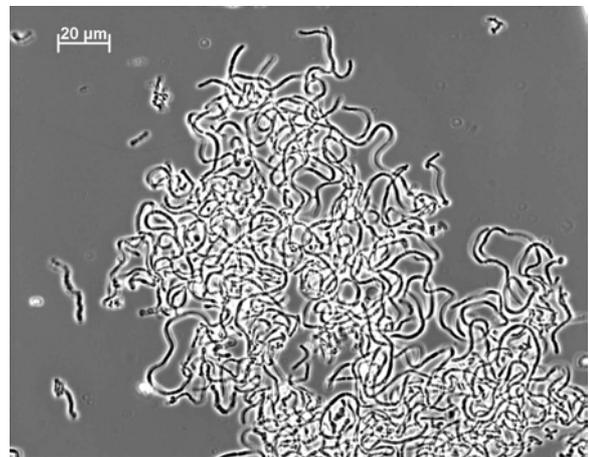
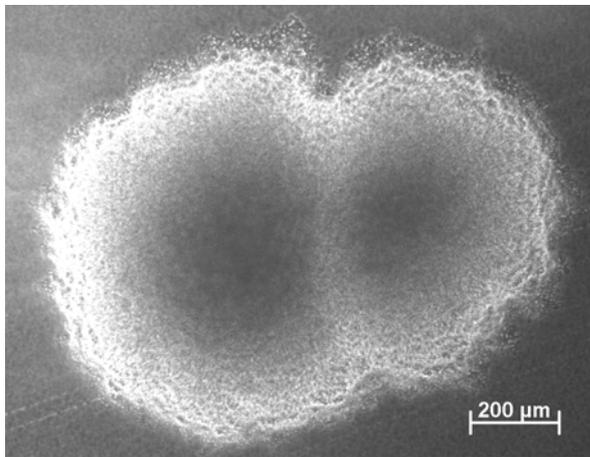


Foto C.8: Kolonie des "*Nostocoida limicola*" Isolats AN 31 (HA-Medium; Umkehrmikroskopie; 100 x)

Foto C.9: "*Nostocoida limicola*" Filament AN 31 (HA-Medium; Phasenkontrastmikroskopie; 400 x)

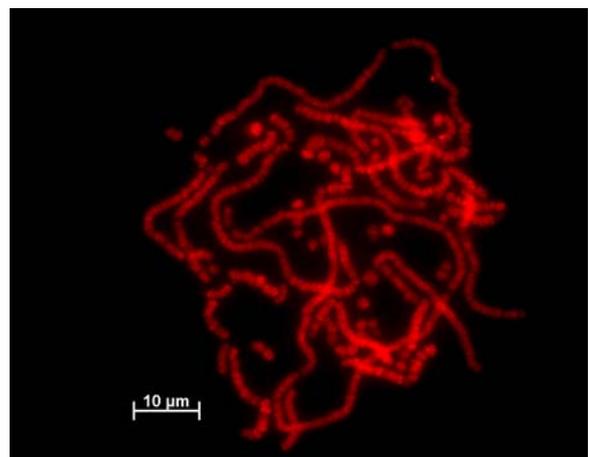
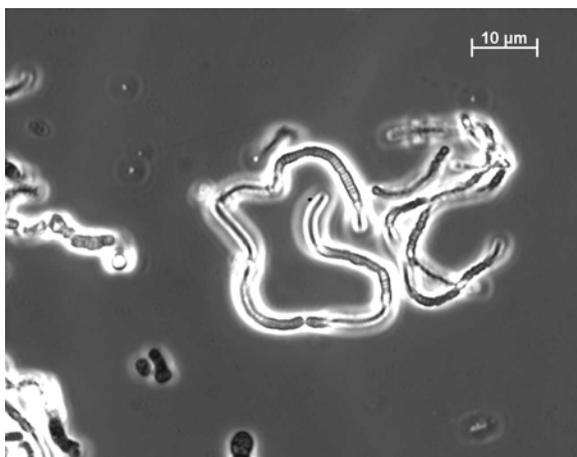


Foto C.10: "*Nostocoida limicola*" Filament AN 31 (HA-Medium; Phasenkontrastmikroskopie; 1000 x)

Foto C.11: "*Nostocoida limicola*"-Reinkultur AN31 nach *in situ* Hybridisierung mit der Cy3-markierten Sonde NLI256 (Epifluoreszenzmikroskopie; 1000 x)

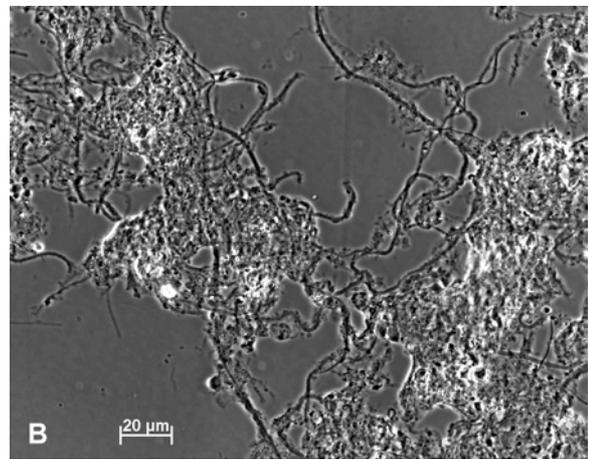
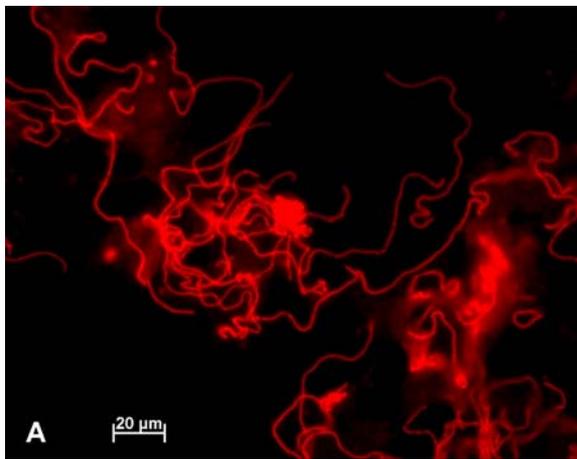


Foto C.12: *In situ* Identifizierung von "*Nostocoida limicola*" Filamenten im Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage.

- (A) *In situ* Hybridisierung mit der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde NLI256 (Epifluoreszenzmikroskopie; 1000 x).  
 (B) Phasenkontrastmikroskopie; 1000 x

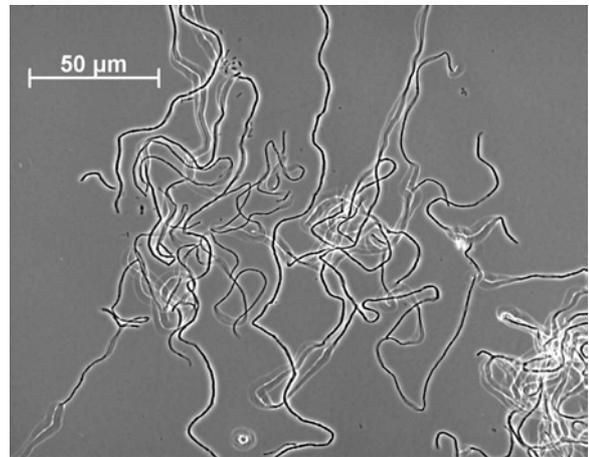
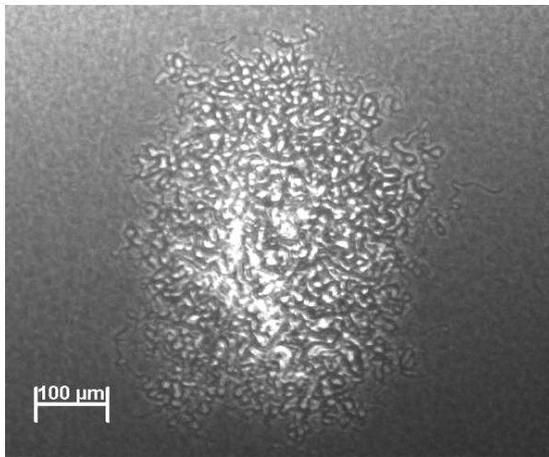


Foto C.13: Kolonie eines "*Microthrix parvicella*" Isolats (R2A-Medium; Umkehrmikroskopie; 100 x)

Foto C.14: "*Microthrix parvicella*" Filament MM1 (R2A-Medium; Phasenkontrastmikroskopie; 400 x)

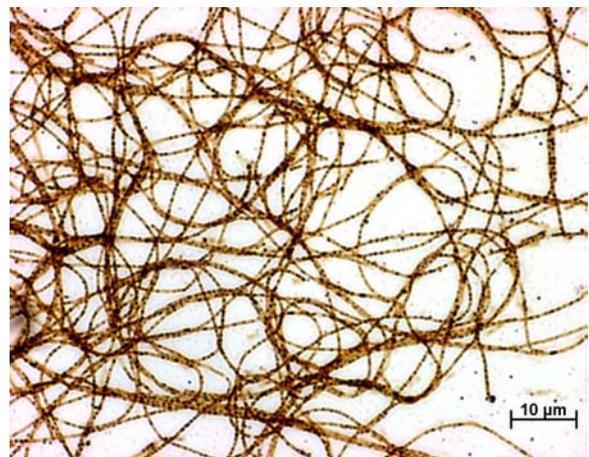
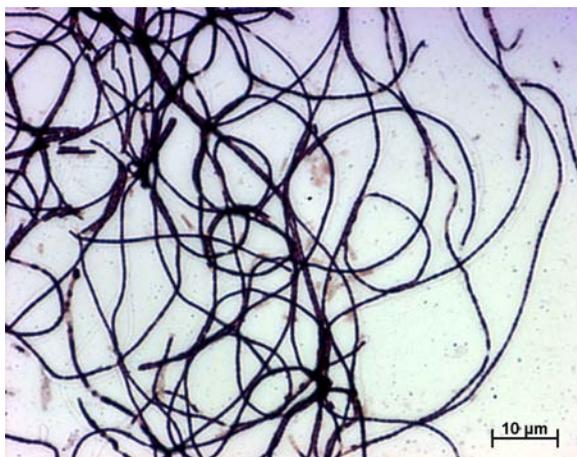


Foto C.15: Gram positiv gefärbtes "*Microthrix parvicella*"-Filament STA6 (Hellfeld; 1000 x)

Foto C.16: "*Microthrix parvicella*"-Filament STA6 mit positiven Neissergranula (Hellfeld; 1000 x)

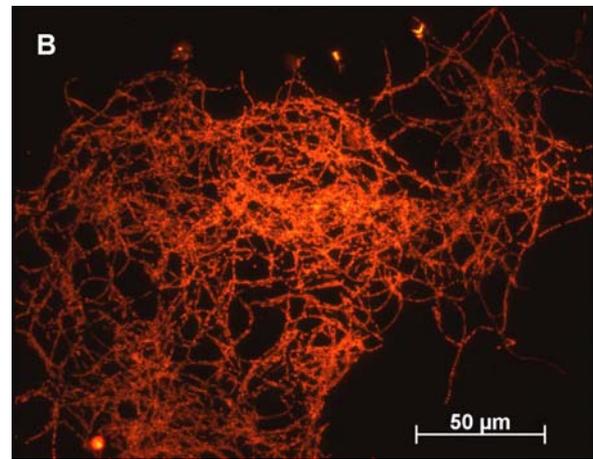
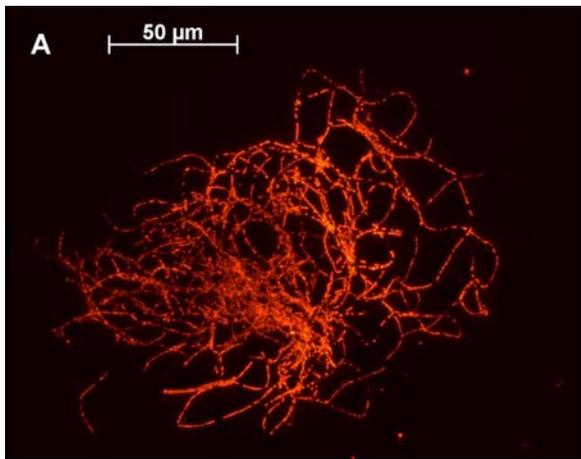


Foto C.17: *In situ* Hybridisierung der "*Microthrix parvicella*"-Reinkultur STA8.  
 (A) mit den Cy3-markierten "*Microthrix parvicella*"-Sonden MPA60, MPA223, MPA645 und MPA650  
 (B) mit der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde HGC1156  
 (Epifluoreszenzmikroskopie; 1000 x)

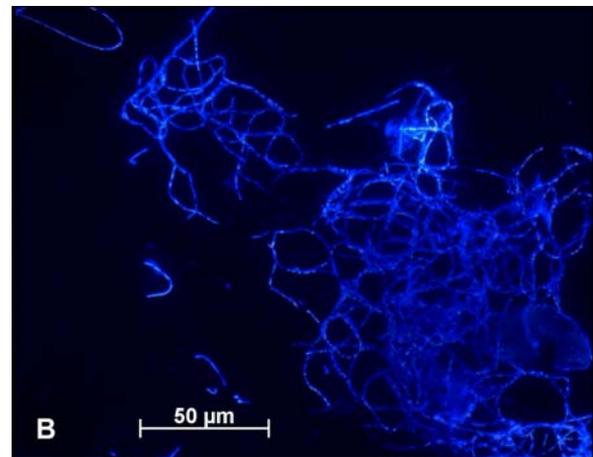
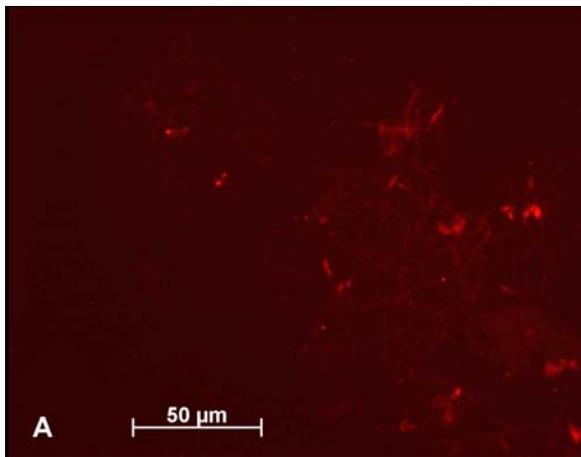


Foto C.18: "*Microthrix parvicella*"-Reinkultur STA8.  
 (A) *In situ* Hybridisierung mit der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde HGC69a  
 (B) DAPI-Färbung (Epifluoreszenzmikroskopie; 1000 x)

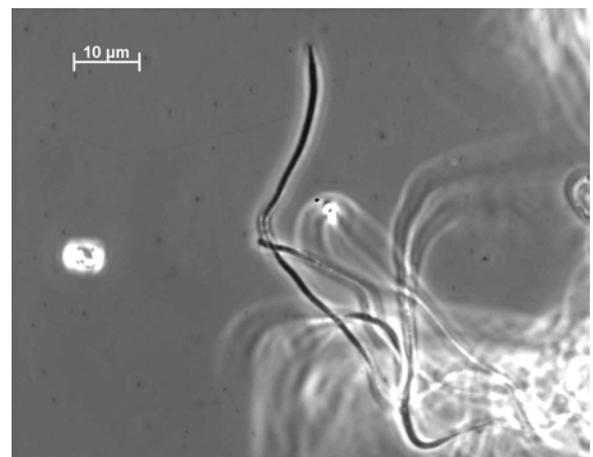
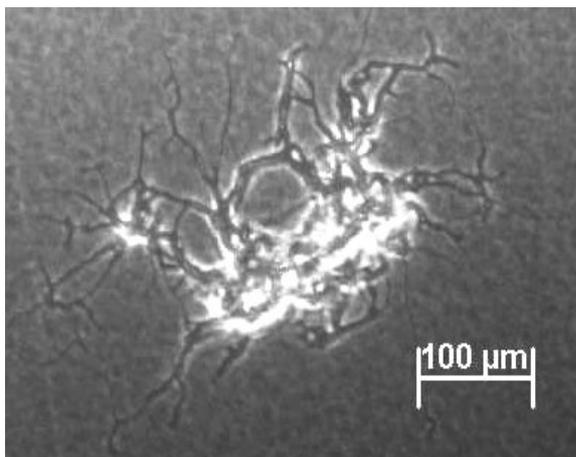


Foto C.19: Kolonie des fadenförmigen Bakteriums Typ 0092 (R2A-Medium; Umkehrmikroskopie; 100 x)

Foto C.20: Filament von Typ 0092 (R2A-Medium; Phasenkontrastmikroskopie; 1000 x)



Foto C.21: Gram negativ gefärbtes Typ 0092-Filament (Hellfeld; 1000 x)



Foto C.22: Positive Neisserfärbung eines Typ 0092-Filaments (Hellfeld; 1000 x)

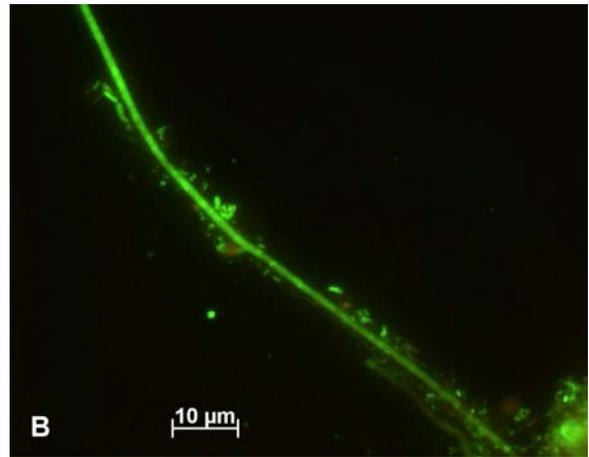
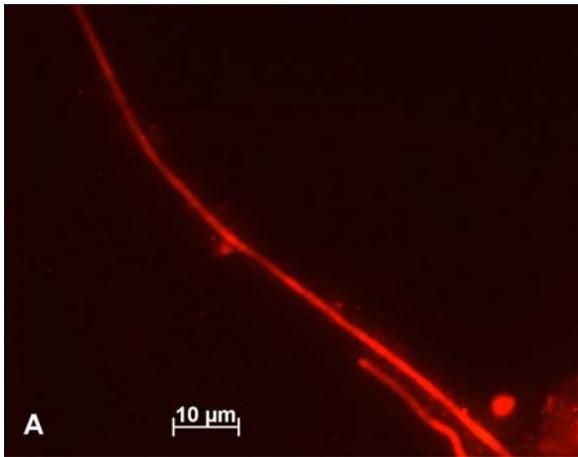


Foto C.23 *In situ* Identifizierung eines 0041-Filaments im Belebtschlamm einer kommunalen Kläranlage.

- (A) *In situ* Hybridisierung mit der Cy3-markierten Oligonukleotidsonde TM7905 (Epifluoreszenzmikroskopie; 1000 x)
- (B) *In situ* Hybridisierung mit der Fluos-markierten Oligonukleotidsonde EUB338 (Epifluoreszenzmikroskopie; 1000 x)

