

Lehrstuhl für Mikrobiologie
der Technischen Universität München

**Physiologische Untersuchungen mit in situ Enzymaktivitäten
fadenbildender Bakterien in Kläranlagen mit Schaumproblemen**

Margit Schade

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München
zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Wolfgang Höll

Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer
2. Univ.-Prof. Dr. Harald Horn

Die Dissertation wurde am 04.12.2006 bei der Technischen Universität München eingereicht
und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung
und Umwelt am 22.01.2007 angenommen.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Karl-Heinz Schleifer, Lehrstuhl für Mikrobiologie der Technischen Universität München, und Herrn Prof. Dr. Harald Horn, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München, möchte ich herzlich für die Übernahme des Erst- bzw. Zweitgutachtens für diese Arbeit danken.

Mein besonderer Dank gilt Frau Dr. Hilde Lemmer, Bayerisches Landesamt für Umwelt, für ihre kompetente fachliche Betreuung, ihre zahlreichen Anregungen, ihre stete Bereitschaft, meine Probleme zu diskutieren und ihre immer wieder notwendige moralische Unterstützung.

Bei Herrn Dr. Wolfgang Popp, Bayerisches Landesamt für Umwelt, möchte ich mich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes bedanken.

Monika Hanf vom Bayerischen Landesamt für Umwelt und Astrid Eschweiler sei herzlich für die Vielzahl an kleinen und großen Hilfen im Labor gedankt.

Vielen Dank an Frau Dipl.Biol. Stefanie Huber, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, für die kritische Durchsicht des Manuskripts. Frau Dr. Lisa Müller, Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft der Technischen Universität München, danke ich für die zahlreichen anregenden fachlichen Diskussionen.

An dieser Stelle möchte ich mich auch bei Herrn Huber und Herrn Leppert vom Bayerischen Landesamt für Umwelt bedanken, die mich bei der Beschaffung des Probenmaterials nie im Stich ließen.

Ein herzliches Dankeschön gilt natürlich der gesamten Crew der Arbeitsgruppe Mikrobiologie des Bayerischen Landesamts für Umwelt für die Hilfsbereitschaft in einer stets freundschaftlichen Arbeitsatmosphäre.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Familie und meinen Freunden bedanken, die mir in jeder Hinsicht Halt und Stütze boten und immer Verständnis zeigten, auch wenn ich sie in letzter Zeit ein wenig vernachlässigt habe!

INHALTSVERZEICHNIS

A	EINLEITUNG	1
B	MATERIAL UND METHODEN	11
1	Kläranlagen-Auswahl	11
2	Analyse der Bakteriengemeinschaften in den ausgewählten Kläranlagen	12
2.1	Mikroskopische Schlammanalyse	12
2.2	Färbetechniken	12
2.2.1	Gramfärbung	12
2.2.2	Neisserfärbung	13
2.3	Fluoreszenz in situ Hybridisierung	13
2.3.1	Chemikalien und Lösungen	13
2.3.2	Fixierung der Proben	15
2.3.3	In situ Einzelzellhybridisierung	15
2.3.4	Verwendete Oligonukleotidsonden	17
2.3.5	Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen	18
3	Enzymaktivitätsmessungen in Belebtschlämmen und Schäumen	18
3.1	Bestimmung von in vitro Gesamtenzymaktivitäten	18
3.1.1	Chemikalien und Lösungen	18
3.1.2	Protease-Aktivität	19
3.1.3	Lipase-Aktivität	20
3.1.4	β -Glucuronidase-Aktivität	21
3.1.5	Trockenrückstand und Glühverlust	21
3.2	Bestimmung von in situ Enzymaktivitäten (ELF; enzyme labeled fluorescence)	21
3.2.1	Substrate zur Aktivitätsbestimmung	22
3.2.2	Versuchsdurchführung	23
3.2.3	Zuordnung von in situ Enzymaktivitäten zu Organismen	23
3.2.4	Auswahl fadenbildender Organismen	24
3.3	Monitoring der Lipase-Aktivität von <i>Microthrix parvicella</i> während Bekämpfungsmaßnahmen	24
4	Isolierung und Charakterisierung fadenbildender Bakterien aus Kläranlagen mit Schaumproblemen	26
4.1	Lösungen und Selektivmedien	26

4.2	Vorbehandlung der Proben.....	27
4.3	Isolierungsmethoden	27
4.4	Stammhaltung.....	29
4.5	Charakterisierung der isolierten fadenbildenden Reinkulturen	29
4.5.1	Klassische Florenanalyse	29
4.5.2	Nachweis mittels rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonden	29
4.5.3	Sequenzanalyse der 16S rDNS.....	29
5	Physiologische Untersuchungen an den isolierten fadenbildenden Reinkulturen ...	30
5.1	Wachstum in komplexen und minimalen Nährmedien	30
5.2	Wachstum nach Zugabe von Rhamnolipiden.....	32
5.2.1	Nährmedien	32
5.2.2	Rhamnolipid-Produktion durch <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 9027.....	33
5.2.3	Rhamnolipid-Extraktion.....	33
5.2.4	Bestimmung der Rhamnolipid-Konzentration über L-Rhamnose	33
5.2.5	Wachstumsuntersuchungen.....	33
C	ERGEBNISSE	35
1	In vitro und in situ Enzymaktivitäten in ausgewählten Kläranlagen mit Schaumproblemen.....	35
1.1	Bakterienpopulationen in den Kläranlagen KA-M, KA-GR und KA-BT	35
1.1.1	Zweistufige kommunale Kläranlage KA-M mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten.....	35
1.1.2	Einstufige kommunale Kläranlage KA-GR mit Dominanz von <i>Microthrix parvicella</i>	40
1.1.3	Einstufige kommunale Kläranlage KA-BT mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten und <i>Microthrix parvicella</i>	42
1.2	In vitro Gesamtzymaktivitäten	45
1.2.1	Protease-Aktivität.....	45
1.2.1.1	Zweistufige kommunale Kläranlage KA-M mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten.....	45
1.2.1.2	Einstufige kommunale Kläranlage KA-GR mit Dominanz von <i>Microthrix parvicella</i>	47
1.2.1.3	Einstufige kommunale Kläranlage KA-BT mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten und <i>Microthrix parvicella</i>	47
1.2.2	Lipase-Aktivität.....	48
1.2.2.1	Vergleich verschiedener Lipase-Substrate	48
1.2.2.2	Zweistufige kommunale Kläranlage KA-M mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten.....	49

1.2.2.3	Einstufige kommunale Kläranlage KA-GR mit Dominanz von <i>Microthrix parvicella</i>	50
1.2.2.4	Einstufige kommunale Kläranlage KA-BT mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten und <i>Microthrix parvicella</i>	52
1.2.3	β -Glucuronidase-Aktivität	53
1.2.3.1	Zweistufige kommunale Kläranlage KA-M mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten.....	53
1.2.3.2	Einstufige kommunale Kläranlage KA-GR mit Dominanz von <i>Microthrix parvicella</i>	54
1.2.3.3	Einstufige kommunale Kläranlage KA-BT mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten und <i>Microthrix parvicella</i>	55
1.3	In situ Enzymaktivitäten (ELF; enzyme labeled fluorescence)	55
1.3.1	In situ Enzymaktivitäten in ausgewählten Kläranlagen	55
1.3.2	Vergleich von Gesamt- und in situ Enzymaktivitätsbestimmungen	56
1.3.2.1	Lipase-Aktivität.....	56
1.3.2.2	β -Glucuronidase-Aktivität	56
1.3.3	In situ Enzymaktivitäten ausgewählter fadenbildender Organismen	58
1.3.3.1	<i>Microthrix parvicella</i>	59
1.3.3.2	Nocardioforme Actinomyceten	60
1.3.3.3	Morphotyp <i>Nostocoida limicola</i>	61
1.3.3.4	Morphotyp 0041/0675.....	62
1.3.3.5	Morphotyp 1851.....	63
1.3.3.6	Morphotyp 0092.....	64
1.3.3.7	<i>Isosphaera</i> spp.....	64
1.3.3.8	Sonstige fadenbildende Bakterien.....	65
1.4	Anwendungsmöglichkeit in der Praxis: Monitoring der Lipase-Aktivität von <i>Microthrix parvicella</i> während Bekämpfungsmaßnahmen.....	66
2	Physiologische Untersuchungen an fadenbildenden <i>Microthrix parvicella</i>- und <i>Nostocoida limicola</i>-Reinkulturen.....	67
2.1	<i>Microthrix parvicella</i>-Reinkulturen	67
2.1.1	Morphologische Charakterisierung.....	67
2.1.2	Phylogenetische Charakterisierung.....	68
2.1.3	Physiologische Untersuchungen	68
2.2	<i>Nostocoida limicola</i>-Reinkulturen aus dem <i>Chloroflexi</i>-Phylum	71
2.2.1	Morphologische Charakterisierung.....	71
2.2.2	Phylogenetische Charakterisierung.....	71
2.2.3	Physiologische Untersuchungen	71
2.3	<i>Nostocoida limicola</i>-Reinkulturen aus der Klasse der <i>Actinobacteria</i>	73
2.3.1	Morphologische Charakterisierung.....	73
2.3.2	Phylogenetische Charakterisierung.....	73
2.3.3	Physiologische Untersuchungen	74

D	DISKUSSION	79
1	Vergleich der Biozöosen ausgewählter Kläranlagen mit Schaumproblemen mittels klassischer Mikroskopie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)	79
2	Enzymaktivitäten in ausgewählten Kläranlagen mit Schaumproblemen.....	81
2.1	Gesamtenzymaktivitäten von Protease, Lipase und β -Glucuronidase.....	81
2.2	In situ Enzymaktivitäten von Phosphatase, Esterase, Lipase und β -Glucuronidase	86
2.3	Vergleich der klassischen Messung der enzymatischen Gesamtaktivität mit in situ Enzymaktivitätsbestimmungen	87
2.4	Anwendungsmöglichkeit in der Praxis: Monitoring der Lipase-Aktivität von <i>Microthrix parvicella</i> während Bekämpfungsmaßnahmen.....	87
3	Physiologie fadenbildender Schaumbakterien in vitro und in situ.....	89
4	Fazit und Ausblick	97
E	ZUSAMMENFASSUNG	101
F	LITERATURVERZEICHNIS	104
G	ANHANG	116
1	rRNS-gerichtete Oligonukleotidsonden	116
2	Abkürzungen	117
H	PUBLIKATIONSLISTE	119

A Einleitung

Das zu Beginn des 20. Jahrhunderts eingeführte Belebungsverfahren ist bis heute die am weitesten verbreitete Form der Abwasserreinigung (Miksch und Fingerhut 1990) und stellt damit einen der wichtigsten biotechnologischen Prozesse dar. Man macht sich dabei die Abbauleistungen verschiedenster Organismen zunutze, die die organischen Abwasserinhaltsstoffe mehr oder weniger vollständig abbauen. Durch aerobe Oxidation des organischen Materials im belüfteten Belebungsbecken werden diese Substanzen im günstigsten Fall in Kohlendioxid, Ammonium und Wasser überführt. Mit dem Wachstum der daran beteiligten Organismen kommt es zur Bildung neuer Zellbiomasse, dem sog. Belebtschlamm, die anschließend vom gereinigten Abwasser abgetrennt wird. Diese Separation erfolgt meist durch Absetzen des belebten Schlammes im Nachklärbecken.

Bei der Abtrennung der Belebtschlammflocken vom gereinigten Abwasser kann es immer wieder zu Absetzschwierigkeiten, wie Blähschlamm- und Schwimmschlamm- bzw. Schaumbildung, kommen. Seit langem ist bekannt, dass bei diesen Schlammabsetzproblemen in großer Häufigkeit Bakterien auftreten, die zum Wachstum als Fäden imstande sind (Smit 1934). Im Falle von Blähschlamm behindern die aus den Belebtschlammflocken herausragenden fadenförmigen Organismen ein rasches Absinken des belebten Schlammes im Nachklärbecken, der voluminös in der Wassersäule bleibt und im schlimmsten Fall in den Ablauf abtreiben kann. Dadurch werden zum einen die Ablaufwerte durch den hohen Anteil an suspendierten Stoffen verschlechtert und darüber hinaus die Abbauleistung der Kläranlage beeinträchtigt, da die Rückführung des Schlammes nicht mehr gewährleistet ist. Definitionsgemäß spricht man von Blähschlamm, wenn der Schlammvolumenindex ISV größer als 150 ml/g ist (Sarfert et al. 1988). Von Schaum bzw. Schwimmschlamm spricht man, wenn ein Teil des Belebtschlammes auf der Wasseroberfläche schwimmt und dort eine mehr oder weniger kompakte Schlammdecke bildet. Dieses Phänomen kann sowohl im Belebungs- als auch im Nachklärbecken auftreten und ebenfalls zu einem Schlammabtrieb in den Vorfluter mit den oben beschriebenen Problemen führen. Der Faulturn kann ebenfalls von Schaumbildung betroffen sein, wenn beispielsweise schäumender Überschussschlamm zur Ausfäulung in den Faulbehälter eingetragen wird. Gemäß einer Definition von Kunst et al. (2000) spricht man von Schaum, wenn „das vermehrte Wachstum von Schwimmschlammbildnern noch nicht manifest“ ist. So kann Schaum sowohl den Beginn eines Schwimmschlammproblems anzeigen als auch ein eigenständiges Phänomen sein.

Zu einer stabilen Schaumbildung kommt es, wenn drei Faktoren zusammenwirken, nämlich feinverteilte Gasbläschen, hydrophobes Material sowie oberflächenaktive Substanzen (Soddell und Seviour 1990). Gasbläschen sind im System vorhanden als Luft und Sauerstoff im Belebungsbecken, gasförmige Stickstoffkomponenten in der Denitrifikationszone sowie Methan und Kohlendioxid im Faulturn. Nach der Bildung gasgefüllter Mizellen müssen die Grenzflächen durch Anlagerung hydrophober und oberflächenaktiver Substanzen stabilisiert werden, da diese sonst sofort zusammenfallen würden. Hydrophobe Substanzen gelangen über das Abwasser in Form von Fetten oder aliphatischen Kohlenwasserstoffen in die Anlage. Aber auch fadenförmige und nichtfädige Organismen mit einer stark hydrophoben Zelloberfläche können zu einer Stabilisierung der Schaumschicht beitragen. Oberflächenaktive Substanzen, wie Fette, Öle und Tenside, werden ebenfalls mit dem Zulauf in die Anlage eingetragen. Daneben können auch die Organismen selbst oberflächenaktive Substanzen, sog. Bioten-

side, produzieren. Dies ist insbesondere unter Mangelbedingungen, wie niedrigen Konzentrationen an Kohlenstoffsubstrat oder Sauerstoffmangel, der Fall.

Zu Beginn der Anwendung des Belebungsverfahrens war die einzige Anforderung an die Abwasserreinigung der Abbau der Kohlenstoffverbindungen, d.h. eine Erniedrigung des BSB₅-Gehalts. Daher wurden die Anlagen unter Hochlastbedingungen in einem Schlammbelebungsgebiet von über 0,3 kg BSB₅/(kg TS · d) betrieben, mit einem Schlammalter zwischen 0,5 und 5 Tagen. Unter diesen Bedingungen war die Konzentration an gelösten organischen Substanzen in der Wasserphase sehr hoch und begünstigte das Wachstum von Organismen, die auf den Abbau gelöster Substrate spezialisiert waren. Durch das niedrige Schlammalter von nur wenigen Tagen konnten sich nur Organismen mit hohen Wachstumsraten im System etablieren. In diesen Anlagen wurden häufig Blähschlammereignisse beobachtet, die mit einem massenhaften Wachstum fadenbildender Organismen verbunden waren. Typische Vertreter dieser sog. „Hochlast-Fadenbakterien“ sind *Sphaerotilus* spp., *Haliscomenobacter hydrossis*, Typ 1701 oder Schwefelbakterien, wie *Thiothrix* spp., Typ 021N und Typ 0914. Diese Organismen wurden schon früh mikrobiologisch charakterisiert, da sie mit klassischen Kultivierungsmethoden relativ leicht zu erfassen waren und auf festen Nährmedien isoliert und weitergezüchtet werden konnten. Sie konnten daher eingehend in Reinkultur untersucht und physiologisch hinsichtlich ihrer Nährstoffansprüche charakterisiert werden. Auch wachstumskinetisch sind sie, was ihre Wachstumsgeschwindigkeit und Substrataufnahmeraten betrifft, sehr genau beschrieben. So wurden bei Wachstum mit löslichen Substraten wie Glucose für *Sphaerotilus natans* Wachstumsraten im Bereich von 0,13/h bis 0,18/h (Lau et al. 1984a; Lau et al. 1984b), für Typ 021N im Bereich von 0,05/h bis 0,16/h (van Nierkerk et al. 1987) bestimmt. Dadurch konnten für diese Organismen auch gezielte Bekämpfungsmaßnahmen beschrieben werden (Chudoba et al. 1973a; Chudoba et al. 1973b; Casey et al. 1992; Lemmer und Lind 2000). Es zeigte sich, dass ein stark verschobenes Nährstoffverhältnis mit einem Überschuss an Kohlenstoffquellen und entsprechendem Stickstoff- und/oder Phosphormangel einen wichtigen Selektionsfaktor für diese Organismen darstellt, ebenso wie ein ungenügender Sauerstoffeintrag in Phasen hoher Belastung (Sarfert et al. 1988). Daher kann ein Ausgleich eines einseitigen Nährstoffangebots der Parameter BSB₅:N:P auf ein Verhältnis 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 beseitigen. Des Weiteren ergaben die Untersuchungen an Reinkulturen, dass diese fadenbildenden Organismen sehr effektiv gelöstes Substrat aus der Wasserphase aufnehmen können, weshalb sie in Systemen mit gleichmäßiger Substratverteilung im Reaktor, wie es in volldurchmischten Becken der Fall ist, entscheidende Konkurrenzvorteile haben. Daraus ergab sich als äußerst effektive Bekämpfungsmaßnahme die Einrichtung eines Substratgradienten, was sich beispielsweise durch Einbau eines aeroben Selektors, d.h. einer hochbelasteten Vorzone, bewerkstelligen lässt (Kroiß et al. 1997; Prendl 1997; Lemmer et al. 1998).

Mit den gestiegenen Anforderungen an den Gewässerschutz und der damit verbundenen Verschärfung der gesetzlichen Ablaufgrenzwerte für Kläranlagen haben sich auch die Anforderungen an die Abwasserreinigung geändert. So ist neben dem Abbau der Kohlenstoffverbindungen auch die Entfernung der Nährstoffe Stickstoff und Phosphor gefordert, um Eutrophierungsprobleme in Gewässern, wie beispielsweise eine massenhafte Algenentwicklung, zu verhindern. Die Rahmen-Abwasserverwaltungsvorschrift vom 1.1.1990 sieht einen Grenzwert für Ammoniumstickstoff von 10 mg/l für Kläranlagen mit mehr als 5 000 Einwohnerwerten

(EW) und eine Begrenzung des Gesamtposphat-Gehalts auf 2 mg/l für Kläranlagen von 20 000 bis 100 000 EW bzw. auf 1 mg/l für Anlagen mit mehr als 100 000 EW vor. Daher ist eine weitergehende Abwasserreinigung erforderlich. Zur Elimination der Stickstoffverbindungen wird das durch Ammonifikation gebildete Ammonium im Nitrifikationsprozess zu Nitrat oxidiert. Um eine stabile Nitrifikation zu gewährleisten, musste daher die Schlammbelastung heruntergefahren werden auf Werte unterhalb von 0,15 kg BSB₅/(kg TS · d) mit einem hohen Schlammalter von über 20 Tagen, damit nitrifizierende Bakterien mit ihren langen Generationszeiten im System erhalten bleiben. Im Denitrifikationsprozess wird Nitrat schrittweise über Nitrit und Stickstoffoxid zu gasförmigem Stickstoff reduziert. Für diesen Prozess sind anoxische Bedingungen erforderlich. Die Elimination von Phosphor findet größtenteils auf chemischem Weg durch Fällung mit Metallsalzen (Fe, Al) statt. Aufgrund verschiedener Nachteile der chemischen Fällung, wie beispielsweise der Aufsalzung der Vorfluter durch die Anionen der Metallsalze oder steigende Betriebskosten durch den Chemikalieneinsatz, wird in den Kläranlagen heutzutage verstärkt eine biologische Phosphorentfernung angewandt („enhanced biological phosphorus removal (EBPR)“). Anlagen mit biologischer Phosphorentfernung bedienen sich dabei verschiedener anaerob-aerober Belebtschlammverfahren (Levin und Shapiro 1965). Durch einen Wechsel von aeroben und anaeroben Bedingungen kommt es zu einer Anreicherung von Bakterien, die nach einer Stressphase im Anaeroben im Aeroben mehr Phosphor aufnehmen, als sie für ihr Wachstum benötigen, und den sie dann in den Zellen als Polyphosphat speichern (Appeldoorn et al. 1992). Somit wird Phosphor im Belebtschlamm aufkonzentriert und durch Abzug des Überschussschlammes im aeroben Bereich aus dem System entfernt. Die niedrige Schlammbelastung sowie die anoxischen und anaeroben Zonen für die Denitrifikation bzw. biologische Phosphorelimination bedeuten für die Bakterien des Belebtschlammes Stressbedingungen. Zum einen steht durch die niedrige Belastung gelöstes Substrat in der Wasserphase praktisch nicht mehr zur Verfügung, zum anderen herrscht für aerobe Bakterien in anoxischen und anaeroben Zonen Stress wegen Sauerstoffmangels. Der Mangel an gelöstem Substrat in der Wasserphase bedeutet, dass die Bakterien in den heutigen Anlagen dort praktisch keine Nahrung mehr finden und entweder auf partikuläres Substrat angewiesen sind oder auf solches, das an Grenzflächen adsorbiert, wie z.B. an die Oberfläche der Belebtschlammflocken. Daher spielen heutzutage Adsorptionsprozesse sowie die Hydrolyse von partikulärem Substrat für die Nährstoffversorgung eine wesentlich größere Rolle als früher. Verschiedene Untersuchungen zeigten, dass Bakterien auf Stress durch Substratmangel häufig mit der Bildung oberflächenaktiver Substanzen reagieren, um die Verfügbarkeit bestimmter Kohlenstoffquellen zu verbessern (Käppeli und Finnerty 1979; Ito und Inoue 1982; Oberbremer et al. 1990; Zhang und Miller 1992). Al-Tahhan et al. (2000) beschreiben, dass dabei zwei Mechanismen wirksam sind, die den Abbau schlecht löslicher Substanzen erhöhen. Zum einen können Biotenside hydrophobe Substanzen in Mizellenstrukturen lösen, was die Löslichkeit dieser Verbindungen im wässrigen Milieu und damit deren Verfügbarkeit für die Zellen erhöht. Zum anderen bewirken Biotenside, dass die Oberfläche der Bakterienzellen hydrophober wird, wodurch der Kontakt zwischen der Zelle und dem Substrat verbessert wird. Sowohl die Hydrophobierung der Zelloberfläche als auch die Bildung oberflächenaktiver Substanzen tragen, wie bereits oben beschrieben, zur Bildung grenzflächen-stabilisierter Gasbläschen und damit Schaumbildung bei. Daher ist man heute im kommunalen Bereich meist nicht mehr mit Blähschlammereignissen, sondern mit Schaumbildung konfrontiert. Hieran sind sowohl Einzelbakterien als auch fadenbildende Organismen beteiligt (Lemmer et al. 2000).

Letztere können mit Hilfe der klassischen Lichtmikroskopie identifiziert werden (Eikelboom 2000). Dabei zeigte sich, dass vor allem sechs Gruppen fadenbildender Bakterien eine wichtige Rolle spielen. Untersuchungen von Müller (2006) in deutschen Kläranlagen ergaben, dass *Microthrix parvicella* in 50% der Anlagen, nocardioforme Actinomyceten in 18% und Actinomyceten-ähnliche Organismen in 5% der Anlagen mit Schaumproblemen dominierten. Erhebungen aus anderen Ländern zeigen ebenfalls, dass *M. parvicella* der weltweit am häufigsten in Zusammenhang mit Schaumereignissen beobachtete fadenbildende Organismus ist und sowohl im Belebtschlamm als auch in der Schaumfraktion in großer Häufigkeit zu finden ist (Seviour et al. 1990; Pujol et al. 1991; Duchene 1994; Eikelboom 1994; Dillner Westlund et al. 1996; Lind und Lemmer 1998; Wanner et al. 1998; Madoni et al. 2000; Krhutková et al. 2005). Auch nocardioforme Actinomyceten spielen weltweit eine wichtige Rolle und sind meist in der flotierten Schlammfraktion angereichert. Vor allem in den USA und in Teilen Australiens dominieren nocardioforme Actinomyceten in der Mehrzahl der Anlagen mit Schaumproblemen (Seviour et al. 1990; Blackall et al. 1991; Pitt und Jenkins 1990; de los Reyes et al. 2002). *Nostocoida limicola* sowie die nach Eikelboom (1975) zunächst nur mit Typnummern versehenen Bakterien Typ 0041/0675, Typ 1851 und Typ 0092 wurden dagegen seltener in Anlagen mit Schaumproblemen gefunden. In deutschen Kläranlagen dominierten diese Organismen die Biozönose nur in weniger als 11% der Anlagen. Sie kamen zwar regelmäßig, aber meist nur untergeordnet vor (Müller 2006). Typ 0092 erwies sich in südafrikanischen Kläranlagen neben *M. parvicella* als häufigster Organismus (Blackbeard et al. 1986).

Diese sog. „Niedriglast-Fadenbakterien“ gehören meist zur Gruppe der grampositiven Bakterien. Da sich diese Organismen aufgrund ihrer Zellwandeigenschaften besonders leicht hydrophob gestalten, können sie in den heutigen nährstoffeliminierenden Anlagen besser konkurrieren. Für eine erfolgreiche Bekämpfung dieser fadenbildenden Organismen ist eine Charakterisierung ihrer physiologischen Eigenschaften erforderlich. Durch Kenntnis ihrer bevorzugten Nährstoff- und Milieuansprüche können Bedingungen in Kläranlagen vermieden werden, die das Wachstum dieser Organismen fördern, sodass gezielte Maßnahmen zur Verhinderung der Schaumbildung ergriffen werden können. Im Gegensatz zu den unter Hochlastbedingungen dominierenden fadenbildenden Organismen, wie *Sphaerotilus natans* oder Typ 021N, die mit klassischen Kultivierungsmethoden in Reinkultur eingehend untersucht werden konnten, sind Reinkulturversuche mit den schaumverursachenden fadenbildenden Bakterien weniger geeignet. Zum einen lassen sich einige dieser Organismen aufgrund ihrer langen Generationszeiten oder ihres Bakterienaufwuchses, wie dies bei den Typen 0041/0675 und 1851 der Fall ist, nur schwierig in Reinkultur isolieren und kultivieren. Zum anderen liegen, verglichen mit den früher unter aeroben Bedingungen betriebenen Hochlastanlagen, in den heutigen nährstoffeliminierenden Anlagen wesentlich komplexere Verhältnisse vor mit einem Wechsel von aeroben, anoxischen und anaeroben Bedingungen. Durch die Einführung neuer in situ Methoden ist es mittlerweile allerdings möglich, Organismen auch ohne Loslösung aus ihrem Verband direkt im belebten Schlamm zu untersuchen.

So ermöglicht der Einsatz der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) eine genauere taxonomische Einordnung der fadenbildenden Organismen und stellt ein wichtiges Hilfsmittel zur Charakterisierung von Belebtschlamm- und Schaum-Biozönosen dar (Amann et al. 1995; Amann et al. 1998; Amann und Lemmer 1998). Mit Hilfe der von Erhart et al. (1997) entwickelten Oligonukleotidsonden zur Detektion von Candidatus *M. parvicella* wurde festgestellt, dass es sich bei dem Morphotyp *M. parvicella* in verschiedenen Kläranlagen in Deutschland,

Italien und Australien um denselben Organismus handelt. Die Gruppe der nocardioformen Actinomyceten, die laut Stackebrandt et al. (1997) als neue Unterordnung *Corynebacterineae* innerhalb der Ordnung *Actinomycetales* in der Klasse der *Actinobacteria* klassifiziert wird, kann mittlerweile durch den Einsatz von spezifischen Oligonukleotidsonden zur Detektion der Gattungen *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium* und *Rhodococcus* (de los Reyes et al. 1997; Schuppler et al. 1998; Müller 2006) genauer charakterisiert werden. Dies gilt ebenso für den Morphotyp *N. limicola*, hinter dem sich Organismen aus unterschiedlichen phylogenetischen Gruppen verbergen, wie den Klassen *Alphaproteobacteria* und *Actinobacteria* sowie den Phyla *Firmicutes* und *Chloroflexi* (Bradford 1997; Liu und Seviour 2001; Schade et al. 2002; Snaidr et al. 2002; Levantesi et al. 2004). Für die Morphotypen 0041/0675 und 0092 sind dagegen die Informationen zur phylogenetischen Charakterisierung noch spärlich, sodass diese mit den derzeit verfügbaren Sonden (Hugenholz et al. 2001; Bradford 1997) nur teilweise oder gar nicht detektiert werden (Müller 2006). Typ 1851 kann mit Hilfe der FISH-Technik dem *Chloroflexi*-Phylum zugeordnet werden (Beer et al. 2002).

Die Anwendung der Mikroautoradiografie (MAR) liefert Informationen über physiologische Eigenschaften, indem man die Aufnahme von Substraten durch die Organismen direkt in ihrer natürlichen Umgebung beobachtet, auch unter unterschiedlichen Sauerstoffbedingungen (Andreasen und Nielsen 1997; Andreasen und Nielsen 1998; Andreasen und Nielsen 2000; Nielsen et al. 2002; Thomsen et al. 2002; Kragelund et al. 2005; Eales et al. 2005; Carr et al. 2005; Seviour et al. 2005). In Kombination mit der FISH-Methode können so Informationen über die in situ Physiologie schaumverursachender fadenbildender Organismen erhalten werden. Auch der Nachweis der Aktivität von Enzymen, die eine Hydrolyse hochmolekularer Verbindungen katalysieren, gibt weitere Hinweise auf die physiologischen Eigenschaften von Bakterien. Die Fähigkeit zur Hydrolyse dieser Substanzen stellt in niedrigbelasteten Anlagen einen Selektionsvorteil dar und ist somit Grundlage für eine erfolgreiche Konkurrenz.

Das organische Material im Abwasser ist eine komplexe Mischung aus einfachen Kohlenhydraten, Aminosäuren, Alkoholen und Fettsäuren sowie Polymeren und Heteropolymeren, wie Proteine, Kohlenhydrate und Lipide (Raunkjaer et al. 1994). Da in den meisten Fällen nur Mono- und Oligomere ($MG < 1000$) durch die Bakterienzellwand transportiert werden können, werden hochmolekulare Substanzen zunächst durch Mikroorganismen mittels extrazellulärer Enzyme hydrolysiert. Anschließend werden die Bruchstücke in die Zelle aufgenommen und dort weiter abgebaut. Da festgestellt wurde, dass hochmolekulare Verbindungen langsam hydrolysiert werden (Eliosov und Argaman 1995; Ubukata 1998; Dueholm et al. 2001), ist die Hydrolyse dieser Polymere im Abwasserreinigungsprozess der Umsatz-limitierende Schritt. Die extrazellulären Enzyme sind entweder an die Zelloberfläche der Bakterien gebunden oder werden in freier Form ins Medium abgegeben und liegen dann gelöst oder an andere Oberflächen gebunden vor (Chróst 1991). Chróst (1991) definiert dabei alle Enzyme, die über die Cytoplasmamembran nach außen transportiert werden, aber mit der Zelle verbunden bleiben, als „Ektoenzyme“. Ektoenzyme sind also oberflächengebundene oder periplasmatische Enzyme, die mit polymeren Substraten außerhalb der Zelle reagieren. Im Gegensatz dazu bezeichnet er Enzyme, die in freier Form gelöst im Wasser vorliegen oder an andere Oberflächen als die des Produzenten gebunden sind als „extrazelluläre Enzyme“. Der Pool extrazellulärer Enzyme setzt sich zusammen aus aktiv in das umgebende Medium abgegebenen Enzymen, Ektoenzymen, die ausgewaschen wurden und intrazellulären Enzymen, die nach der Zelllyse freigesetzt wurden (Chróst 1991). Bei Ektoenzymen sind Hydrolyse und Substratauf-

nahme eng gekoppelt infolge der Bindung der Enzyme an die Zelloberfläche (Hollibaugh und Azam 1983). Im Falle von extrazellulären Enzymen besteht für die Organismen jedoch das Problem, dass sowohl die Enzyme als auch die Hydrolyseprodukte durch Diffusion in das umgebende Medium verloren gehen. Daher müssen die Hydrolyseprodukte schnell von den Organismen aufgenommen werden (Karp-Boss et al. 1996, zitiert nach Hoffmann und Decho 1999). Die Wahrscheinlichkeit, dass eine Zelle Hydrolyseprodukte aufnehmen kann, sinkt stark mit der Entfernung des Enzyms von der Zelle (Wetzel 1991). Befinden sich die hydrolysierten Substrate in einer Entfernung von 500 µm, ist die Wahrscheinlichkeit der Aufnahme hoch genug, um eine Freisetzung der Enzyme zu rechtfertigen (Wetzel 1991).

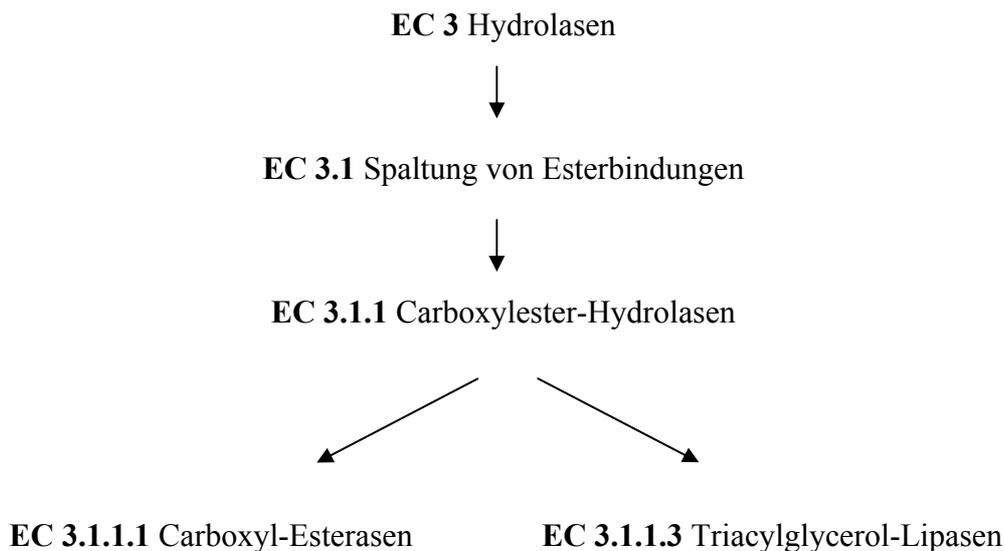
Im Belebtschlamm ist die in der Wasserphase gelöste Menge an extrazellulären Enzymen vernachlässigbar (Boczar et al. 1992). Untersuchungen von Frølund et al. (1995) zeigten, dass ein Großteil der extrazellulären Enzyme im Schlamm durch Adsorption in der EPS (extrazelluläre polymere Substanzen)-Matrix immobilisiert ist. Die vorwiegende Lokalisierung enzymatischer Aktivität in der EPS-Matrix und in Belebtschlammflocken wurde auch in anderen Studien bestätigt (Goel et al. 1998; Confer und Logan 1998; Guellil et al. 2001; Boczar et al. 2001). Ein Vorteil der Immobilisierung der Enzyme in den Flocken besteht darin, dass die Mikroorganismen keine unnötige Energie verbrauchen, um den Enzym-Pool ständig wieder aufzufüllen (Goel et al. 1998). Des Weiteren wird durch die Immobilisierung der Zugang zu Substrat und Cofaktoren erleichtert (Phillips und Poon 1988). Durch die Einbettung in der EPS-Matrix sind die Enzyme zudem vor einem raschen Abbau geschützt (Frølund et al. 1995).

Enzyme werden aufgrund der von ihnen katalysierten Reaktion klassifiziert. Nach internationaler Übereinkunft wurde vom Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB) ein System zur Bezeichnung und Klassifizierung von Enzymen eingeführt, nach dem die Enzyme in sechs Hauptklassen eingeteilt werden, nämlich Oxidoreduktasen, Transferasen, Hydrolasen, Lyasen, Isomerasen und Ligasen. Diesen Hauptklassen sind jeweils weitere Klassen untergeordnet, die auf dem jeweils katalysierten Reaktionstyp basieren. Jedem Enzym wird eine vierziffrige Klassifizierungsnummer, die sog. EC-Nummer, sowie ein systematischer Name zugewiesen, der die katalysierte Reaktion kennzeichnet. Die meisten der in der EPS gefundenen Enzyme gehören zur Klasse der Hydrolasen, wie Phosphatasen, Esterasen, Lipasen, Proteasen und Glycosidasen.

Phosphatasen katalysieren die Hydrolyse von Phosphorsäuremonoestern, z.B. 5' Phosphat-Reste an Nukleinsäuren, Phosphatreste an Proteinen, ATP und synthetische organische Verbindungen, unter Bildung von anorganischem Phosphat, das dann von den Organismen in die Zelle aufgenommen werden kann. Sie besitzen eine relativ niedrige Substratspezifität, weshalb sie sich als Aktivitätsparameter für den mikrobiellen Stoffwechsel eignen. Alkalische Phosphatasen (EC 3.1.3.1) werden durch hohe Konzentrationen an Orthophosphat, saure Phosphatasen (EC 3.1.3.2) durch Polyphosphate in ihrer Aktivität gehemmt. Sie besitzen unterschiedliche pH-Optima, die im alkalischen bzw. sauren Bereich liegen. Alkalische Phosphatasen benötigen Metallionen als Cofaktoren: das aktive Zentrum im Inneren der Phosphatase weist zwei katalytisch aktive Zinkzentren auf, in unmittelbarer Nähe dazu befindet sich ein Magnesium-Ion, das nicht nur eine katalytische, sondern auch eine Struktur-stabilisierende Funktion ausübt (Janeway et al. 1993). Die Substratmoleküle gelangen durch einen Kanal von der Proteinoberfläche zum aktiven Zentrum im Proteininneren. Dieser Kanal wird von

mehreren Aminosäuren gebildet und hat größtenteils polaren Charakter, sodass der Zugang der hydrophilen Substratmoleküle zum aktiven Zentrum ermöglicht wird.

Bei den Esterasen handelt es sich wie bei den Phosphatasen um Enzyme des zentralen Stoffwechsels, die für eine allgemeine heterotrophe Abbauaktivität stehen. Esterasen stellen eine diverse Gruppe von Hydrolasen dar, die sowohl die Bildung als auch die Hydrolyse von Esterbindungen katalysieren. Von besonderer Bedeutung sind zwei Hauptklassen von Esterasen: Carboxyl-Esterasen (EC 3.1.1.1) und Lipasen (EC 3.1.1.3) (Bornscheuer 2002). Die Klassifizierung des NC-IUBMB zeigt folgenden Aufbau:



Neben den polymeren Kohlenhydraten und Proteinen gehören die Fette zu den wichtigsten höhermolekularen Substraten im mikrobiellen Stoffwechsel. Ausgangspunkt der Fettverwertung ist die Hydrolyse der Triacylglycerine (Neutralfette; Triglyceride) durch Lipasen. Der mikrobielle Fettstoffwechsel wird zwar z.T. auch beim Nachweis der unspezifischen Esterasen miterfasst, eine Messung der Lipase-Aktivität lässt aber speziell bei Schlämmen und Abwässern wichtige Rückschlüsse auf den Stoffumsatz zu.

Lipasen sind, wie oben erwähnt, Triacylglycerol-Hydrolasen (EC 3.1.1.3) und katalysieren die Hydrolyse von Estern aus Glycerin und langkettigen Fettsäuren. Ihre bevorzugten Substrate sind langkettige Triacylglyceride, die an der Grenzfläche zwischen hydrophober Lipid- und hydrophiler Wasserphase umgesetzt werden (Jaeger et al. 1994). Lipasen benötigen daher für ihre Aktivität eine hydrophobe Grenzfläche. Ihre physiologische Bedeutung besteht in der Bereitstellung von freien Fettsäuren aus dem umgebenden Medium der Zelle. Triglyceride selbst können nicht durch die Zellmembran aus dem Medium aufgenommen werden. Als charakteristische Sekundärstruktur weisen Lipasen den so genannten „ α/β -Hydrolase fold“ auf (Bornscheuer 2002), der als generelles Faltungsmuster für verschiedene Hydrolasen identifiziert wurde (Ollis et al. 1992). Der „ α/β -Hydrolase fold“ besteht aus acht parallel angeordneten β -Faltblattstrukturen, die durch α -Helices miteinander verbunden sind und dient der korrekten Positionierung der Aminosäuren der sog. katalytischen Triade (Ollis et al. 1992). Diese stellt das aktive Zentrum des Enzyms dar und wird aus den drei Aminosäureresten Serin, Histidin und Aspartat bzw. Glutamat gebildet (Jaeger et al. 1994; Bornscheuer 2002). Das aktive Zentrum ist unter einer deckelähnlichen Struktur, dem sogenannten „lid“ verborgen

und damit nicht für das Substrat zugänglich (Brady et al. 1990). Die Anlagerung des Enzyms an die Phasengrenzfläche von wasserunlöslichem Substrat und wässriger Lösung bewirkt eine Konformationsänderung der Lipase, in Folge derer sich der Deckel öffnet und das aktive Zentrum für das Substrat zugänglich wird (Jaeger et al. 1994). Dies wird als Interphasenaktivierung bezeichnet (Sarda und Desnuelle 1958). Daher folgen Lipasen nicht der klassischen Michaelis-Menten-Kinetik, da sie eine bestimmte Schwellenkonzentration an Substrat benötigen, um eine hohe Aktivität zu zeigen (Bornscheuer 2002). Bereits Sarda und Desnuelle (1958) stellten fest, dass Lipasen gegenüber nichtassoziierten Substraten nur eine geringe Aktivität aufweisen, die oberhalb der kritischen Mizellenkonzentration des Substrats steil ansteigt. Lipasen benötigen zur Aktivierung also aggregierte Moleküle, wie sie in einer Emulsion oder einer mizellaren Lösung vorliegen (Schmid und Verger 1998). Ionen, welche die gebildeten Fettsäuren entfernen, wie z.B. Ca^{2+} , wirken als Aktivatoren, hohe Konzentrationen an freien Fettsäuren hingegen als Inhibitoren. Weitere Eigenschaften sind das breite Substratspektrum, die Unabhängigkeit von Cofaktoren, die Stabilität und Aktivität in organischen Lösungsmitteln sowie die hohe Regio- und Stereospezifität (Bornscheuer 2002). Neben Lipasen, die aufgrund ihrer unspezifischen Wirkung die Fettsäuren aus allen Glyceridpositionen gleichermaßen spalten (Stöcklein et al. 1993), gibt es Enzyme, die Fettsäuren bevorzugt aus den Positionen *sn*-1 und *sn*-3 der Triglyceride abtrennen (Rogalska et al. 1993; Joerger und Haas 1993, zitiert nach Catoni 1999). Daneben sind auch Lipasen bekannt, die eine Fettsäurespezifität, z.B. für Ölsäure, aufweisen (Charton und Macrae 1992; Vernet et al. 1993).

Carboxyl-Esterasen (EC 3.1.1.1), im Folgenden Esterasen genannt, besitzen ebenso wie Lipasen den charakteristischen „ α/β -Hydrolase fold“ sowie die katalytische Triade aus den Aminosäuren Serin, Histidin und Aspartat. Auch Esterasen weisen neben dem breiten Substratspektrum eine hohe Regio- und Stereospezifität auf und benötigen keine Cofaktoren. Eine weitere Eigenschaft ist die Stabilität und Aktivität in organischen Lösungsmitteln, auch wenn dieses Merkmal bei Lipasen ausgeprägter ist. Esterasen setzen wasserlösliche Substrate um, die aufgrund des nicht vorhandenen Deckels ungehindert in das aktive Zentrum gelangen und dort umgesetzt werden. Der Mechanismus der Ester-Hydrolyse ist grundsätzlich derselbe für Esterasen und Lipasen.

Die Frage, wodurch sich Esterasen von „echten“ Lipasen unterscheiden, kann im Moment noch nicht eindeutig beantwortet werden (Jaeger et al. 1999). Ursprünglich hat man zur Unterscheidung die Grenzflächenaktivierung, d.h. die Lipase-katalysierte Reaktion in einem zweiphasigen Reaktionssystem in Gegenwart einer Lipid-Wasser-Grenzschicht, sowie das Vorhandensein des Deckels herangezogen, der im inaktivierten Zustand den Zugang zum aktiven Zentrum des Enzyms versperrt. Allerdings geben Jaeger et al. (1999) zu bedenken, dass diese Kriterien nicht geeignet erscheinen, da einige Ausnahmen beschrieben wurden (Verger 1997). Es handelt sich dabei um Enzyme, die zwar einen Deckel aufweisen, aber keine Grenzflächenaktivierung zeigen. Das bedeutet, dass weder die Beobachtung einer Grenzflächenaktivierung noch die Gegenwart eines Deckels hinreichende Kriterien sind, um eine Esterase als „echte“ Lipase zu klassifizieren. Verger (1997) schlägt daher vor, das sicherste Merkmal für eine Lipase sei deren Fähigkeit, langkettige Glycerinester zu hydrolysieren. Esterasen setzen dagegen lediglich kurzkettige Substrate um. Eine Festlegung bezüglich der exakten Kettenlänge existiert allerdings nicht. Jaeger et al. (1999) wenden ein, dass auch Lipasen die Fähigkeit besitzen, kurzkettige Ester-Substrate zu spalten. Einen weiteren Vorschlag zur Differenzierung liefern Fojan et al. (2000). Sie verglichen Aminosäure-Sequenzen

und 3D-Strukturen von Lipasen und Esterasen und schlagen eine Unterscheidung vor, die auf einer pH-abhängigen elektrostatischen „Signatur“ beruht. Das aktive Zentrum der Lipasen weist ein negatives Potential in dem pH-Bereich auf, der mit der maximalen Aktivität der Lipasen verbunden ist und typischerweise bei pH 8 liegt. Esterasen zeigen ein ähnliches Muster, allerdings bei pH-Werten um 6, was auch mit deren niedrigerem pH-Optimum korreliert.

Proteine sind die häufigsten organischen Moleküle in Zellen und hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen von fundamentaler Bedeutung. Im Abwasser beträgt der Anteil an Proteinen etwa ein Drittel der organischen Abwasserinhaltsstoffe, bezogen auf den chemischen Sauerstoffbedarf CSB (Raunkjaer et al. 1994). Dementsprechend spielt der Proteinstoffwechsel auch eine wesentliche Rolle beim Umsatz organischer Materie in Wasser. Der Proteinabbau erfolgt zunächst extrazellulär durch Spaltung der Polymere innerhalb des Proteinmoleküls. Permeable Spaltstücke werden dann von der Zelle aufgenommen und intrazellulär weiterverdaut. Enzyme, die Peptidbindungen hydrolysieren, werden als Proteasen, Proteinasen, Peptidasen oder proteolytische Enzyme bezeichnet. Sie werden nach dem NC-IUBMB ebenfalls der dritten Hauptklasse der Enzyme, den Hydrolasen, zugeordnet (EC 3.4). Im Folgenden wird die Bezeichnung „Proteasen“ verwendet. Nach dem Aufbau ihres aktiven Zentrums werden sie in vier Gruppen eingeteilt (Bond 1989, Neurath 1989, Barrett et al. 1998, alle zitiert nach Chen et al. 2003): die Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metallo-Proteasen. Die Serin-Proteasen besitzen, wie auch Esterasen und Lipasen, im aktiven Zentrum eine katalytische Triade aus den Aminosäuren Aspartat, Histidin und Serin, während diese bei den Cystein-Proteasen aus Aspartat, Histidin und Cystein gebildet wird. Die Aspartat-Proteasen, die auch als saure oder Carboxypeptidasen bezeichnet werden, sind durch zwei katalytisch wirksame Aspartat-Reste im aktiven Zentrum charakterisiert. Diese Proteasen sind nur unter pH 5 aktiv. Metallo-Proteasen sind nur in Gegenwart von Metallionen wie Zn^{2+} oder Ca^{2+} wirksam. Im aktiven Zentrum befinden sich neben dem Metallion zwei Histidin-Reste sowie Glutamat. Neben dieser Einteilung nach katalytisch wirksamen Gruppen im aktiven Zentrum lassen sich die Proteasen auch nach der Lokalisation ihres Angriffs an der zu spaltenden Peptidkette in Exo- und Endopeptidasen unterteilen. Während Exopeptidasen als Amino- oder Carboxypeptidasen ausschließlich endständige Aminosäuren abspalten, hydrolysieren Endopeptidasen bevorzugt im Inneren des Proteinmoleküls. Die Substratspezifität der Proteasen kann sowohl hoch also auch niedrig sein. So weisen mikrobielle im Vergleich zu eukaryontischen Proteasen meist eine niedrigere Substratspezifität auf. Im Unterschied zu Lipasen setzen Proteasen nur lösliche Substrate um. Bei der Aktivitätsbestimmung ist es vorteilhaft, unspezifische Enzymtests zu verwenden, die praktisch alle Protease-Aktivitäten erfassen. Man bedient sich dabei meist natürlicher Proteine, wie z.B. Casein, als Substrate, die zahlreiche zugängliche Peptidbindungen unterschiedlichster Art enthalten (Brock et al. 1982).

β -Glucuronidasen (EC 3.2.1.31) gehören zur Gruppe der Glycosidasen und katalysieren die Spaltung von Glucuroniden unter Bildung von Glucuronsäure. Sie spielen vermutlich bei der Dekonjugation von Glucuronid-Verbindungen im Abwasserreinigungsprozess eine Rolle. So werden beispielsweise natürliche sowie synthetische Östrogene, wie z.B. 17β -Estradiol, Estron, 17β -Ethinylestradiol und Mesantril, aber auch Medikamente, wie z.B. Chloramphenicol oder Fenobifibrat, größtenteils in Form weitgehend inaktiver Konjugate als Glucuronide oder Sulfate über die Niere im Urin ausgeschieden und gelangen über das Kanalsystem in die Kläranlage (Ternes 1998; Ternes et al. 1999a; Belfroid et al. 1999). Dort können diese Ver-

bindungen durch mikrobielle Enzymaktivitäten von β -Glucuronidasen und Sulfatasen gespalten und wieder in ihre aktive Form zurückgeführt werden.

Bisher konnten bei Fragestellungen zur Aktivität relevanter Enzyme nur Aussagen über die Gesamtaktivität einer Belebtschlamm-Biozönose getroffen werden (Teuber und Brodich 1977; Nybroe et al. 1992; Lemmer et al. 1994; Frølund et al. 1995). Von großem Interesse sind jedoch nicht nur Angaben über die Gesamtaktivität der Biozönose, sondern vor allem welche Bakteriengruppen Enzymaktivität aufweisen. Dadurch erhält man einen genaueren Einblick über die am Abbau beteiligten Organismen. Dies ist mittlerweile möglich durch den Einsatz der sog. ELF (enzyme labeled fluorescence)-Technik, die mit Hilfe spezieller Substrate eine Beobachtung von Enzymaktivitäten in situ, d.h. direkt in der unbeeinflussten Probe, ermöglicht. Diese Methode wurde zunächst für die Bestimmung der in situ Aktivität der alkalischen Phosphatase entwickelt (Haugland et al. 1994; Haugland et al. 1995). Das verwendete Substrat liefert nach der enzymatischen Hydrolyse ein intensiv fluoreszierendes, photostabiles Präzipitat. Mittlerweile sind auch ELF[®]-97-Substrate für die Bestimmung weiterer in situ Enzymaktivitäten, wie z.B. von Lipase, Esterase und β -Glucuronidase, erhältlich. Durch Anwendung der ELF-Technik konnten so in situ Enzymaktivitäten in Geweben, Zellkulturen, Phytoplankton, Protozoen und Bakterien nachgewiesen werden (Paragas et al. 1997; van Ommen Kloeke und Geesey 1999; Nielsen et al. 2002; Paragas et al. 2002; Štrojsová et al. 2003; Nedoma et al. 2003; Štrojsová et al. 2005; Cao et al. 2005; Kragelund et al. 2005; Eales et al. 2005; Carr et al. 2005).

Ziel der vorliegenden Arbeit war die in situ Bestimmung der zellgebundenen Enzymaktivitäten von Phosphatasen, Esterasen, Lipasen und β -Glucuronidasen von fadenbildenden Belebtschlamm Bakterien mit einem Schwerpunkt auf Organismen, die bei Schaumereignissen auftreten, um deren Potential beim Abbau von partikulärem und hochmolekularem Substrat abzuschätzen. Zur eindeutigen Zuordnung dieser Enzymaktivitäten zu den Organismen erfolgte eine Optimierung der Kombination der ELF-Technik mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung, soweit Oligonukleotidsonden verfügbar waren. Das Interesse galt dabei neben *M. parvicella* und nocardioformen Actinomyceten vor allem den Morphotypen *N. limicola*, 0041/0675, 1851 und 0092, über deren physiologische Eigenschaften derzeit noch relativ wenig bekannt ist. Untersuchungen an *M. parvicella*- und *N. limicola*-Reinkulturen sollten weitere Erkenntnisse zur Physiologie und zum Wachstumsverhalten dieser Organismen liefern. Weiter wurden auch die Gesamtaktivitäten von Lipasen, Proteasen und β -Glucuronidasen in drei kommunalen Kläranlagen mit Dominanz von *M. parvicella* bzw. nocardioformen Actinomyceten bestimmt und mit den Ergebnissen der in situ Analyse verglichen. Da bekannt ist, dass lipophile Stoffe eine wichtige Rolle bei der Bildung von Schäumen spielen und sowohl *M. parvicella* als auch nocardioforme Actinomyceten langkettige Fettsäuren als Substrat nutzen, lag ein besonderes Augenmerk auf der Bestimmung der Lipase-Aktivität und den damit verbundenen Aktivitäts-Unterschieden in *M. parvicella*- und Actinomyceten-dominierten Anlagen. Des Weiteren wurde die Anwendung der in situ Technik beim Monitoring der Lipase-Aktivität von *M. parvicella* während des Einsatzes von $AlCl_3$ als Bekämpfungsmaßnahme bei Schaumproblemen auf deren Praxistauglichkeit überprüft.

B Material und Methoden

1 Kläranlagen-Auswahl

Die Gesamtzymaktivitäten von Protease, Lipase und β -Glucuronidase wurden regelmäßig zwischen Januar 2002 und März 2005 in den Belebtschlämmen und Schäumen aus zwei einstufigen kommunalen Kläranlagen sowie den beiden Belebungsbecken einer zweistufigen Anlage bestimmt. Die zweistufige Anlage KA-M besteht aus einer Hochlaststufe mit C-Elimination und vorgeschalteter Denitrifikation sowie einer Niedriglaststufe mit Nitrifikation. Die beiden einstufigen Anlagen KA-GR und KA-BT liegen im Niedriglastbereich. KA-BT wurde während des Untersuchungszeitraums umgebaut, wodurch sich einige betriebliche Veränderungen ergaben: bis Mitte 2004 wurde die Anlage mit intermittierender, im Anschluss daran mit vorgeschalteter Denitrifikation betrieben. Die Phosphor-Elimination erfolgte zunächst nur auf chemischem Weg durch Fällung mit Metallsalzen, die nach dem Umbau ab Mitte 2004 mit biologischer Phosphorentfernung ergänzt wurde. Weitere Details zu den Kläranlagen sind in Tabelle 1 aufgelistet.

Tabelle 1: Kenndaten der untersuchten Kläranlagen (EW: Einwohnerwerte; BB: Belebungsbecken; DN: Denitrifikation; N: Nitrifikation; Bio-P: Biologische Phosphor-Elimination)

Kläranlage	EW	Schlammbelastung B_{TS} kg BSB_5 /(kg· d)	Stickstoff-Elimination	Phosphor-Elimination
KA-M BB1	2 000 000	0,64	DN, vorgeschaltet	Vorfällung
KA-M BB2	2 000 000	0,02-0,05	N	Simultanfällung
KA-GR	25 000	0,02-0,05	DN, intermittierend	Bio-P; Simultan-/Nachfällung
KA-BT (bis Mitte 2004)	82 000	0,15	DN, intermittierend	Simultanfällung
KA-BT (ab Mitte 2004)	82 000	0,15	DN, vorgeschaltet	Bio-P Simultanfällung
KA-AL	20 000	0,02	DN, vorgeschaltet	Simultanfällung
KA-LAU	35 000	0,1-0,3	DN, vorgeschaltet	Simultanfällung
KA-TB	4 600	0,02-0,05	DN, intermittierend	Bio-P (gering)
KA-US	12 000	0,02-0,05	DN, intermittierend	Nachfällung
KA-AN	125 000	0,07-0,1	DN, vorgeschaltet	Simultanfällung
KA-B	1 800 000	0,09	N DN, vorgeschaltet	Simultanfällung
KA-STA	100 000	0,08	DN, vorgeschaltet	Fällung
KA-WOR	120 000	0,02-0,05	DN, vorgeschaltet	Bio-P Simultanfällung

Zur Bestimmung der in situ Enzymaktivitäten von Phosphatase, Esterase, Lipase und β -Glucuronidase wurden neben den bereits genannten Anlagen auch Belebtschlämme aus den kommunalen Kläranlagen KA-LAU, KA-TB, KA-UB und KA-AL untersucht, die mit Ausnahme der KA-LAU im Niedriglastbereich liegen. Für die Isolierung fadenbildender Bakterien wurden Belebtschlämme aus den Kläranlagen KA-AN, KA-B, KA-STA und KA-WOR verwendet (für Details siehe Tab. 1).

2 Analyse der Bakteriengemeinschaften in den ausgewählten Kläranlagen

2.1 Mikroskopische Schlammanalyse

Die fadenförmigen Mikroorganismen sowie Protozoen und Metazoen in den untersuchten Belebtschlamm- und Schaumproben wurden mit Hilfe der mikroskopischen Schlammanalyse nach Eikelboom (2000) charakterisiert. Die Identifizierung der fadenförmigen Bakterien erfolgte dabei mit Hilfe eines Bestimmungsschlüssels, der auf morphologischen Merkmalen sowie dem Färbeverhalten der Organismen bei Gram- und Neisserfärbung beruht. Zur Quantifizierung wurde der sog. Fädigkeitsindex (FI) eingesetzt, der ein Maß für die Populationsgröße der fadenbildenden Organismen darstellt. Es wurden Kategorien von 0 (keine fadenbildenden Organismen) bis 5 (sehr viele fadenbildende Organismen) verwendet, wobei sich die Populationsgrößen der einzelnen Kategorien in etwa um den Faktor 10 voneinander unterscheiden. Zur Bestimmung des Fädigkeitsindexes wurde das mikroskopische Bild des Schlammes bzw. Schaumes bei niedriger Vergrößerung mit Referenzfotos der verschiedenen Kategorien verglichen.

2.2 Färbetechniken

2.2.1 Gramfärbung

Die Gramfärbung ermöglicht die Aufteilung der Eubakterien in grampositive und gramnegative Bakterien, die sich im Aufbau ihrer Zellwand voneinander unterscheiden. Die Struktur der Bakterienzellwand ist verantwortlich für das unterschiedliche Verhalten der Bakterien bei der Färbung.

Die Belebtschlamm- und Schaumproben wurden auf Objektträgern ausgestrichen, an der Luft getrocknet und durch kurzes Abflammen der Objektträgerunterseite fixiert. Nun wurden die fixierten Bakterien für 2 min mit dem Farbstoff Kristallviolett angefärbt und danach für 1 min mit einer Iodlösung (Lugolsche Lösung) gebeizt. Dabei bildet sich ein tiefblauer Farbstoff-Iod-Komplex, der wasserunlöslich ist und ausfällt. Anschließend wurden die Objektträger mit 96%igem Ethanol gewaschen und danach mit Leitungswasser abgespült. Durch das Ethanol wird der Farbstoff-Iod-Komplex wieder gelöst. Gramnegative Bakterien geben durch diese Behandlung den Farbstoff-Iod-Komplex wieder ab und werden entfärbt, während dieser bei den grampositiven Bakterien von dem dicken, vielschichtigen Peptidoglykannetz der Zellwand zurückgehalten wird. Grampositive Bakterien bleiben daher blauviolett gefärbt. Die gramnegativen Bakterien wurden nun durch eine 1-minütige Gegenfärbung mit Safranin hellrot angefärbt.

2.2.2 Neisserfärbung

Mit der Neisserfärbung werden in der Zelle abgelagerte Polyphosphate nachgewiesen. Neissernegative Bakterien färben sich nicht oder kaum und erscheinen im Hellfeld hellbraun bis gelblich. Neisserpositive Bakterien enthalten dunkle, fast schwarze Granula (Polyphosphatkügelchen; z.B. *Microthrix parvicella*) oder sind vollständig graublau gefärbt (z.B. *Nostocoida limicola*; Typ 0092).

Die Herstellung hitzefixierter Präparate erfolgte wie oben beschrieben. Die Objektträger wurden danach mit einer frisch zubereiteten Mischung aus zwei Teilen Methylenblaulösung und einem Teil Kristallviolettlösung überschichtet. Nach 30 s Einwirkzeit wurde die Färbelösung abgekippt und die Präparate für 1 min mit Chrysoidinlösung gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger vorsichtig mit Zellstoff trockengetupft.

2.3 Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung, kurz FISH genannt, ist eine Methode, bei der einzelne Bakterienzellen unter Einsatz von sogenannten Nukleinsäuresonden („Gensonden“) 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 mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert, der die Detektion und Identifizierung der Bakterien ermöglicht. Als Farbstoffe werden z.B. FLUOS (5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester) 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 durchlässig gemacht. Bei den grampositiven Bakterien, die eine sehr dicke Zellwand besitzen, ist eine zusätzliche Behandlung mit dem Enzym Lysozym erforderlich. Sind die Nukleinsäuresonden in die Zellen eingedrungen, erfolgt die eigentliche Hybridisierung, bei der die Sonden an die Zielmoleküle binden. Überschüssige und nicht gebundene Sonden werden in einem nachfolgenden Waschvorgang abgetrennt. Im Epifluoreszenzmikroskop lassen sich die markierten Bakterienzellen detektieren.

2.3.1 Chemikalien und Lösungen

1 x PBS-Puffer (pH 7,2):

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	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
in aqua dest. lösen; autoklavieren	

3 x PBS-Puffer (pH 7,2):

Na ₂ HPO ₄ · 2 H ₂ O	5,3 g/l
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	4,1 g/l
NaCl	22,8 g/l

in aqua dest. lösen; autoklavieren

4%ige PFA (Paraformaldehyd)-Lösung (pH 7,2):

30 ml aqua dest. wurden auf 60°C erwärmt und 2 g PFA zugegeben. Anschließend wurde tropfenweise 1 N NaOH zugesetzt, bis das PFA gelöst war. Nach Zugabe von 16,6 ml 3 x PBS-Puffer wurde der pH-Wert mittels 37%iger HCl auf pH 7,2 eingestellt.

5 M NaCl-Lösung:

NaCl	292 g/l
------	---------

in aqua dest. lösen; autoklavieren

1 M Tris/HCl (Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid)-Lösung (pH 8,0):

Tris/HCl	158 g/l
----------	---------

in aqua dest. lösen; autoklavieren

10%ige SDS (Natriumdodecylsulfat)-Lösung:

SDS	100 g/l
-----	---------

in aqua dest. lösen; sterilfiltrieren (0,2 µm-Membranfilter)

0,5 M EDTA (Ethylendinitrilotetraessigsäure)-Lösung (pH 8,0):

EDTA (Titrplex III)	186 g/l
---------------------	---------

in aqua dest. lösen; autoklavieren

TE-Puffer (pH 8,0):

Tris/HCl	1,6 g/l
EDTA (Titrplex III)	0,37 g/l

in aqua dest. lösen; autoklavieren

DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid)-Stammlösung:

DAPI	100 µg/ml
------	-----------

in aqua dest. lösen

(zur Herstellung der DAPI-Arbeitslösung wird diese 1:100 in 1 x PBS-Puffer verdünnt)

Lysozym-Lösung:

Lysozym (Serva)	10 mg/ml
-----------------	----------

in TE-Puffer lösen

2.3.2 Fixierung der Proben

Paraformaldehydfixierung (nach Amann et al. 1990)

Drei Teile frisch hergestellter, gekühlter 4%iger Paraformaldehyd-Lösung wurden mit einem Teil Belebtschlamm bzw. Schaum gemischt und für 3 h bei 4°C inkubiert. Die Schaumproben wurden zuvor 1:10 mit 1 x PBS-Puffer verdünnt. Anschließend wurde bei 5000 g für 5 min zentrifugiert, das Pellet mit 1 ml 1 x PBS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und nach einem weiteren Waschschrift in 1 x PBS-Puffer aufgenommen und mit demselben Volumen an eiskaltem, absolutem Ethanol versetzt. Die so fixierten Zellen wurden bei -20°C gelagert.

Ethanolfixierung

Ein Teil der zu untersuchenden Probe wurde mit einem Teil eiskalten, absoluten Ethanol versetzt, gut durchmischt und bei -20°C gelagert.

2.3.3 In situ Einzelzellhybridisierung

Hybridisierungsprozedur

Die Hybridisierungsprozedur wurde in Anlehnung an das Protokoll von Manz et al. (1992) durchgeführt. 2-10 µl der fixierten Proben 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%igen, 80%igen und 100%igen Ethanol getaucht. Nach dem Trocknen der Objektträger wurden zur Hybridisierung auf jedes Feld 8 µl des auf 46°C vorgewärmten Hybridisierungspuffers (Zusammensetzung siehe unten) sowie 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. Die Objektträger wurden nun horizontal in einer vortemperierten Plastikbox, welche mit befeuchtetem Zellstoff ausgelegt war, für 90 min bzw. 18 h (siehe Kap. B.2.3.4, Tab. 3) bei 46°C im Hybridisierungssofen inkubiert. Zum Abspülen des Hybridisierungspuffers wurden die Objektträger kurz in destilliertes Wasser getaucht und anschließend sofort in ein mit 50 ml vorgewärmtem Waschpuffer (Zusammensetzung siehe unten) gefülltes Röhrchen überführt. Nach einer 20-minütigen Inkubation bei 48°C wurden die Objektträger aus dem Waschpuffer entnommen, zur Spülung für 3 min in ein Röhrchen mit destilliertem Wasser gegeben und an der Luft getrocknet. Zur Visualisierung der Gesamtzellzahl wurde nach der Hybridisierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI nachgefärbt. Dazu wurden in jede Aussparung 40 µl der DAPI-Arbeitslösung pipettiert und 15 min bei 0°C inkubiert.

Enzym-Vorbehandlung

Um ein ungehindertes Eindringen der Oligonukleotidsonde in die Zelle zu gewährleisten, ist bei verschiedenen Bakterien, insbesondere grampositiven Zellen, eine Vorbehandlung der Zellwand mit einem Enzym erforderlich (Beimfohr et al. 1993). Auf die Objektträger wurden in jede Aussparung 30 µl einer Lysozymlösung (10 mg/ml) pipettiert und 30 min bei Raum-

temperatur inkubiert. Anschließend wurden die Objektträger mit destilliertem Wasser abgespült und getrocknet. Die weitere Hybridisierungsprozedur erfolgte wie oben beschrieben.

Hybridisierungspuffer

Formamid	x* μ l
aqua dest.	y* μ l
5 M NaCl-Lösung	180 μ l
1 M Tris/HCl-Lösung	20 μ l
10%ige SDS-Lösung	1 μ l

* Der Hybridisierungspuffer wurde je nach benötigter Stringenz durch Zugabe von unterschiedlichen Mengen an Formamid modifiziert (siehe Tab. 2).

Waschpuffer

1 M Tris/HCl-Lösung	1000 μ l
5 M NaCl-Lösung	x** μ l
10%ige SDS-Lösung	50 μ l
0,5 M EDTA-Lösung	500*** μ l

** Die benötigte Stringenz wurde im Waschpuffer durch Variation der NaCl-Konzentration eingestellt (siehe Tab. 2).

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

Tabelle 2: Im Hybridisierungs- bzw. Waschpuffer eingesetzte Mengen an Formamid bzw. 5 M NaCl-Lösung

Formamid [%]	Hybridisierungspuffer		Waschpuffer	
	Formamid [μ l]	aqua dest. [μ l]	NaCl [mol]	5 M NaCl [μ l]
0	0	800	0,900	9000
5	50	750	0,636	6300
10	100	700	0,450	4500
15	150	650	0,318	3180
20	200	600	0,225	2150
25	250	550	0,159	1490
30	300	500	0,112	1020
35	350	450	0,080	700
40	400	400	0,056	460
45	450	350	0,040	300
50	500	300	0,028	180

2.3.4 Verwendete Oligonukleotidsonden

Tabelle 3: rRNS-gerichtete Oligonukleotidsonden, die in dieser Untersuchung verwendet wurden (Nomenklatur der Organismen nach dem Ribosomal Database Project-II <http://rdp.cme.msu.edu>)

Oligonukleotid-sonde	Spezifität	Formamid [%]	Hybridisierung [h]	Referenz
EUB338	<i>Bacteria</i>	0	1,5	Amann et al. 1990
EUB338-II	<i>Bacteria, Planctomycetes</i>	0	1,5	Daims et al. 1999
EUB338-III	<i>Bacteria, Verrucomicrobia</i>	0	1,5	Daims et al. 1999
HGC1156	<i>Actinobacteria</i> (Grampositive Hoch-GC-Bakterien)	20	18	Erhart 1997
HGC96a	<i>Actinobacteria</i> (Grampositive Hoch-GC-Bakterien)	25	18	Roller et al. 1994
MPA60	<i>Microthrix parvicella</i>	20	1,0 - 18	Erhart et al. 1997
MPA223	<i>Microthrix parvicella</i>	20	1,0 - 18	Erhart et al. 1997
MPA645	<i>Microthrix parvicella</i>	20	1,0 - 18	Erhart et al. 1997
Myc657	<i>Mycolata</i> , nocardioforme Actinomyceten	30	18	Davenport et al. 2000
DIE993	<i>Dietzia</i> spp., nocardioforme Actinomyceten-ähnliche Organismen	20	18	Müller 2006
RHOa429	<i>Rhodococcus</i> spp. Cluster A	20	18	Müller 2006
RHO b183	<i>Rhodococcus</i> sp. Cluster B	20	18	Müller 2006
R.ery619	<i>Rhodococcus erythropolis</i>	20	18	Müller 2006
NLIMI 91	<i>Nostocoida limicola</i> I (Grampositive Niedrig-GC-Bakterien; <i>Firmicutes</i> -Phylum)	20	1,5	Liu und Seviour 2001
NLII65	<i>Nostocoida limicola</i> II (<i>Actinobacteria</i>)	20	1,5	Bradford 1997
NLIMII 175	<i>Nostocoida limicola</i> II (<i>Actinobacteria</i>)	40	1,5	Liu und Seviour 2001
AHW183	<i>Nostocoida limicola</i> II (<i>Chloroflexi</i> -Phylum)	35	1,5	Schade et al. 2002
Noli-644	<i>Nostocoida limicola</i> II (<i>Alphaproteobacteria</i> ; Candidatus <i>Alysiosphaera europaea</i>)	35	1,5	Snaird et al. 2002 Levantesi et al. 2004
PPx3-1428	<i>Nostocoida limicola</i> II (<i>Alphaproteobacteria</i> ; Candidatus <i>Alysiomicrobium bavarium</i>)	50	1,5	Snaird et al. 2002 Levantesi et al. 2004
MC2-649	<i>Nostocoida limicola</i> II (<i>Alphaproteobacteria</i> ; Candidatus <i>Monilibacter batavus</i>)	35	1,5	Snaird et al. 2002 Levantesi et al. 2004
NLIMIII 301	<i>Nostocoida limicola</i> III (<i>Planctomycetales</i>) <i>Isosphaera</i> spp.	20	1,5	Liu und Seviour 2001
TM7905	Eikelboom Typ 0041/0675 (TM7-Cluster)	20	1,5	Hugenholtz et al. 2001
TM7305	Eikelboom Typ 0041/0675 (Subdivision 1 des TM7-Clusters)	30	1,5	Hugenholtz et al. 2001
CHL 1851	Eikelboom Typ 1851 (<i>Chloroflexi</i> -Phylum)	20	1,5	Beer et al. 2002
0092-997	Eikelboom Typ 0092 (<i>Cytophaga</i> Untergruppe des <i>Bacteroidetes</i> -Phylums)	20	1,5	Bradford 1997
CF319a	Eikelboom Typ 0092 (<i>Cytophaga-Flavobacterium</i> Cluster, jetzt im <i>Bacteroidetes</i> -Phylum)	35	1,5	Manz et al. 1996
ACA23a	<i>Acinetobacter</i> spp., Eikelboom Typ 1863	35	1,5	Wagner et al. 1994b

Tabelle 3 (Fortsetzung)

HHY	<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	20	1,5	Wagner et al. 1994a
TNI	<i>Thiothrix nivea</i>	45	1,5	Wagner et al. 1994a
21N	Eikelboom Typ 021N	35	1,5	Wagner et al. 1994a
G123T	<i>Thiothrix eikelboomii</i> , <i>T. nivea</i> , <i>T. unzii</i> , <i>T. fructosivorans</i> , <i>T. defluvii</i> , Eikelboom Typ 021N	40	1,5	Kanagawa et al. 2000
SNA	<i>Sphaerotilus natans</i>	45	1,5	Wagner et al. 1994a

2.3.5 Detektion fluoreszenzmarkierter Zellen

Die Objektträger wurden zur Verringerung von Ausbleicheffekten der Fluoreszenzfarbstoffe in Citifluor AF1 (Citifluor Ltd, London, UK) eingebettet und unter dem Mikroskop (Axio-plan, Zeiss) betrachtet. Es wurden Plan-Neofluar Objektive mit 10-, 40-, 63- und 100facher Vergrößerung eingesetzt. In Tabelle 4 sind die Filterkombinationen (AHF Analystechnik, Tübingen) aufgeführt.

Tabelle 4: Kenndaten der zur Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filtersysteme

AHF-Nr.	Anregungsfilter	Farbteiler	Emissionsfilter	verwendbar für
F11-000	D 360/40	400 DCLP	GG 420	DAPI / ELF
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 Quantifizierung der fluoreszenzmarkierten, fadenförmigen Bakterien erfolgte mit Hilfe von Kategorien, wobei wie bei der klassischen mikroskopischen Schlammanalyse (siehe Kap. B.2.1) die Kategorien 0 (keine Organismen) bis 5 (sehr viele Organismen) verwendet wurden.

3 Enzymaktivitätsmessungen in Belebtschlamm und Schäumen

3.1 Bestimmung von in vitro Gesamtzymaktivitäten

3.1.1 Chemikalien und Lösungen

100%ige Trichloressigsäure:

Trichloressigsäure 1000 g/l
in aqua dest. lösen

5%ige Trichloressigsäure:

Trichloressigsäure 50 g/l
in aqua dest. lösen

0,4 mM Tryptophan-Stammlösung:

Tryptophan 81,7 mg/l
in aqua dest. lösen

56 mM 4-Methylumbelliferyl (MUF)-Oleat-Substratlösung:

4-MUF-Oleat 24,7 mg/ml
in Ethylenglycolmonomethylether lösen

56 mM 4-Methylumbelliferyl (MUF)-Palmitat-Substratlösung:

4-MUF-Palmitat 23,2 mg/ml
in Ethylenglycolmonomethylether lösen

56 mM 4-Methylumbelliferyl (MUF)-Stearat-Substratlösung:

4-MUF-Stearat 24,8 mg/ml
in Ethylenglycolmonomethylether lösen

56 mM 4-Methylumbelliferyl (MUF)- β -D-Glucuronid-Substratlösung:

4-MUF- β -D-Glucuronid 19,7 mg/ml
in Ethylenglycolmonomethylether lösen

2 M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)-Puffer (pH 10,3):

Tris 242 g/l
in aqua dest. lösen

0,2%iger Ethylenglycolmonomethylether:

Ethylenglycolmonomethylether 2 ml/l
in aqua dest. lösen

100 μ M Methylumbelliferon (MUFon)-Stammlösung:

MUFon 19,8 mg/l
in 0,2%igem Ethylenglycolmonomethylether lösen

0,1 M Tris (Tris(hydroxymethyl)aminomethan)-Puffer (pH 10,3):

Tris 12 g/l
in aqua dest. lösen

3.1.2 Protease-Aktivität

Mit dem folgenden Test wird unspezifisch die Aktivität von Proteasen im Allgemeinen bestimmt. Die Aktivitätsbestimmung wurde in Anlehnung an Obst et al. (1995) mit Hilfe eines Verfahrens durchgeführt, bei dem die spektrale Absorption aromatischer Aminosäuren (z.B. Tryptophan), die als Endprodukt der enzymatischen Hydrolyse gebildet werden, im ultravioletten Bereich gemessen wird. Dieses Verfahren eignet sich besonders für Proben mit hoher Aktivität. Als Substrat wird Casein verwendet, das besonders reich an Tryptophan ist. Ein alternatives Verfahren zur Bestimmung der Protease-Aktivität mit Hilfe des chromogenen Substrats „Hide Powder Azure“ ist bei Belebtschlamm- und Schaumproben dagegen aufgrund der Adsorption des Farbstoffs nicht anwendbar (Obst et al. 1995).

Für den Test wurden je 100 mg Casein (Calbiochem) in Röhren eingewogen und mit 10 ml bzw. 10 g der unverdünnten Belebtschlamm- bzw. Schaumprobe beschickt (je drei Probenblindwerte sowie drei Probenansätze). Den Probenblindwerten wurde sofort zu Versuchsbe-

ginn 1 ml 100%ige Trichloressigsäure zum Abstoppen der Reaktion zugesetzt. Damit wird die Menge an bereits im Belebtschlamm bzw. Schaum vorhandenem Tryptophan berücksichtigt. Alle Ansätze wurden nun für 2 h bei 44°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde auch den Probenansätzen zum Abstoppen der Reaktion 1 ml 100%ige Trichloressigsäure zupipetiert. Nach Zugabe von 10 ml 5%iger Trichloressigsäure in alle Röhrchen wurden diese 15 min bei 20 000 g zentrifugiert und die Extinktion der Überstände im ultravioletten Bereich bei 280 nm gegen den Blindwert aus 5%iger Trichloressigsäure gemessen. Gegebenenfalls mussten die Überstände vor der Messung mit 5%iger Trichloressigsäure verdünnt werden. Die Tryptophan-Konzentration wurde anhand einer Eichkurve ermittelt. Aus der Differenz der Werte von Probenansatz und Probenblindwert ergibt sich die Menge an gebildetem Tryptophan. Die Aktivität der Protease wurde als mg Tryptophan pro Stunde und g organischer Trockenrückstand angegeben.

3.1.3 Lipase-Aktivität

Testdurchführung

Die Bestimmung der Lipase-Aktivität erfolgte entsprechend der Methode von Dueholm et al. (2005) und basiert auf einer Fluoreszenzmessung. Als Substrate wurden 4-Methylumbelliferyl (MUF)-Oleat, 4-MUF-Stearat sowie 4-MUF-Palmitat eingesetzt. Die Hydrolyse dieser Substrate setzt den Fettsäurerest sowie das fluoreszierende Methylumbelliferon (MUFon) frei.

Der Test wurde in 100 ml-Erlenmeyerkolben in Doppelansätzen durchgeführt. 250 µl bzw. 250 mg des Belebtschlammes bzw. Schaums wurden in 50 ml filtriertem Belebtschlamm (Cellulose-Nitrat-Filter mit 0,45 µm Porengröße) verdünnt und mit 200 µl der 56 mM MUF-Substrat-Lösung versetzt (Endkonzentration des MUF-Substrats im Testansatz: 230 µmol/l). Die Kölbchen wurden nun auf einem Schüttler (200 Umdrehungen pro Minute; UpM) für 2 h bei 20°C inkubiert. In Intervallen von 20 min wurden jeweils 2 ml Probe entnommen, durch einen Filter mit 0,2 µm Porengröße filtriert (Sartorius, MiniSart-Filter) und bei -20°C eingefroren. Durch die Filtration werden die Hydrolyse-Produkte vom Belebtschlamm bzw. Schaum abgetrennt. Dies erwies sich als zuverlässiger als eine Abtrennung durch Zentrifugation (Marxsen und Witzel 1990). Die eingefrorenen Proben können bis zur Fluoreszenzmessung mindestens 3 Monate ohne Intensitätsverlust aufbewahrt werden.

Fluoreszenzmessung

Zur Messung wurden je 0,4 ml der Proben mit 1,1 ml 2 M Tris-Puffer (pH 10,3) zur Verstärkung der Fluoreszenzintensität versetzt (Hoppe 1983). Bei sehr hohen Aktivitäten, z.B. im Schaum, müssen die Proben gegebenenfalls noch weiter verdünnt werden. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte in schwarzen Mikrotiterplatten (Nunc) in dem Multi-Detektions-Reader Genios der Firma Tecan bei einer Anregungswellenlänge von 364 nm und einer Emissionswellenlänge von 445 nm. Die Intensitäten wurden anschließend mit Hilfe einer Eichkurve in MUFon-Konzentrationen umgerechnet. Die Angabe der Lipase-Aktivität erfolgte als µmol gebildetes MUFon pro Stunde und g organischer Trockenrückstand.

Eichkurve

Zur Erstellung der Eichkurve wurde die MUFon-Stammlösung (100 μM) mit 0,1 M Tris-Puffer (pH 10,3) verdünnt und MUFon-Standardkonzentrationen von 0 bis 3 μM hergestellt.

3.1.4 β -Glucuronidase-Aktivität

Die Ermittlung der β -Glucuronidase-Aktivität erfolgte entsprechend der Anleitung zur Bestimmung der Lipase-Aktivität (siehe Kap. B.3.1.3) mit dem Unterschied, dass für den Test 1 ml Belebtschlamm bzw. 1 g Schaum sowie das Substrat 4-MUF- β -D-Glucuronid verwendet wurden.

3.1.5 Trockenrückstand und Glühverlust

Leere Quarzgutschalen wurden für 30 min auf 550°C erhitzt und nach dem Abkühlen im Exsikkator zur Ermittlung des Leergewichts gewogen. Zur Bestimmung des Trockenrückstands wurden 90 ml Belebtschlamm bzw. 25 g Schaum in die Quarzgutschalen eingewogen, über Nacht bei 105°C bis zur Gewichtskonstanz getrocknet und bis zur Wägung im Exsikkator aufbewahrt. Aus der Differenz zum Gewicht der leeren Schalen ergibt sich der Trockenrückstand (TR, angegeben in g/l bzw. g/kg). Anschließend wurden die Schalen für 60 min im Muffelofen bei 550°C geglüht und im Exsikkator auf Raumtemperatur abgekühlt. Der Glühverlust errechnet sich aus der Differenz der Gewichte bei 105°C und 550°C. Er entspricht dem organischen Anteil des Trockenrückstands (oTR, angegeben in g/l bzw. g/kg).

3.2 Bestimmung von in situ Enzymaktivitäten (ELF; enzyme labeled fluorescence)

Neben den herkömmlichen Enzymtests, die Auskunft über die Gesamtaktivität einer untersuchten Belebtschlamm- oder Schaumprobe geben, sind direkte Zuordnungen von Enzymaktivitäten zu bestimmten Bakteriengruppen von großem Interesse. Auf diese Weise erhält man einen genaueren Einblick, welche Organismen am Abbau Schaum-relevanter Substanzen beteiligt sind. Dies ist mittlerweile durch den Einsatz der sogenannten ELF (enzyme labeled fluorescence)-Technik möglich. Hierbei werden spezielle ELF[®]-97-Substrate verwendet, die wasserlöslich sind und eine schwach bläuliche Fluoreszenz aufweisen (Molecular Probes, Eugene, OR, USA). Nach der enzymatischen Spaltung entsteht das wasserunlösliche, kräftig gelb fluoreszierende Präzipitat 2-(5'-chloro-2'-hydroxyphenyl)-4-[3H]-quinazonlinon direkt am Ort der Aktivität. In Abb. 1 ist dies beispielhaft für ELF[®]-97-Palmitat, dem Substrat zur Detektion von Lipase-Aktivität, dargestellt.

Dieses Präzipitat zeichnet sich besonders durch seine hohe Photostabilität aus, die eine lange Betrachtung im Epifluoreszenzmikroskop erlaubt (Paragas et al. 1997). So bleibt das Fluoreszenzsignal bei konstanter Beleuchtung ca. 2 Stunden erhalten. Weiterhin besitzt das Präzipitat einen extrem hohen Stokes-Shift, d.h. die Differenz der Wellenlängen zwischen adsorbierten und emittierten Photonen ist sehr groß. Im Falle des ELF-Präzipitats ist die Fluoreszenz-Emission mit einem Maximum bei ~530 nm vom Anregungsmaximum bei ~360 nm um mehr als 100 nm getrennt (Singer et al. 1994; Larison et al. 1995). Dadurch kann das ELF-Signal deutlich von den meisten Zell- und Gewebe-Autofluoreszenzen unterschieden werden, deren Stokes-Shift in der Regel deutlich weniger als 100 nm beträgt (Singer et al. 1994; Larison et al. 1995; Pecorino et al. 1996; Paragas et al. 1997; Cox und Singer 1999). Ist das Epifluores-

zenzmikroskop mit einem Standard DAPI/Hoechst Longpass-Filterset ausgestattet, kann das ELF-Signal gleichzeitig mit blau fluoreszierenden Farbstoffen (wie z.B. DAPI) betrachtet werden, da diese verschiedene Emissionsspektren aufweisen und so leicht voneinander unterschieden werden können. Eine Unterscheidung der ELF-Signale von Fluorescein-Signalen ist ebenfalls unproblematisch, da sich deren Anregungswellenlängen nicht signifikant überlappen (Brumback und Wade 1996).

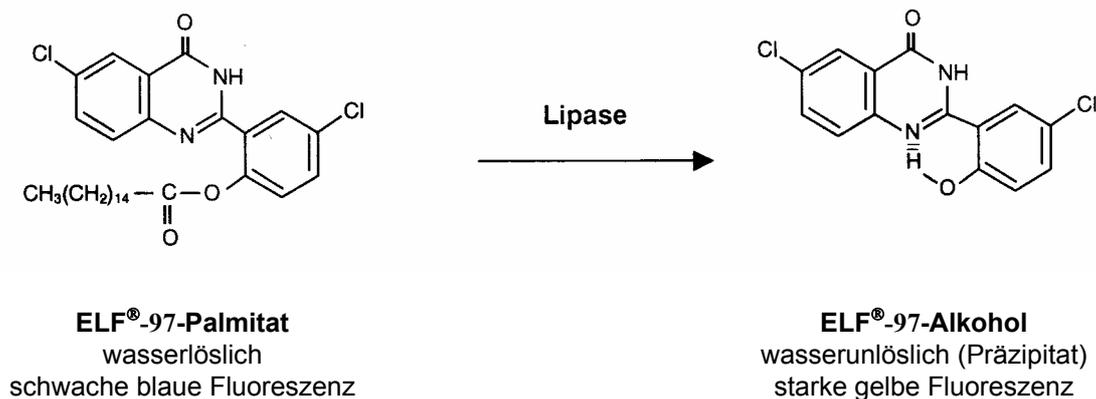


Abb. 1: Prinzip der Enzym-katalysierten Bildung des fluoreszierenden ELF[®]-97-Alkohols am Beispiel des Substrats ELF[®]-97-Palmitat

3.2.1 Substrate zur Aktivitätsbestimmung

Zur Untersuchung der in situ Enzymaktivitäten wurden ELF[®]-97-Substrate zum Nachweis von Phosphatase, Esterase, Lipase und β -Glucuronidase (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) eingesetzt. Die Unterscheidung von Esterase- und Lipase-Aktivität beruht auf der unterschiedlichen Kettenlänge der eingesetzten Substrate, wobei der kurzkettige Acetat-Ester zur Bestimmung der Esterase-Aktivität, der langkettige Palmitinsäure-Ester zur Ermittlung der Lipase-Aktivität verwendet wurde.

5 mM ELF[®]-97-Phosphatase-Substrat (ELF[®]-97-Phosphat; bereits in Wasser gelöst)

2,9 mM ELF[®]-97-Esterase-Substratlösung:

ELF[®]-97-Acetat 1,0 mg/ml
in N,N-Dimethylformamid lösen

1,8 mM ELF[®]-97-Lipase-Substratlösung:

ELF[®]-97-Palmitat 1,0 mg/ml
in N,N-Dimethylformamid lösen

2,0 mM ELF[®]-97- β -Glucuronidase-Substratlösung:

ELF[®]-97- β -D-Glucuronid 1,0 mg/ml
in N,N-Dimethylsulfoxid lösen

3.2.2 Versuchsdurchführung

Die in situ Bestimmung der Enzymaktivitäten erfolgte in Anlehnung an van Ommen Kloeke und Geesey (1999). 1 ml des Belebtschlamm- bzw. des 1:10 verdünnten Schaums wurden mit je 5 µl ELF[®]-97-Phosphatase- oder ELF[®]-97-Esterase-Substratlösung bzw. 10 µl ELF[®]-97-Lipase- oder ELF[®]-97-β-Glucuronidase-Substratlösung versetzt und 60 min bei 20°C im Dunkeln inkubiert. Die durch die Enzymaktivität gebildeten ELF-Kristalle wurden anschließend mittels Epifluoreszenzmikroskopie detektiert (Anregungsfilter 320-400 nm; Farbteiler 400 nm; Emissionsfilter 420 nm; siehe auch Tab. 4).

3.2.3 Zuordnung von in situ Enzymaktivitäten zu Organismen

Kombination mit Phasenkontrastmikroskopie

Um die Enzymaktivität bestimmten Organismen zuzuordnen, wurden Phasenkontrast- und Epifluoreszenzbilder des gleichen Bildausschnitts mit Hilfe einer AxioCamColor Digitalkamera sowie der AxioVision Bildverarbeitungssoftware (Zeiss) überlagert.

Kombination mit Gram- und Neisserfärbung

Eine Zuordnung erfolgte weiter durch Überlagerung der Epifluoreszenzbilder mit Gram- und Neisserfärbung. Die Belebtschlamm- und Schaumproben wurden dazu nach der Inkubation mit den ELF[®]-97-Substraten auf Objektträgern ausgestrichen, an der Luft getrocknet und durch kurzes Abflammen der Objektträgerunterseite fixiert. Die weitere Färbeprozedur wurde wie in Kap. B.2.2 beschrieben durchgeführt.

Die Kombination von Gramfärbung und ELF-Technik erwies sich insofern als problematisch, als viele ELF-Kristalle durch den Ethanol-Waschschritt gelöst und ausgewaschen wurden. Daher wurden die hitzefixierten Proben schon vor dem Färbeschritt mit Epifluoreszenzmikroskopie untersucht, Bildausschnitte von ELF-markierten Organismen mittels digitaler Fotografie dokumentiert und die Koordinaten der Bild-Positionen auf dem Objektträgertisch notiert. Nach der Färbung konnten die Bildausschnitte mit Hilfe dieser Koordinaten wiedergefunden und den gramgefärbten Organismen nach Vergleich mit den zuvor aufgenommenen Bildausschnitten die in situ Aktivität zugeordnet werden.

Kombination mit Fluoreszenz in situ Hybridisierung

Die teflonbeschichteten Objektträger (Paul Marienfeld, Bad Mergentheim) wurden für 1-2 h in einer Spülmittellösung entfettet und anschließend gründlich mit destilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Auf die so vorbehandelten Objektträger wurden die Belebtschlamm- und Schaumproben unmittelbar nach der 1-stündigen Inkubation mit den ELF[®]-97-Substraten aufgetragen. Dazu wurden in die Aussparungen je nach Zelldichte 3-8 µl der Proben pipettiert und an der Luft getrocknet. Die so vorbereiteten Objektträger konnten bis zur Hybridisierungsprozedur über mehrere Wochen bei -20°C ohne nennenswerten Verlust der Fluoreszenzintensität der durch die Enzymaktivität präzipitierten ELF-Kristalle gelagert werden.

Die Hybridisierungsprozedur wurde wie in Kap. B.2.3 beschrieben mit kleinen Veränderungen durchgeführt. Der Entwässerungsschritt in 50%igem, 80%igem und 100%igem Ethanol

wurde aufgrund der Alkohol-Löslichkeit der ELF-Kristalle weggelassen. Die aufgetauten, vorbereiteten Objektträger wurden daher ohne Ethanolreihe für die Hybridisierungsprozedur eingesetzt. Des Weiteren wurde auf die Färbung mit dem Fluoreszenzfarbstoff DAPI verzichtet. DAPI- und ELF-Signale werden mit demselben Filterset betrachtet. Die starke blaue Fluoreszenz der DAPI-Signale erwies sich als störend bei der Detektion der gelb fluoreszierenden ELF-Kristalle. Es wurden die in Kap. B.2.3.4 beschriebenen Oligonukleotidsonden eingesetzt. Die Zuordnung der Enzymaktivität zu den fluoreszenzmarkierten fadenförmigen Organismen erfolgte durch Überlagerung gleicher Epifluoreszenz-Bildausschnitte mit Hilfe der AxioVision Bildverarbeitungssoftware von Zeiss.

3.2.4 Auswahl fadenbildender Organismen

In Tabelle 5 sind die fadenbildenden Organismen aufgelistet, deren in situ Enzymaktivität bestimmt wurde, sowie die Kläranlagen, in denen diese Organismen detektiert wurden.

Bei fadenbildenden Bakterien, die in geringer Häufigkeit vorkamen (Fädigkeitsindex von 1 bis 2), wurden ca. 80-90% der Organismen untersucht. Lag der Filamentindex zwischen 3 und 5, wurden etwa 30-40% der Organismen ausgewertet.

3.3 Monitoring der Lipase-Aktivität von *Microthrix parvicella* während Bekämpfungsmaßnahmen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft (ehemals Wassergüte- und Abfallwirtschaft) der TU München die Wirkung von $AlCl_3$ bei der Bekämpfung von *M. parvicella* in einer halbtechnischen Versuchsanlage untersucht. Dabei wurden von Paris (2004) spezifische Schlammparameter wie die Absetzbarkeit und der Fädigkeitsindex bestimmt, sowie die Auswirkungen der Dosierung auf die Flotationsneigung, die Hydrophobizität des Schlammes und die Morphologie von *M. parvicella* ermittelt. Parallel dazu wurden für die vorliegende Untersuchung die Lipase-Aktivitäten gemessen.

Die Pilotanlage wurde mit Schlamm aus einer niedrigbelasteten kommunalen Kläranlage mit starker Schaumbildung angeimpft, dessen dominanter Fadenorganismus *M. parvicella* war (Paris 2004). Durch Zugabe von langkettigen Fettsäuren (Tween 80; 1,1 Gew.%) zum Zulauf der Anlage (mechanisch vorgeklärtes Abwasser) wurde *M. parvicella* weiter angereichert. Anschließend wurde in einer der beiden Straßen $AlCl_3$ in einer Konzentration von 2,2 g Al/(kg TS · d) zudosiert, während die zweite Straße als Kontrolle diente. Die Dosierung erfolgte über einen Zeitraum von 5 Wochen. Die Lipase-Aktivität wurde für die gesamte Dauer des Versuchs einmal wöchentlich sowohl mittels herkömmlicher Methodik als Gesamtaktivität (siehe Kap. B.3.1.3) als auch mit der in situ Technik als oberflächengebundene Enzymaktivität bestimmt (siehe Kap. B.3.2).

Tabelle 5: Fadenförmige Organismen, die auf in situ Enzymaktivität untersucht wurden (BelS=Belebtschlamm; Phako=Phasenkontrast; Neisser=Neisserfärbung)

Organismus/Morphotyp	Aktivitäts-Zuordnung	Proben BelS	Proben Schaum	Kläranlagen, in denen die Organismen detektiert wurden
<i>Microthrix parvicella</i>	Phako/ Neisser	22	18	GR; BT; AL; LAU; TB
Nocardioforme Actinomyceten	Phako	18	18	M BB1; M BB2; BT; TB
Myc657-positiv	FISH	5	4	M BB1; M BB2; BT; TB
RHOb183-positiv	FISH	5	4	M BB1; M BB2; TB
DIE993-positiv	FISH	3	1	M BB1; M BB2
<i>Nostocoida limicola</i>	Neisser	14	12	M BB1; M BB2; GR; BT; AL; LAU; US
NLIMI 91-positiv	FISH	7	4	M BB1; GR; BT; AL; TB; LAU
NLII65-positiv	FISH	6	2	M BB1; GR; BT; US
NLIMII 175-positiv	FISH	2	0	M BB1; LAU
AHW183-positiv	FISH	7	3	M BB1; GR; BT; LAU
Noli-644-positiv	FISH	2	0	AL; LAU
MC2-649-positiv	FISH	2	0	AL; LAU
PPx3-1428-positiv	FISH	2	0	AL; LAU
Typ 0041/0675	Phako	43	29	M BB1; M BB2; GR; BT; AL; LAU; TB; US
TM7905-positiv	FISH	11	7	M BB1; M BB2; GR; BT; AL; LAU; TB; US
TM7305-positiv	FISH	6	2	M BB1; M BB2; GR; BT; AL; LAU; TB; US
Typ 1851	Phako	8	3	GR; LAU; TB
CHL1851-positiv	FISH	12	5	GR; AL; LAU; TB; US
Typ 0092	Neisser	14	6	GR; BT; AL; LAU
<i>Isosphaera</i> spp.	Phako	13	10	M BB2; AL; LAU; TB
NLIMIII 301-positiv	FISH	3	2	M BB2; TB; US
<i>Haliscomenobacter hydrossis</i>	Phako	14	2	M BB1; M BB2; GR; BT; AL; LAU; TB; US
HHY-positiv	FISH	12	4	M BB1; M BB2; GR; BT; AL; LAU; TB; US
Typ 021N	Phako	2	1	BT; TB; US
21N-positiv	FISH	6	3	BT; TB; US
<i>Thiothrix</i> spp. (TNI-positiv)	FISH	7	2	M BB1; M BB2; GR; BT; TB; US
Typ 0961	Phako	2	1	TB; US
Typ 1863 (ACA23a-positiv)	FISH	7	4	GR; BT; TB
<i>Sphaerotilus natans</i> (SNA-positiv)	FISH	4	1	M BB1; M BB2; GR; BT

4 Isolierung und Charakterisierung fadenbildender Bakterien aus Kläranlagen mit Schaumproblemen

4.1 Lösungen und Selektivmedien

MSV A-Medium (pH 7,2; nach Williams und Unz 1985a):

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	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
K_2HPO_4	0,11 g/l
KH_2PO_4	0,085 g/l
$\text{FeCl}_3 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0,002 g/l
EDTA (Titriplex III)	0,003 g/l
in aqua dest. lösen	

Nach dem Autoklavieren wurden 10 ml/l einer durch ein 0,2 μm -Membranfilter sterilfiltrierten Vitaminlösung (Thiamin 100 $\mu\text{g/l}$; Riboflavin 100 $\mu\text{g/l}$; Cyanocobalamin 5 $\mu\text{g/l}$; Biotin 5 $\mu\text{g/l}$; Pantothanat 100 $\mu\text{g/l}$; Folsäure 5 $\mu\text{g/l}$; Nicotinsäure 100 $\mu\text{g/l}$; Pyridoxin 100 $\mu\text{g/l}$ Endkonzentration im Medium) zugegeben.

Belebtschlammhydrolysat (HA; nach Eikelboom 1975):

Belebtschlamm der zweiten Stufe der kommunalen Kläranlage KA-M wurde auf ein Trockengewicht von 20 g/l eingedickt und unter Zugabe von 10 ml/l 10 N NaOH für 60 min unter Rückflusskühlung gekocht. Nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Neutralisation mit 36 N H_2SO_4 wurde der Schlamm bei 20 000 g für 30 min zentrifugiert und der Überstand anschließend für 15 min bei 121°C autoklaviert.

Um die Menge an organischen Stoffen im Belebtschlammhydrolysat abzuschätzen, wurde der chemische Sauerstoffbedarf (CSB) bestimmt. Der CSB-Wert kennzeichnet die Menge an Sauerstoff (in mg/l), welche zur Oxidation der in der Probe enthaltenen Stoffe verbraucht wird. Er erfasst sowohl biotisch abbaubare als auch biotisch nicht abbaubare organische Stoffe, allerdings auch einige anorganische Stoffe.

Zur Ermittlung des CSB wird die zu untersuchende Probe mit Schwefelsäure stark angesäuert und mit einer ausreichenden Menge des starken Oxidationsmittels Kaliumdichromat ($\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$) erhitzt. Dadurch werden alle in der Probe enthaltenen mit Dichromat oxidierbaren Stoffe oxidiert. Die Menge an verbrauchtem Dichromat wird bestimmt und daraus die äquivalente Menge Sauerstoff berechnet. Für die Bestimmung des CSB-Werts des Belebtschlammhydrolyсата wurde der CSB-Küvettest (Merck) verwendet. 1 ml des entsprechend verdünnten Hydrolyсата wurde in die Küvette pipettiert und 120 min bei 148°C in einem Thermoblock gekocht. Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur erfolgte die photometrische Messung (Photometer SQ 300, Merck) bei 593 nm. Die Bestimmung wurde in Doppelansätzen durchgeführt.

Zur Herstellung von Flüssigmedium wurde das Schlammhydrolysat mit destilliertem Wasser auf einen CSB-Wert von 2 g O_2/l verdünnt und auf einen pH-Wert von 7,2 eingestellt. Nach dem Autoklavieren wurde das Hydrolysat mit 10 ml/l einer durch ein 0,2 μm -Membranfilter

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 (BD) zugegeben.

R2A-Medium (pH 7,2; nach Reasoner und Geldreich 1985):

Bacto Hefe-Extrakt (BD)	0,5 g/l
Bacto Proteosepepton No. 3 (BD)	0,5 g/l
Bacto Casamino Acids (BD)	0,5 g/l
Glucose	0,5 g/l
Lösliche Stärke	0,5 g/l
Natriumpyruvat	0,3 g/l
K ₂ HPO ₄	0,3 g/l
MgSO ₄	0,05 g/l
Bacto Agar (BD)	15 g/l

in aqua dest. lösen; autoklavieren

0,3%iger Weichagar (pH 7,2; nach Trick 1982):

NaCl	5 g/l
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,12 g/l
Phenolrot	0,02 g/l
Bacto Agar (BD)	3 g/l

in aqua dest. lösen; autoklavieren

4.2 Vorbehandlung der Proben

Die Belebtschlämme wurden vorbehandelt, um die Zahl an fadenbildenden Bakterien im Inokulum zu erhöhen. Dies ist notwendig, da viele fadenbildende Bakterien eine relativ niedrige Wachstumsgeschwindigkeit besitzen und während der Kultivierung von anderen, schneller wachsenden Belebtschlammbakterien überwachsen werden.

Die Anreicherung fadenbildender Bakterien erfolgte in Anlehnung an Williams und Unz (1985a). Dazu wurden die Belebtschlamm-Proben 1:5 in MSV A-Medium verdünnt und zur Zerkleinerung der Flocken und Filamente für 15 s mit Ultraschall bei 35 W behandelt. Anschließend wurden die Proben dreimal bei 1900 g für 5 min zentrifugiert, der Überstand jeweils abgegossen 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 fadenbildender 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.

4.3 Isolierungsmethoden

Der Überstand des letzten Zentrifugationsschritts wurde zur Beimpfung der festen Selektivmedien HA und R2A verwendet. Dabei wurden folgende Methoden angewandt.

Plattierungsmethode

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

Weichagarmethode

Aliquots von 1, 2, 5, 10 bzw. 100 μl aus dem Überstand wurden in 2,5 ml 0,3%igem hand-warmem Weichagar suspendiert und auf den Selektivmedien verteilt.

Mikromanipulation

100 μl des Überstands wurden auf die Agaroberfläche der Selektivmedien pipettiert und durch Kippen der Petrischale längs verteilt. Nachdem die Flüssigkeit in den Agar eingezogen war, wurden die Platten unter einem inversen Phasenkontrastmikroskop bei 100facher Gesamtvergrößerung auf die Anwesenheit fadenbildender Bakterien untersucht. Mit Hilfe von über dem Bunsenbrenner fein ausgezogenen Mikronadeln, die in die Halterung eines Mikromanipulators eingespannt wurden, wurden einzelne fadenförmige Bakterien aufgepickt und durch Ziehen über die Agaroberfläche von den übrigen Bakterien isoliert (siehe Abb. 2). Zur späteren Lokalisation dieser Filamente wurden deren Positionen auf der Agaroberfläche markiert. Die markierten Bereiche wurden anschließend mit Hilfe eines sterilen Skalpells ausgeschnitten und auf frische Agarplatten übertragen.

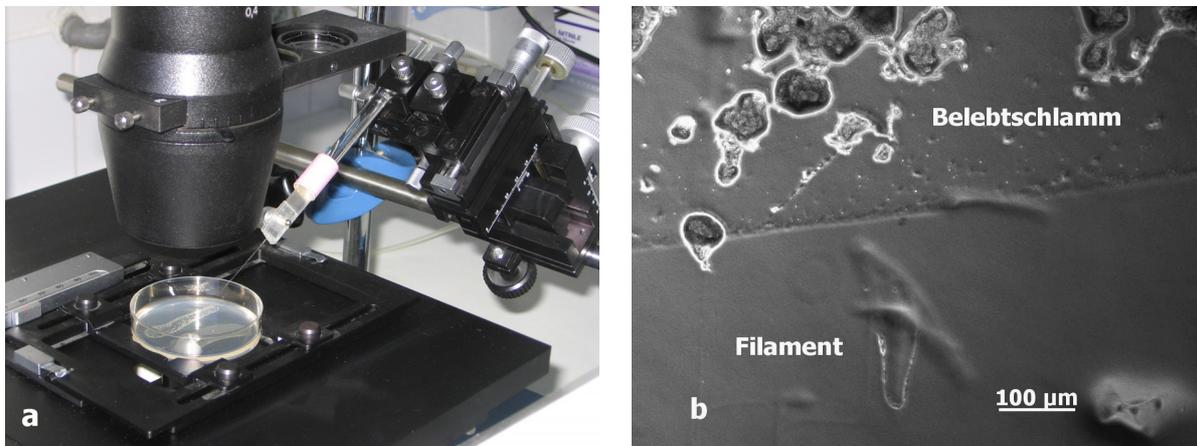


Abb. 2: Mikromanipulation fadenbildender Bakterien. (a) Inverses Phasenkontrastmikroskop mit Mikromanipulator. (b) „Mikromanipuliertes“ Filament; 100fache Vergrößerung

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 waren, erfolgte die Detektion der Kolonien mit Hilfe des inversen Phasenkontrastmikroskops bei 100facher Gesamtvergrößerung. Mit sterilen Mikro-Glaskapillaren wurden die fadenförmigen Kolonien wiederholt auf frische Agarplatten übertragen, bis Reinkulturen vorlagen.

4.4 Stammhaltung

Die isolierten Organismen wurden alle 6-8 Wochen auf frische Agarplatten überimpft und regelmäßig auf Reinheit überprüft. Dauerhaft gelagert wurden die Stämme durch Einfrieren in Dimethylsulfoxid (DMSO). Dazu wurde von den Agarplatten Zellmaterial mit einer sterilen Impföse entnommen und in 1 x PBS-Puffer suspendiert. Anschließend wurde DMSO zugegeben (Endkonzentration 8%), um die Zellen vor Gefrierschäden zu schützen. Die so behandelte Bakteriensuspension wurde in sterile Cryoröhrchen überführt und bei -80°C eingefroren.

4.5 Charakterisierung der isolierten fadenbildenden Reinkulturen

4.5.1 Klassische Florenanalyse

Als Differenzierungskriterien wurden bei der Florenanalyse morphologische Merkmale wie Koloniefarbe und -form sowie Bakterienform und Beweglichkeit mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops bestimmt. Daneben wurden die Gram- sowie die Neisserreaktion untersucht.

4.5.2 Nachweis mittels rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonden

Zur phylogenetischen Analyse der fadenbildenden Bakterien mittels rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonden wurden die Isolate in HA- bzw. R2A-Flüssigmedium angezüchtet, bis ein deutliches Zellwachstum erkennbar war. Anschließend wurden 2 ml der Zellsuspension möglichst während der logarithmischen Wachstumsphase entnommen, um einen ausreichenden Ribosomengehalt in den Zellen zu gewährleisten. Lieferte das Wachstum in den Flüssigmedien nicht genügend Zellmaterial, wurden die Isolate auf festen Nährmedien angezüchtet. Mit einer sterilen Impföse wurde Zellmaterial entnommen und in 1 ml 1 x PBS-Puffer suspendiert.

Nach Zentrifugation für 5 min bei 5000 g wurde der Überstand abgossen und das Zellpellet in 1 ml 1 x PBS-Puffer resuspendiert. Danach wurde erneut zentrifugiert (5000 g; 5 min) und das Pellet in 200 μl 1 x PBS-Puffer aufgenommen. Die Fixierung der Reinkulturen sowie die Hybridisierungsprozedur erfolgte wie in Kap. B.2.3 beschrieben.

4.5.3 Sequenzanalyse der 16S rDNS

Einige der isolierten Bakterienstämme konnten nicht mit Hilfe rRNS-gerichteter Oligonukleotidsonden phylogenetisch identifiziert werden. Diese Isolate wurden anhand der Sequenz ihrer 16S rDNS analysiert. Diese Arbeiten wurden von der Firma Vermicon durchgeführt.

Dazu wurden die Reinkulturen nach Wachstum in Flüssigmedium für 5 min bei 5000 g zentrifugiert, der Überstand abgossen und das Pellet in 1 x PBS-Lösung resuspendiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (5000 g; 5 min) wurde der Überstand erneut verworfen und das Pellet bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren. Die 16S rDNS der isolierten Stämme wurde mit Hilfe der PCR-Technik (Polymerase-Kettenreaktion) amplifiziert und anschließend sequenziert (Snaird et al. 1997). Die erhaltenen 16S rDNS-Sequenzen wurden 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.

5 Physiologische Untersuchungen an den isolierten fadenbildenden Reinkulturen

5.1 Wachstum in komplexen und minimalen Nährmedien

Um die Nährstoffansprüche der isolierten Reinkulturen zu ermitteln, wurde das Wachstum der Bakterienstämme in verschiedenen Nährmedien untersucht. Dabei wurden neben komplexen Nährmedien auch Minimalmedien verwendet, denen verschiedene Kohlenstoff- und Stickstoff-Quellen zugesetzt wurden.

Komplexe Nährmedien

- R2A-Medium (siehe Kap. B.4.1)
- Belebtschlammhydrolysat (siehe Kap. B.4.1)

Minimale Nährmedien

- MSV A-Medium (siehe Kap. B.4.1)
- MSV N-Medium (pH 7,2; modifiziert nach Williams und Unz 1985a)
Die Zusammensetzung entspricht der des MSV A-Mediums (Kap. B.4.1) mit dem Unterschied, dass dem Medium statt $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,6 g/l NaNO_3 zugegeben wurden.

Den Minimalmedien MSV A und MSV N wurden als Kohlenstoffquellen Acetat, Citrat, Tween 80 bzw. Stärke mit einer Endkonzentration von je 0,5 g/l im Testansatz hinzugefügt.

Minimalmedium zur Kultivierung von *Microthrix parvicella* (pH 8,0; nach Slijkhuis 1983a)

Tween 80	4,0 g/l
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0,8 g/l
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$	0,12 g/l
K_2HPO_4	8,2 g/l
KH_2PO_4	0,35 g/l
Lösung I	10 ml/l
Lösung II	10 ml/l
Vitamin-Lösung	10 ml/l
in aqua dest. lösen	

Lösung I (in g/l): $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 7,5; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,3; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,01; $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,01

Lösung II (in g/l): CaCl_2 5,0; $\text{FeCl}_3 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,5; H_3BO_3 0,01; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,005; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ 0,005

Vitamin-Lösung (in mg/l): Thiamin 10; Cyanocobalamin 0,5; pH 3,0; diese wird sterilfiltriert (0,2 μm -Membranfilter) und erst nach dem Autoklavieren zu dem abgekühlten Medium zugegeben.

Für die Wachstumsversuche wurden 25 ml der Flüssignährmedien mit 100 μl der Bakterien-suspension angeimpft und 3-6 Wochen bei 20-22°C auf einem Rotationsschüttler (110 UpM) inkubiert. Die Bakterien-suspension wurde durch Resuspendierung von zellulärem Material in 0,14 M NaCl hergestellt.

Abbau von Kohlenstoffquellen in Mikrotiterplatten

Tabelle 6: Kohlenstoffquellen in GN-Mikrotiterplatten (Biolog, Hayward, USA)

<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	α -Hydroxybuttersäure	Hydroxy-L-prolin
Gentiobiose	β -Hydroxybuttersäure	L-Leucin
α -D-Glucose	γ -Hydroxybuttersäure	L-Ornithin
m-Inositol	p-Hydroxyphenylelessigsäure	L-Phenylalanin
α -Lactose	Itaconsäure	L-Prolin
Lactulose	α -Ketobuttersäure	L-Pyroglutaminsäure
Maltose	α -Ketoglutarsäure	D-Serin
D-Mannitol	α -Ketovaleriansäure	L-Serin
D-Mannose	D,L-Milchsäure	L-Threonin
D-Melibiose	Malonsäure	D,L-Carnithin
β -Methylglucosid	Propionsäure	γ -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	Glycerin	<u>Bromierte Chemikalien</u>
		Brombernsteinsäure
<u>Ester</u>	<u>Amide</u>	
Mono-methylsuccinat	Bernsteinsäuremonoamid	<u>Amine</u>
Methylpyruvat	Glucuronamid	Phenylethylamin
	Alaninamid	2-Aminoethanol
		Putrescin
<u>Polymere</u>	<u>Phosphorylierte Chemikalien</u>	
Glycogen	D,L-Glycerolphosphate	
α -Cyclodextrin	Glucose-1-phosphat	
Dextrin	Glucose-6-phosphat	
Tween 80		
Tween 40		

Der Abbau verschiedener Kohlenstoffquellen wurde darüber hinaus auch in GN-Mikrotiterplatten (Biolog, Hayward, USA) untersucht. In den Platten sind 95 Kohlenstoffsubstrate (Tab. 6) sowie der Redoxindikator Tetrazoliumviolett vorgelegt. Mikrobielle Respiration bei der Verwertung der Kohlenstoffsubstrate wird durch Reduktion der Tetrazoliumsalze zu roten Formazanderivaten angezeigt (Ried 1952).

Die Reinkulturen wurden auf festen Nährmedien angezüchtet, bis genügend Zellmaterial vorhanden war. Anschließend wurden die Bakterien 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 dem Standardbereich eingestellt. Danach wurde die Suspension mit einer sterilen Pipette in ein Reservoir überführt und mit einer 8-Kanal-Pipette in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte pipettiert (150 µl pro Vertiefung). Die Platten wurden bei 20-22°C inkubiert und je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Isolate nach unterschiedlichen Zeiträumen (1 Tag bis 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 (starkes Wachstum).

5.2 Wachstum nach Zugabe von Rhamnolipiden

Mikrobiell produzierte Tenside, sog. Biotenside, können die Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen sowie den Abbau dieser Verbindungen verbessern (Käppeli und Finnerty 1979, Ito und Inoue 1982, Oberbremer et al. 1990, Zhang und Miller 1992). Durch die Zugabe eines von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 produzierten Rhamnolipids sollte der Einfluss auf das Wachstum von *Microthrix parvicella* in vitro untersucht werden. Die Rhamnolipid-Produktion sowie -Extraktion erfolgten in Anlehnung an Zhang und Miller (1992).

5.2.1 Nährmedien

P-Medium (pH 7,2):

Pepton aus Casein (Merck)	0,5 g/l
Fleischextrakt (Merck)	3,0 g/l
in aqua dest. lösen; autoklavieren	

Kay's Minimal Medium (pH 7,2; nach Zhang und Miller 1992):

NH ₄ H ₂ PO ₄	3,0 g/l
K ₂ HPO ₄	2,0 g/l
Glucose	2,0 g/l
MgSO ₄	1,0 g/l
FeSO ₄ · 7 H ₂ O	2,5 mg/l
in aqua dest. lösen; autoklavieren	

PPGAS-Medium (pH 7,2; nach Zhang und Miller 1992):

NH ₄ Cl	1,1 g/l
KCl	1,5 g/l
Tris/HCl	18,9 g/l
Glucose	5,0 g/l
Bacto Proteosepepton No.3 (BD)	10,0 g/l
MgSO ₄	0,2 g/l

in aqua dest. lösen; autoklavieren

5.2.2 Rhamnolipid-Produktion durch *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027

25 ml P-Medium wurden mit dem *Pseudomonas aeruginosa*-Stamm ATCC 9027 beimpft und für 24 h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Zur Induktion der Biotensid-Produktion wurde dann zunächst 1 ml des bewachsenen P-Mediums zu 25 ml Kay's Minimal Medium gegeben 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.

5.2.3 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 12 100 g zentrifugiert und das Pellet in 0,05 M KHCO₃ (pH 8,6) rückgelöst. Nach einer erneuten Ansäuerung auf pH 2,0 wurde nochmals zentrifugiert (12 100 g; 20 min) und das Pellet in 10 ml 0,05 M KHCO₃ (pH 8,6) gelöst.

5.2.4 Bestimmung der Rhamnolipid-Konzentration über L-Rhamnose

Eine Abschätzung der Rhamnolipid-Konzentration erfolgte über eine Messung der L-Rhamnose nach der 6-Desoxyhexose-Methode (Chandrasekaran und BeMiller 1980). 1 ml des Rhamnolipid-Extrakts bzw. einer entsprechenden Verdünnung wurden mit 4,5 ml Schwefelsäure-Lösung (90 ml 97%ige H₂SO₄ + 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 hergestellt), gut durchmischt und 3 h im Dunkeln bei Raumtemperatur 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.

5.2.5 Wachstumsuntersuchungen

25 ml der Flüssignährmedien R2A und HA sowie MSV A und MSV N mit Tween 80 als Kohlenstoffquelle wurden mit dem Rhamnolipid-Extrakt versetzt (Endkonzentration 10 mg/l) und mit 100 µl der Bakteriensuspension beimpft. Die Ansätze wurden für 3-4 Wochen bei

20-22°C auf einem Rotationsschüttler (110 UpM) inkubiert. Die Bakteriensuspension wurde durch Resuspendierung von zellulärem Material in 0,14 M NaCl hergestellt.

Darüber hinaus wurde auch ein Rhamnolipid-Extrakt der Firma Jeneil Biosurfactant Co. (Saukville, WI, USA) verwendet, ein Gemisch der beiden Rhamnolipide α -L-Rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoat (C₂₆H₄₈O₉) und 2-O- α -L-Rhamnopyranosyl- α -L-rhamnopyranosyl- β -hydroxydecanoyl- β -hydroxydecanoat (C₃₂H₅₈O₁₃). Eine weitergehende Analyse des Extrakts durch den Zweckverband Landeswasserversorgung Langenau ergab, dass dieser die Fettsäuren Palmitinsäure, Stearinsäure, Ölsäure und Linolsäure enthielt. Der Extrakt wurde den Flüssignährmedien in Endkonzentrationen von 0,01 bis 100 mg/l zugegeben.

C Ergebnisse

1 In vitro und in situ Enzymaktivitäten in ausgewählten Kläranlagen mit Schaumproblemen

1.1 Bakterienpopulationen in den Kläranlagen KA-M, KA-GR und KA-BT

1.1.1 Zweistufige kommunale Kläranlage KA-M mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten

Schaumbildung

Auf der Denitrifikationszone des **Belebungsbeckens 1 (BB1)** der zweistufigen Anlage KA-M war von Januar bis Anfang Juni 2002 eine kompakte dunkelbraune Schaumschicht mit einem organischen Trockenrückstand (oTR) von 65-70 g/kg vorhanden. Mitte Juni 2002 verschwand diese Schaumschicht und bis zum Abschluss der Untersuchungen im März 2005 wurde im BB1 nur noch ein Schaumereignis Ende November 2003 beobachtet (oTR = 42 g/kg).

Dagegen bildete sich auf dem **Belebungsbecken 2 (BB2)** der KA-M fast über den gesamten Untersuchungszeitraum mit Ausnahme von April bis Mitte September 2003 eine Schaumschicht aus. Von April bis November 2002 hatte der Schaum eine lockere und instabile Konsistenz verbunden mit einer im Vergleich zum BB1 geringen Biomassekonzentration (oTR = 15-20 g/kg). Im Januar und Februar 2003 dagegen entwickelte sich ein stabiler und kompakter Schaum mit deutlich höherer Biomasse (oTR = 40-50 g/kg). Die Schaumereignisse von Mitte September bis November 2003 waren ebenfalls mit einem stabilen und kompakten Schaum verbunden (oTR = 30-40 g/kg). Bei den Untersuchungen im April 2004 wies der Schaum eine fast tensidschaumartige Konsistenz mit sehr vielen Gasblasen auf. Im mikroskopischen Bild war nur eine geringe Bakterienbiomasse zu erkennen. Dennoch lag der organische Trockenrückstand mit ca. 45 g/kg relativ hoch. Im August 2004 war die Bakterienbiomasse wieder deutlich höher. Der Schaum war sehr instabil, fiel schnell zusammen und zeigte mit nur 10 g/kg einen sehr niedrigen organischen Trockenrückstand. Die Schaumschicht im November 2004 war wieder kompakt und stabil mit einem oTR von 52 g/kg.

Charakterisierung der Population fadenbildender Bakterien mit klassischer Mikroskopie (KM)

Die Dichte der fadenbildenden Bakterien im Belebtschlamm der **ersten Stufe** der KA-M lag über den gesamten Untersuchungszeitraum bei einem Fädigkeitsindex (FI) von 1 bis 3. Von Januar bis April 2002 dominierten grampositive gebogene Stäbchen, die als kurze, unverzweigte Fäden oder in Zellclustern wuchsen mit einer Häufigkeit von 3 (Abb. 3). Diese gehören zu den nocardioformen Actinomyceten, wurden aber zur Unterscheidung von den typisch verzweigten nocardioformen Actinomyceten als Actinomyceten-ähnliche Organismen bezeichnet. Im weiteren Verlauf kamen sie nur noch untergeordnet mit Häufigkeiten von 1 bis 2 vor. Des Weiteren fanden sich zahlreiche verschiedene fadenförmige Organismen in geringer Dichte, u.a. nocardioforme Actinomyceten mit rechtwinklig verzweigter Morphologie (*Gordonia amarae*-Like Organisms; GALO), *Haliscomenobacter hydrossis*, Typ 1863, Typ 1701, *Sphaerotilus natans*, *Nostocoida limicola* sowie Typ 0041/0675. Die beiden Schaumereignisse auf dem BB1 im Januar und April 2002 waren mit einer Anreicherung Actinomyceten-ähnlicher Organismen verbunden, die mit einer Häufigkeit von 4 dominierten (Abb. 3).

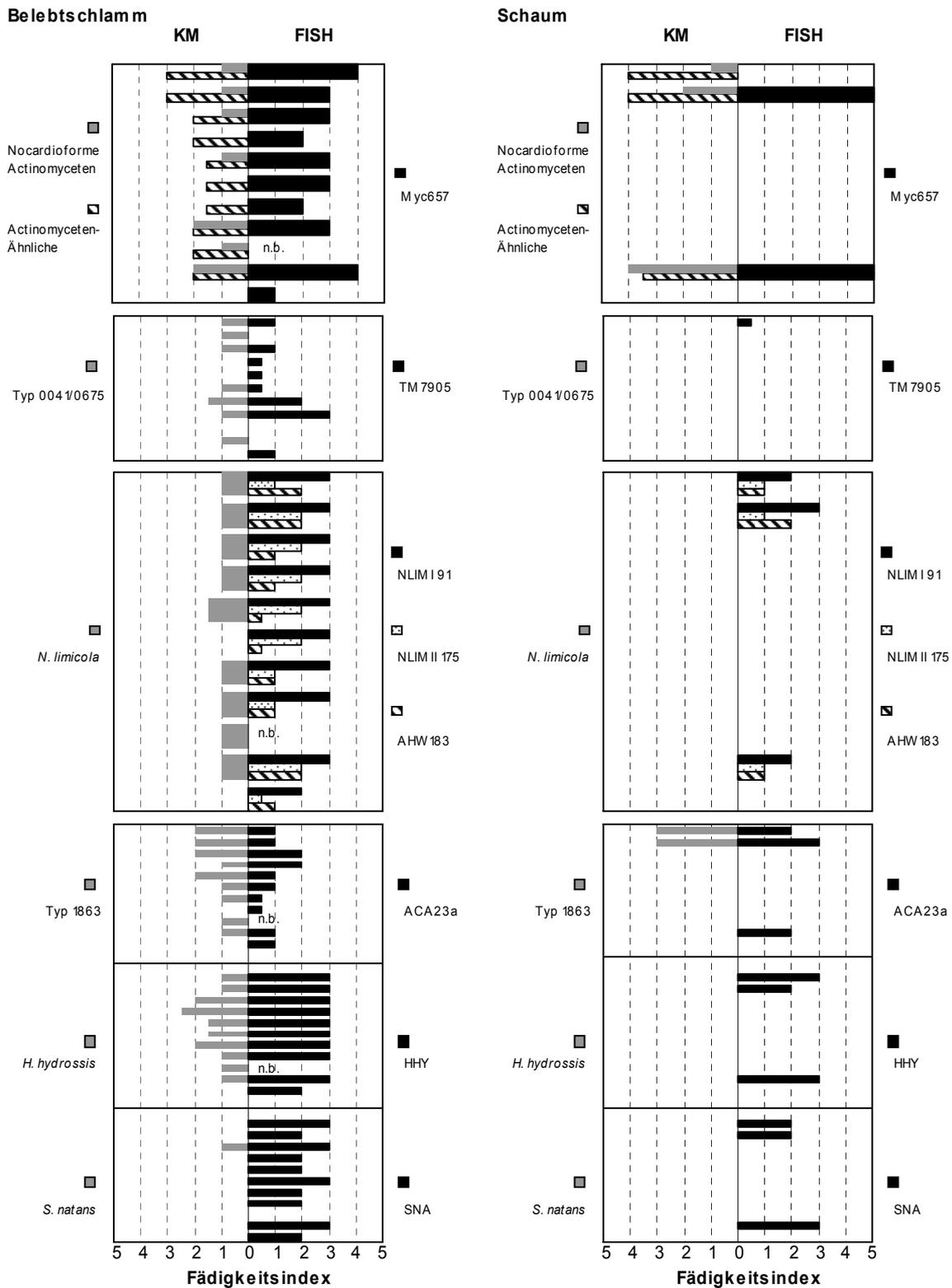


Abb. 3: Population fadenbildender Bakterien im Belebtschlamm und Schaum der ersten Stufe der KA-M. Vergleich von klassischer Mikroskopie (KM) und FISH. Probenahmen (jeweils von oben nach unten): 22.01.02 / 09.04.02 / 18.06.02 / 05.11.02 / 27.01.03 / 06.05.03 / 18.09.03 / 06.10.03 / 04.11.03 / 25.11.03 / 09.11.04; n.b.: nicht bestimmt; dargestellt sind über den gesamten Untersuchungszeitraum regelmäßig vorkommende Fadenbildner

Daneben war dort auch Typ 1863 angereichert. Im November 2003 dominierten in der Schaumfraktion nocardioforme Actinomyceten (GALO) mit einer Häufigkeit von 4, aber auch die Zahl Actinomyceten-ähnlicher Organismen war im Vergleich zum Belebtschlamm deutlich erhöht.

Im Belebtschlamm der **zweiten Stufe** der KA-M lag die Dichte fadenbildender Bakterien ebenfalls bei einem Fädigkeitsindex von 1 bis 3. Die Schlammfädigkeit wurde vor allem durch den Fadentyp 0041/0675 verursacht (Abb. 4). Im November 2003 dominierten nocardioforme Actinomyceten (GALO), die sonst nur untergeordnet vorkamen. Regelmäßig, aber nur in geringer Häufigkeit, wurden *Isosphaera* spp. beobachtet.

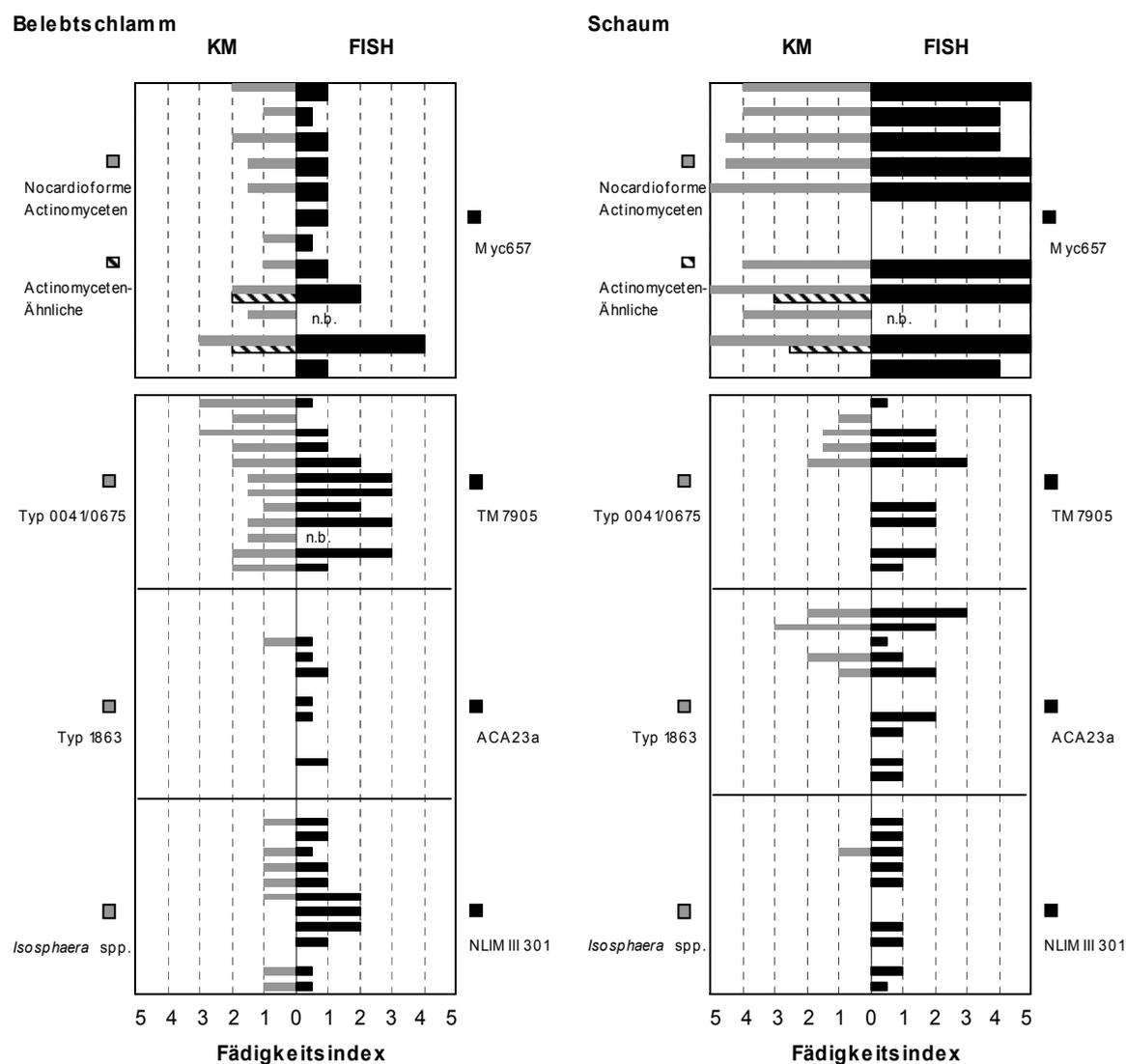


Abb. 4: Population fadenbildender Bakterien im Belebtschlamm und Schaum der zweiten Stufe der KA-M. Vergleich von klassischer Mikroskopie (KM) und FISH. Probenahmen (jeweils von oben nach unten): 10.04.02 / 25.06.02 / 05.11.02 / 27.01.03 / 25.02.03 / 06.05.03 / 11.09.03 / 18.09.03 / 06.10.03 / 04.11.03 / 25.11.03 / 09.11.04; n.b.: nicht bestimmt; dargestellt sind über den gesamten Untersuchungszeitraum regelmäßig vorkommende Fadenbildner

Die Schaumfraktion wurde immer von verzweigten Actinomyceten (GALO) dominiert, die im Vergleich zum Belebtschlamm massiv angereichert waren. Die Zelldichte unverzweigter

Actinomyceten-ähnlicher Organismen war dagegen nur selten im Schaum erhöht. Im Juni 2002 fällt weiterhin die Anreicherung des Fadentyps 1863 mit Häufigkeit 3 auf.

Charakterisierung der Population fadenbildender Bakterien mit FISH

Die Charakterisierung der Biozöosen mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) lieferte weitergehende Informationen über die Zusammensetzung der **Actinomyceten-Population**. Es wurden neben der Oligonukleotidsonde Myc657, die sowohl verzweigte als auch unverzweigte nocardioforme Actinomyceten erfasst, auch die spezifischen Sonden DIE993 (*Dietzia* spp.), RHOa429 (*Rhodococcus* spp. Cluster A), RHOb183 (*Rhodococcus* sp. Cluster B) sowie R.ery619 (*Rhodococcus erythropolis*) eingesetzt. Im Belebtschlamm der **ersten Stufe** der KA-M wurden mit der Myc657-Sonde in der Regel Actinomyceten-Häufigkeiten von 2 bis 4 identifiziert (Abb. 3). Die unverzweigten Actinomyceten-ähnlichen Organismen wurden mit der Sonde DIE993 als *Dietzia* spp. charakterisiert. Rhodokokken wurden dort entweder nicht oder nur in sehr geringer Häufigkeit gefunden (Abb. 5). Die Schaumfraktion von Januar und April 2002 zeigte eine deutliche Anreicherung der *Dietzia*-Population. Die im November 2003 im Schaum dominierenden verzweigten nocardioformen Actinomyceten wurden mittels FISH als *Rhodococcus* sp. Cluster B identifiziert, die bis zu diesem Zeitpunkt weder im Belebtschlamm noch im Schaum des BB1 beobachtet wurden. Bei den unverzweigten Actinomyceten-ähnlichen Organismen handelte es sich wiederum um *Dietzia* spp. (Abb. 5).

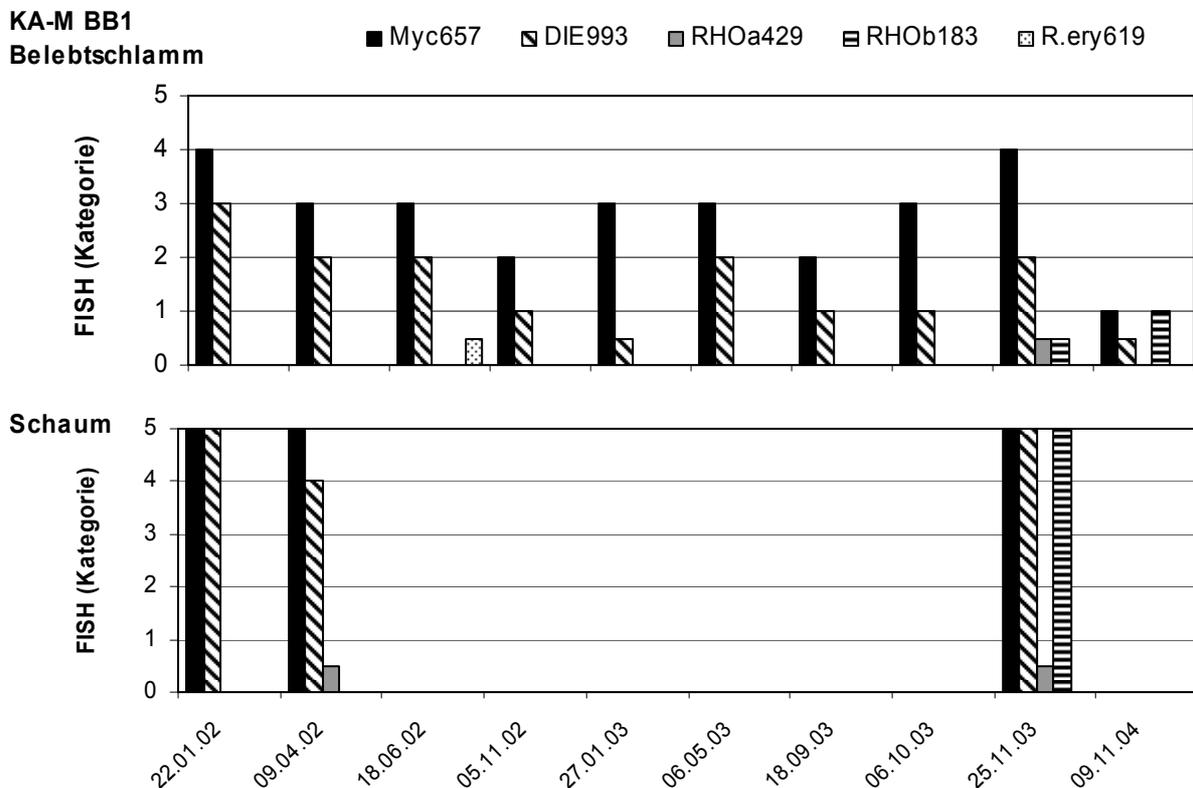


Abb. 5: Charakterisierung der Population nocardioformer Actinomyceten mittels spezifischer Oligonukleotidsonden in der ersten Stufe der KA-M

Im Belebtschlamm der **Stufe 2** der KA-M wurden, mit Ausnahme von Oktober bis November 2003, nocardioforme Actinomyceten mit der Sonde Myc657 meist nur mit geringer Häufigkeit 1 detektiert (Abb. 4). Wie bereits bei der mikroskopischen Schlammanalyse festgestellt wurde, lag die Häufigkeit der nocardioformen Actinomyceten im November 2003 deutlich höher und wurde mit Myc657 mit Kategorie 4 bewertet. Im Schaum war über den gesamten Untersuchungszeitraum eine sehr starke Anreicherung verzweigter nocardioformer Actinomyceten (GALO) zu erkennen. Die weitergehende Analyse mit den gattungsspezifischen Sonden ergab, dass von April bis Juni 2002 *Rhodococcus* spp. Cluster A dominierten (Abb. 6). Von November 2002 bis Februar 2003 wurde zusätzlich *Rhodococcus* sp. Cluster B beobachtet, der etwa in gleicher Häufigkeit wie *Rhodococcus* spp. Cluster A vorkam. Die Schaumereignisse zwischen Mitte September und November 2003 wurden von *Rhodococcus* sp. Cluster B dominiert, während *Rhodococcus* spp. Cluster A nur mit geringer Häufigkeit detektiert wurden. Unverzweigte *Dietzia* spp. waren in dieser Stufe nur in geringer Zahl vorhanden (Abb. 6).

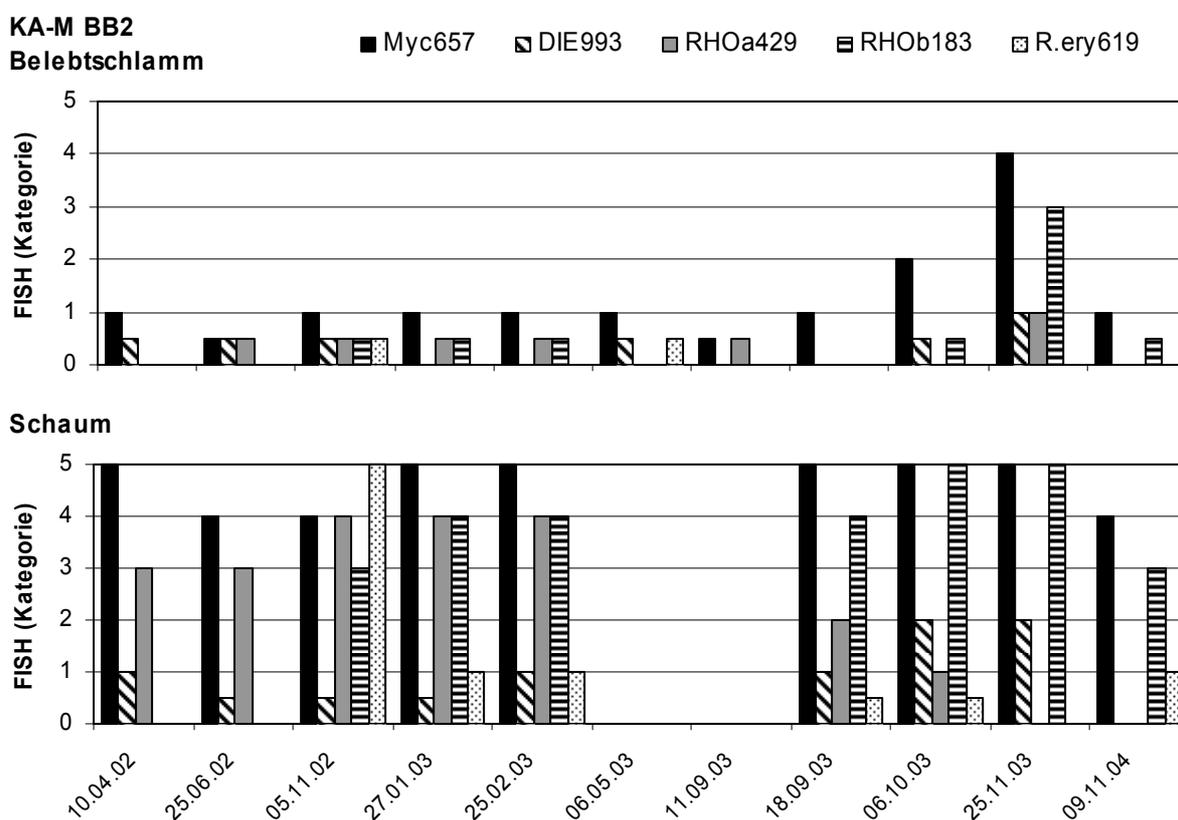


Abb. 6: Charakterisierung der Population nocardioformer Actinomyceten mittels spezifischer Oligonukleotidsonden in der zweiten Stufe der KA-M

ACA23a-positive Filamente des **Typs 1863** waren im Belebtschlamm der **ersten Stufe** regelmäßig vorhanden, allerdings meist nur in geringer Häufigkeit 1, selten mit Häufigkeit 2. Es war bei allen drei Schaumereignissen im Januar und April 2002 sowie November 2003 eine Anreicherung in der Schaumfraktion auf Häufigkeit 2 bis 3 zu beobachten (Abb. 3). Im Belebtschlamm der **zweiten Stufe** waren ACA23a-positive Organismen des Typs 1863 nur in sehr geringer Zahl zu finden. Im Schaum wurde im April und Juni 2002 sowie im Februar und September 2003 eine deutliche Anreicherung auf Häufigkeit 2 bis 3 festgestellt (Abb. 4).

Sphaerotilus natans (Sonde SNA) wurde kontinuierlich sowohl im Belebtschlamm als auch im Schaum der **ersten Stufe** mit Kategorie 2 bis 3 gefunden (Abb. 3). Diese Häufigkeiten liegen etwas höher als die mit klassischer Mikroskopie ermittelten. Im **BB2** wurde *S. natans* sowohl mit FISH als auch mit klassischer Mikroskopie nicht oder nur kaum entdeckt. Da dieser Organismus ein typisches Hochlastbakterium ist, ist sein Vorkommen in der hochbelasteten Stufe 1 leicht erklärbar.

Der Morphotyp *Nostocoida limicola* setzt sich aus einer Reihe verschiedener taxonomischer Gruppen zusammen. Daher reicht zu einer eindeutigen Identifizierung klassische Mikroskopie allein nicht aus. Mit Hilfe von Oligonukleotidsonden ist eine genauere Zuordnung möglich. Der Einsatz der verschiedenen Sonden für *Nostocoida limicola* ergab ein regelmäßiges Vorkommen der Organismen im Belebtschlamm des **BB1**. *N. limicola*-Organismen aus dem *Firmicutes*-Phylum (Sonde NLIMI 91) wurden mit Kategorie 3 gefunden, aus der Klasse der *Actinobacteria* (Sonde NLIMII 175) und aus dem *Chloroflexi*-Phylum (Sonde AHW183) mit Kategorie 1-2 (Abb. 3). Die Sonde NLIMIII 301, die laut Liu und Seviour (2001) Organismen des Morphotyps *Nostocoida limicola* aus der Ordnung *Planctomycetales* detektiert, lieferte im Belebtschlamm und im Schaum der **zweiten Stufe** lediglich mit *Isosphaera* spp. positive Signale. Diese wurden dort bereits mit klassischer Mikroskopie identifiziert (Abb. 4).

Die Sonde TM7905 detektiert einen Teil der fadenbildenden Organismen des **Typs 0041/0675**. Vor allem im Belebtschlamm, aber auch im Schaum des **BB2** wurden zahlreiche TM7905-positive 0041/0675-Filamente nachgewiesen, deren Häufigkeiten überwiegend zwischen 2 und 3 lagen (Abb. 4). Dies stimmt mit den Ergebnissen der klassischen Mikroskopie überein, die bereits zeigten, dass v.a. dieser Organismus für die Fädigkeit im Belebtschlamm der zweiten Stufe verantwortlich ist.

1.1.2 Einstufige kommunale Kläranlage KA-GR mit Dominanz von *Microthrix parvicella*

Schaumbildung

Auf dem Belebungsbecken der einstufigen Anlage KA-GR war über den gesamten Untersuchungszeitraum von Januar 2003 bis März 2005 eine stabile und kompakte Schaumbildung vorhanden mit einem organischen Trockenrückstand von 30–40 g/kg.

Charakterisierung der Population fadenbildender Bakterien mit klassischer Mikroskopie (KM)

In der Anlage KA-GR war über den gesamten Untersuchungszeitraum *Microthrix parvicella* der dominierende Organismus mit einem Fädigkeitsindex von 3 bis 4 im Belebtschlamm bzw. 4 bis 5 im Schaum (Abb. 7). Im Juli 2003 wurde der Belebtschlamm neben *M. parvicella* von dem Fadenbildner Typ 0092 dominiert, der mit Häufigkeit 3 zu finden war. In der Schaumfraktion lag der Fädigkeitsindex von Typ 0092 zu diesem Zeitpunkt ebenfalls bei 3. Auch an den übrigen Untersuchungstagen wurde dieser Morphotyp im Belebtschlamm regelmäßig mit Häufigkeiten von 1 bis 3 detektiert, ebenso wie im Schaum zwischen März 2004 und März 2005. Kontinuierlich, aber mit einem niedrigeren Fädigkeitsindex von 1 bis 2, wurden die Morphotypen 0041/0675 und 1851 sowie *N. limicola* im Belebtschlamm nachgewiesen.

Charakterisierung der Population fadenbildender Bakterien mit FISH

Durch den Einsatz der Fluoreszenz in situ Hybridisierung unter Anwendung der Sonden MPA60, MPA223 und MPA645 (MPA-Mix), die Candidatus *Microthrix parvicella* detektieren, wurde dessen Dominanz und große Häufigkeit bestätigt, die im Belebtschlamm bei Kategorie 4 und im Schaum bei Kategorie 5 lag (Abb. 7). Die Ergebnisse von klassischer Mikro-

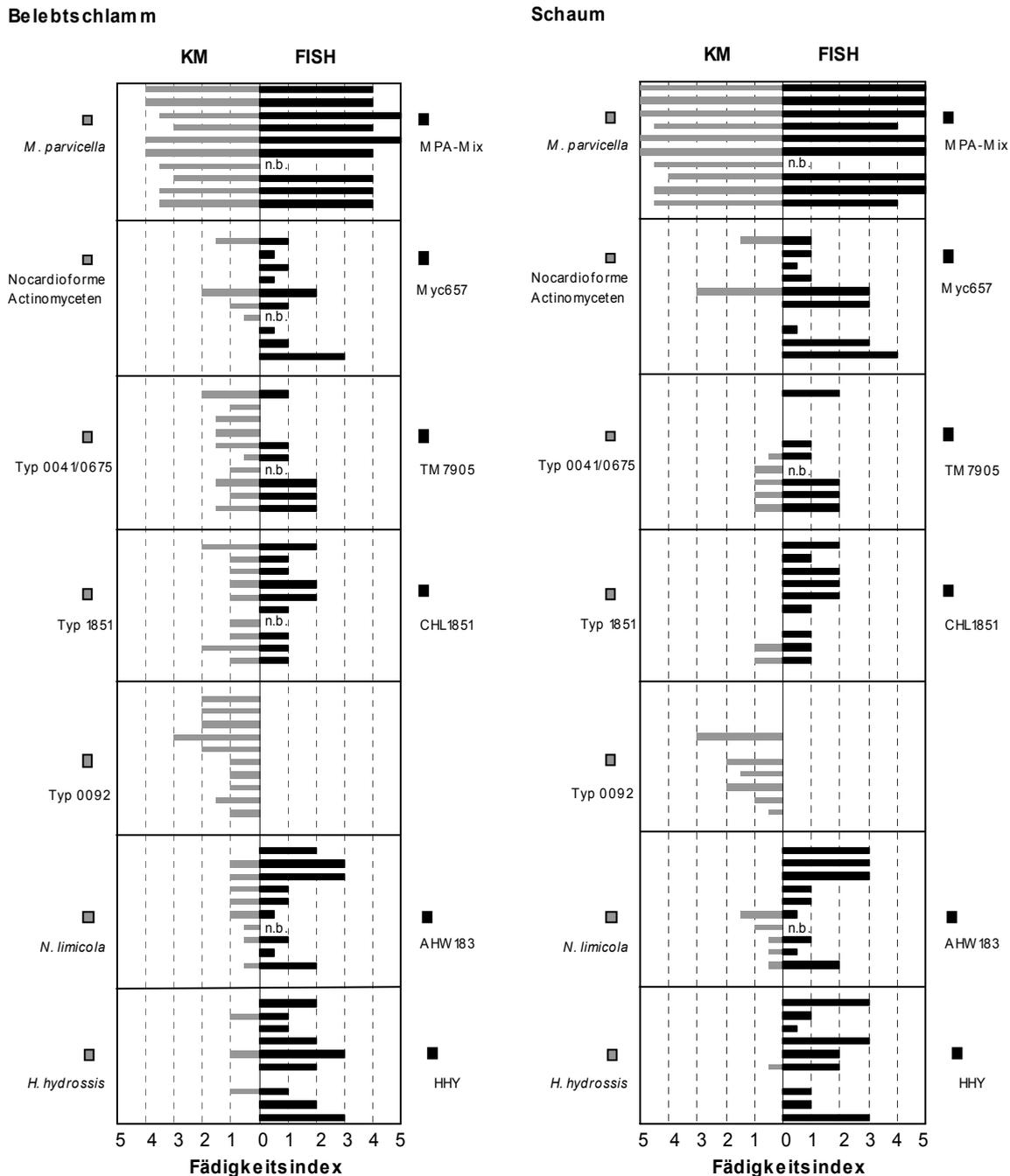


Abb. 7: Population fadenbildender Bakterien im Belebtschlamm und Schaum der KA-GR. Vergleich von klassischer Mikroskopie (KM) und FISH. Probenahmen (jeweils von oben nach unten): 14.01.03 / 27.02.03 / 08.05.03 / 28.07.03 / 19.11.03 / 01.03.04 / 11.05.04 / 16.08.04 / 02.11.04 / 15.03.05; n.b.: nicht bestimmt; dargestellt sind über den gesamten Untersuchungszeitraum regelmäßig vorkommende Fadenbildner

skopie und FISH weisen somit eine relativ gute Übereinstimmung auf. **Nocardioforme Actinomyceten** wurden im Belebtschlamm mit der Sonde Myc657 meist nur wenige identifiziert. Eine Ausnahme bilden die Probenahmen von November 2003 und März 2005, wo deren Häufigkeit 2 bzw. 3 betrug. Im Schaum wurde zwischen November 2003 und März 2005 mehrfach eine Anreicherung nocardioformer Actinomyceten gegenüber dem Belebtschlamm auf Kategorie 3, im März 2005 sogar auf Kategorie 4, festgestellt (Abb. 7). Die Anwendung gatungsspezifischer Sonden zeigte, dass es sich dabei vorwiegend um *Dietzia* spp. handelte. Der Vergleich mit den Ergebnissen der klassischen Schlammanalyse zeigt, dass diese im mikroskopischen Bild aufgrund ihrer unverzweigten Morphologie häufig übersehen und damit zahlenmäßig unterschätzt wurden.

Der **Fadentyp 1851** wurde konstant über den gesamten Untersuchungszeitraum im Belebtschlamm sowie im Schaum mit Hilfe der Sonde CHL 1851 mit Häufigkeiten von 1 bis 2 detektiert, wobei keine Anreicherung des Organismus im Schaum stattfand. Mit klassischer Mikroskopie wurde Typ 1851 ebenfalls regelmäßig im Belebtschlamm nachgewiesen, allerdings im Schaum häufig übersehen (Abb. 7). *Haliscomenobacter hydrossis* wurde mit der Sonde HHY ebenfalls kontinuierlich in der Schlamm- und Schaumfraktion mit Häufigkeiten zwischen 1 und 3 gefunden. Dagegen wurde dieser Faden mit der klassischen Methode oftmals übersehen oder unterschätzt (Abb. 7). Beim Einsatz der verschiedenen *Nostocoida limicola*-Sonden war das konstante Auftreten von *N. limicola*-Organismen aus dem *Chloroflexi*-Phylum (Sonde AHW183) mit teilweise beachtlicher Fädigkeit bis zu Häufigkeit 3 auffallend. Auch dieser Organismus wurde im mikroskopischen Bild z.T. unterschätzt, v.a. im Schaum (Abb. 7).

1.1.3 Einstufige kommunale Kläranlage KA-BT mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten und *Microthrix parvicella*

Schaumbildung

Die einstufige Anlage KA-BT wurde von Mai 2003 bis Oktober 2004 beprobt. Es bildete sich bis Mai 2004 eine feste und stabile Schaumschicht auf dem Belebungsbecken aus mit einer Biomassekonzentration von 35–50 g o TR/kg. Nach Inbetriebnahme der umgebauten Anlage Mitte 2004 war nur noch eine geringe Schaumbildung mit einem organischen Trockenrückstand von 25–45 g/kg zu beobachten.

Charakterisierung der Population fadenbildender Bakterien mit klassischer Mikroskopie (KM)

Zwischen Mai 2003 und Mai 2004 wurde der Schaum wechselweise von *Microthrix parvicella*, verzweigten nocardioformen Actinomyceten (GALO) und unverzweigten Actinomyceten-ähnlichen Organismen dominiert (Abb. 8). Im Juli 2003 dominierte *M. parvicella* mit einem Fädigkeitsindex von 4 bis 5. Nocardioforme Actinomyceten (GALO) waren im Mai 2003 sowie Februar und Mai 2004 mit einer Häufigkeit von 4 bzw. 5 die dominierenden Organismen. Im Mai 2003 wurden neben nocardioformen Actinomyceten auch Actinomyceten-ähnliche Organismen mit einer Häufigkeit von 4 detektiert. Letztere dominierten im November 2003 die Fadenbildnergemeinschaft mit einer Häufigkeit von 3.

Im Belebtschlamm wurde *M. parvicella* im Mai und Juli 2003 mit einer Häufigkeit von 3, im weiteren Verlauf bis Mai 2004 mit Häufigkeit 2 gefunden. Nocardioforme Actinomyceten

(GALO) sowie Actinomyceten-ähnliche Organismen waren über den gesamten Untersuchungszeitraum im Belebtschlamm nur in geringer Zelldichte mit Häufigkeit 1 bis 2 zu beobachten.

Nach Inbetriebnahme der umgebauten Anlage Mitte 2004 war wieder *M. parvicella* der dominierende fadenbildende Organismus im Belebtschlamm und im Schaum mit einem Fädigkeitsindex von 3 bis 4 bzw. 2 bis 3.

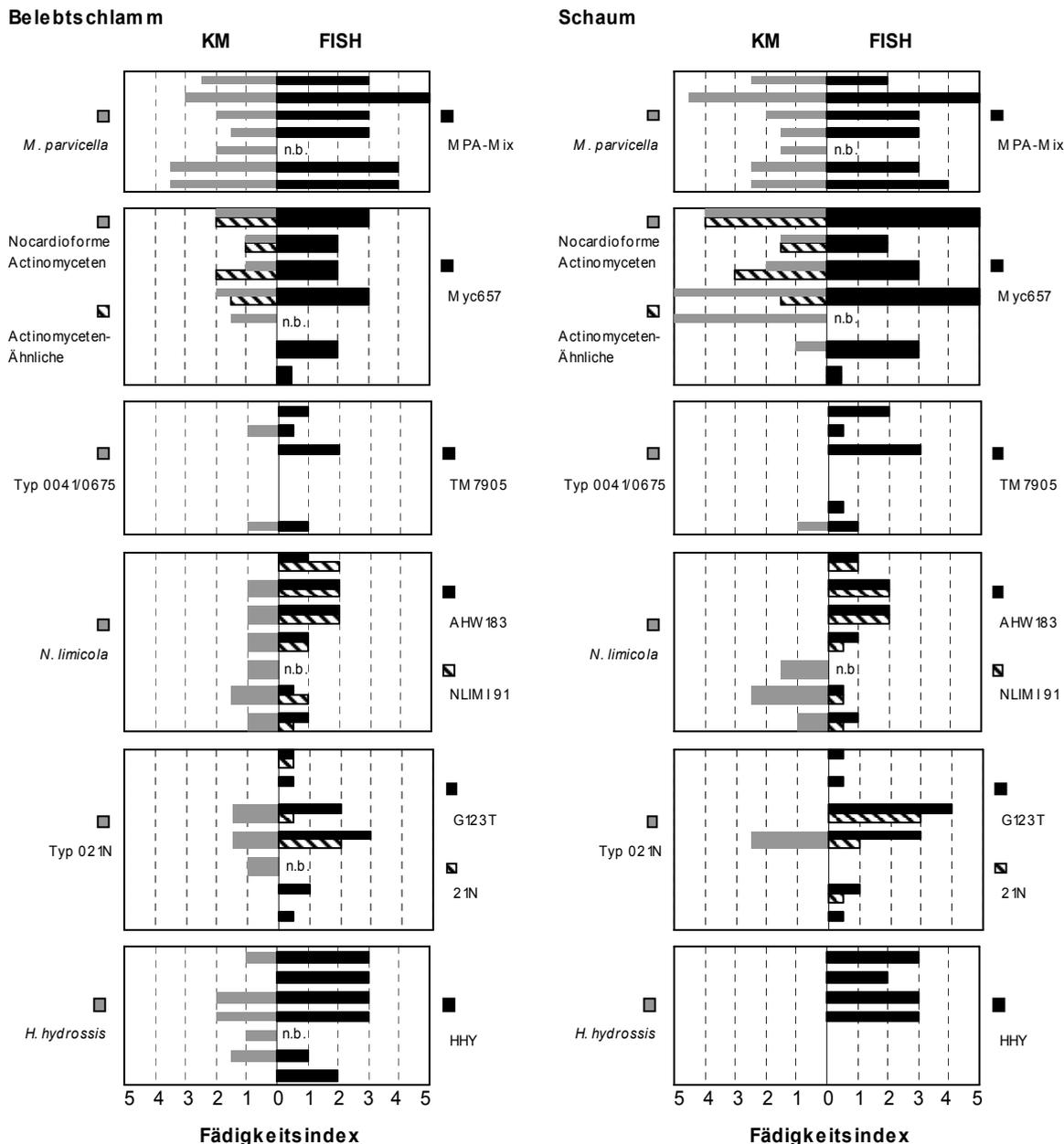


Abb. 8: Population fadenbildender Bakterien im Belebtschlamm und Schaum der KA-BT. Vergleich von klassischer Mikroskopie (KM) und FISH. Probenahmen (jeweils von oben nach unten): 13.05.03 / 23.07.03 / 11.11.03 / 18.02.04 / 04.05.04 / 10.08.04 / 27.10.04; n.b.: nicht bestimmt; dargestellt sind über den gesamten Untersuchungszeitraum regelmäßig vorkommende Fadenbildner

Charakterisierung der Population fadenbildender Bakterien mit FISH

Mit FISH wurden für *M. parvicella* (Sonde MPA-Mix) und **nocardioforme Actinomyceten** (Sonde Myc657) ähnliche Ergebnisse erhalten wie mit der klassischen Mikroskopie, z.T. wurden mit FISH etwas höhere Kategorien ermittelt (Abb. 8). Der Verlauf hinsichtlich der Dominanz sowie der Zu- und Abnahme von Häufigkeiten war im Großen und Ganzen für beide Methoden gleich. Durch Einsatz der gattungs- bzw. artspezifischen Actinomyceten-Sonden wurden die Actinomyceten-ähnlichen Organismen als *Dietzia* spp., die verzweigten Actinomyceten als *Rhodococcus erythropolis* charakterisiert, die im Schaum beträchtlich angereichert waren (Abb. 9). Weiterhin fällt auf, dass im August 2004 nach Inbetriebnahme der umgebauten Anlage im Schaum zahlreiche Myc657-positive Actinomyceten detektiert wurden, die mit der klassischen Mikroskopie stark unterschätzt worden waren. Diese Organismen konnten jedoch nicht genauer charakterisiert werden, da die Anwendung der spezifischen Sonden ergab, dass es sich weder um *Dietzia* spp. noch um *Rhodococcus* spp. Cluster A, *Rhodococcus* sp. Cluster B oder *Rhodococcus erythropolis* handelte, die nur in ganz geringen Häufigkeiten vorkamen.

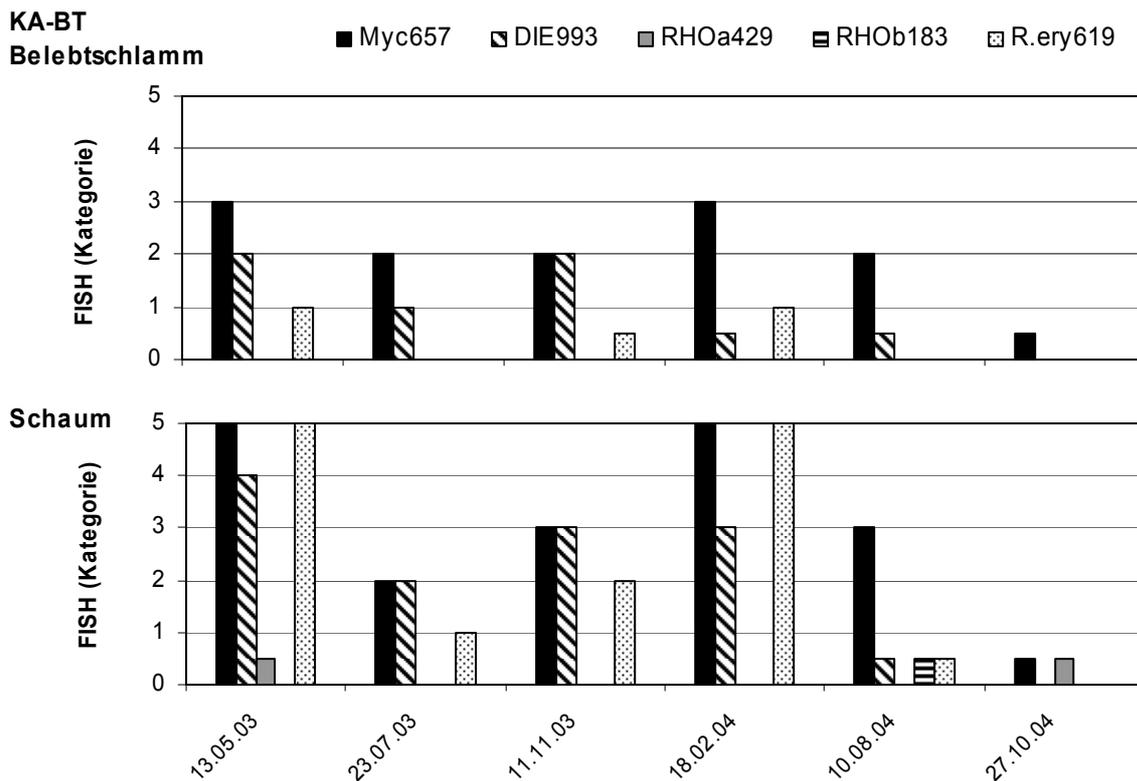


Abb. 9: Charakterisierung der Population nocardioformer Actinomyceten mittels spezifischer Oligonukleotidsonden in der KA-BT

Bis Februar 2004 wurde im Belebtschlamm und im Schaum durchgehend *Haliscomenobacter hydrossis* identifiziert, meist mit einer Häufigkeit von 3. Mit der klassischen Methode wurde dieser Organismus jedoch häufig unterschätzt oder sogar übersehen (Abb. 8). Die regelmäßig im mikroskopischen Bild untergeordnet entdeckten Fadenbildner vom Morphotyp *Nostocoida limicola* wurden mit FISH näher charakterisiert. Am häufigsten wurden positive Signale mit

den Sonden NLIMI 91 (*Firmicutes*-Phylum) und AHW183 (*Chloroflexi*-Phylum) mit Häufigkeit 1 bis 2 nachgewiesen (Abb. 8). *N. limicola*-Organismen, die zu den *Actinobacteria* gehören und mit den Sonden NLIMII 175 und NLII65 detektiert wurden, waren selten. Eine Ausnahme bildet das Schaumereignis im Juli 2003, bei dem NLIMII 175-positive Organismen mit einer Häufigkeit von 3 angereichert waren (nicht dargestellt). Signale mit den Sonden TM7905 und TM7305, die einen Teil der **Typ 0041/0675**-Filamente detektieren, waren meist nur mit geringer Häufigkeit 1 zu finden. Lediglich im November 2003 waren TM7905-positive Organismen des Typs 0041/0675 mit größerer Häufigkeit im Belebtschlamm mit Kategorie 2 und angereichert im Schaum mit Kategorie 3 vorhanden (Abb. 8). Dies wurde mittels FISH, nicht aber im mikroskopischen Bild beobachtet. In den Monaten November 2003 und Februar 2004 fällt weiterhin die hohe Zelldichte G123T-positiver Organismen auf, die im Belebtschlamm mit Kategorie 2 bzw. 3 und im Schaum mit Kategorie 4 bzw. 3 vorkamen. Sowohl zuvor als auch danach waren diese Fadenbildner kaum zu entdecken. Diese Sonde detektiert verschiedene *Thiothrix*-Arten wie *T. eikelboomii*, *T. nivea*, *T. unzii*, *T. fructosivorans* und *T. defluvii* sowie **Typ 021N**. Die Hybridisierung mit der Sonde 21N zeigte, dass im November 2003 nur ein geringer Teil der G123T-positiven Organismen im Belebtschlamm dem Typ 021N angehörte. Im Schaum dagegen waren diese stark angereichert und entsprachen in ihrer Häufigkeit fast vollständig den G123T-positiven Filamenten. Im Gegensatz dazu war im Februar 2004 ein Großteil der G123T-positiven Organismen des Belebtschlammes auch 21N-positiv, während im Schaum die Zahl 21N-positiver Fadenbildner zurückging (Abb. 8).

1.2 In vitro Gesamtzymaktivitäten

1.2.1 Protease-Aktivität

1.2.1.1 Zweistufige kommunale Kläranlage KA-M mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten

Die Ergebnisse der Protease-Aktivitätsbestimmungen in der zweistufigen kommunalen Kläranlage KA-M sind in den Abbildungen 10 und 11 dargestellt. Im Belebtschlamm der **ersten Stufe** (BB1) lagen die Protease-Aktivitäten meist zwischen 12-18 mg Trp/(g oTR · h), nur im Oktober 2003 wurde mit 8 mg Trp/(g oTR · h) eine deutlich niedrigere Aktivität ermittelt. Bei den Schaumereignissen Anfang 2002 sowie im November 2003 wurden mit 3,5-4,5 mg Trp/(g oTR · h) nur sehr geringe Umsatzraten in den Schaumfraktionen gemessen, die wesentlich niedriger als die der entsprechenden Schlammfraktionen waren.

Die Protease-Aktivitäten im Belebtschlamm der **zweiten Stufe** (BB2) lagen in derselben Größenordnung wie im BB1 und schwankten meist zwischen 11-18 mg Trp/(g oTR · h). Die geringsten Aktivitäten wurden hier im Juni 2002 mit Werten von 6-7 mg Trp/(g oTR · h) beobachtet. Im Schaum wurden in der Regel Umsatzraten zwischen 4-11 mg Trp/(g oTR · h) ermittelt, mit Ausnahme der Probenahme im August 2004, wo die extrem hohe Aktivität von 25 mg Trp/(g oTR · h) auffällt. Diese beruht vermutlich auf dem zu diesem Zeitpunkt sehr niedrigen oTR-Gehalt des Schaums von 10 g/kg, wodurch sich, bezogen auf den organischen Trockenrückstand, sehr hohe Umsatzraten ergaben. Des Weiteren ist bei einer niedrigen Biomassekonzentration die Diffusion des Substrates innerhalb der Schaummatrix und somit auch der Substratabbau erleichtert. Die Aktivitäten waren im Schaum größtenteils niedriger als im

Belebtschlamm, allerdings war der Unterschied nicht so deutlich wie in der ersten Stufe. Im Juni 2002 lagen die Werte im Schaum sogar etwas höher als im Belebtschlamm, was mit den in diesem Zeitraum sehr niedrigen Aktivitäten des Belebtschlammes zusammenhing.

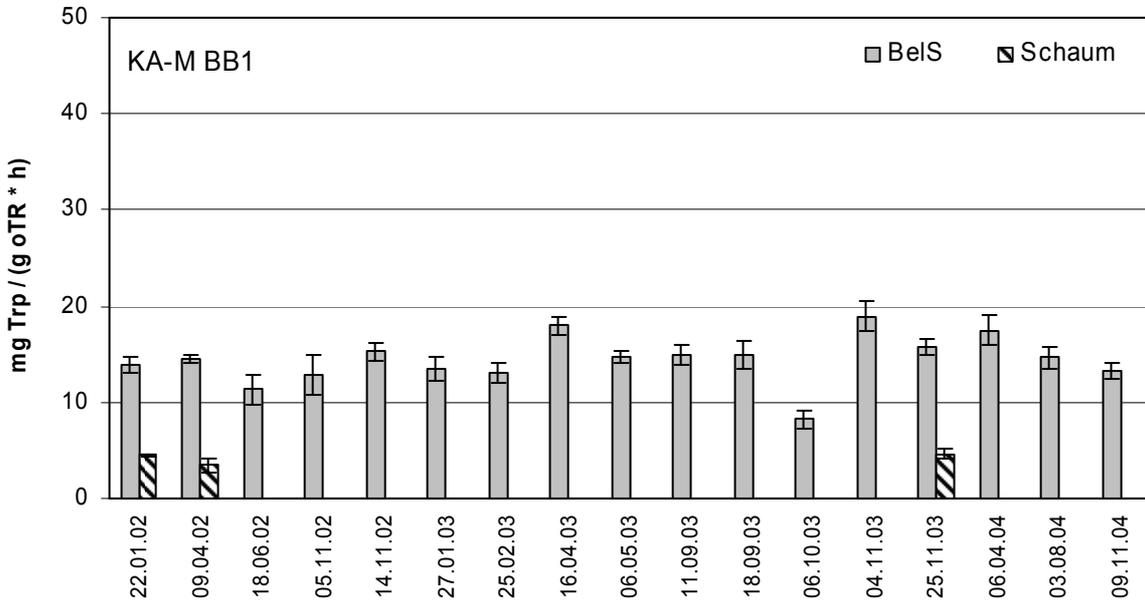


Abb. 10: Protease-Aktivitäten im BB1 der zweistufigen kommunalen Kläranlage KA-M (BelS: Belebtschlamm; Trp: Tryptophan)

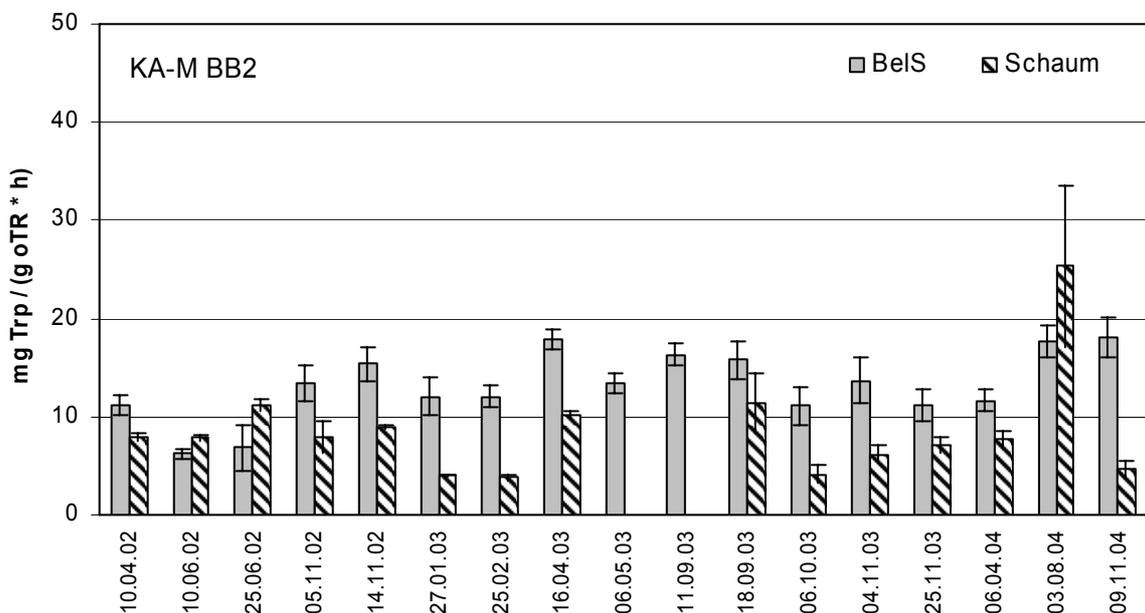


Abb. 11: Protease-Aktivitäten im BB2 der zweistufigen kommunalen Kläranlage KA-M (BelS: Belebtschlamm; Trp: Tryptophan)

Vergleicht man die Protease-Aktivitäten der Belebtschlämme beider Stufen, so konnten kaum Unterschiede festgestellt werden. Lediglich zwischen April und Juni 2002 sowie November 2003 und April 2004 waren diese im Belebtschlamm des BB1 geringfügig höher, zwischen August und November 2004 dagegen im BB2. Der Vergleich der Aktivitäten der Schaumfrak-

tionen im April 2002 und November 2003, als auf beiden Belebungsbecken eine Schaumbildung zu beobachten war, ergab höhere Werte im BB2, die im April 2002 sogar doppelt so hoch wie im BB1 lagen. Jahreszeitliche Unterschiede in der Protease-Aktivität konnten nicht festgestellt werden.

1.2.1.2 Einstufige kommunale Kläranlage KA-GR mit Dominanz von *Microthrix parvicella*

Die Untersuchungen ergaben in der einstufigen Kläranlage KA-GR deutlich niedrigere Protease-Aktivitäten im Schaum verglichen mit dem Belebtschlamm (Abb. 12).

Im Belebtschlamm waren die Aktivitäten mit 19-21 mg Trp/(g oTR · h) in der ersten Untersuchungshälfte zwischen Januar und Juli 2003 geringfügig höher als im Zeitraum von November 2003 bis November 2004, wo Umsatzraten von 15-19 mg Trp/(g oTR · h) erreicht wurden. Die Enzymaktivitäten in den Schäumen waren Schwankungen unterworfen, die im Bereich von 2-9 mg Trp/(g oTR · h) lagen, mit dem niedrigsten Wert im Juli 2003.

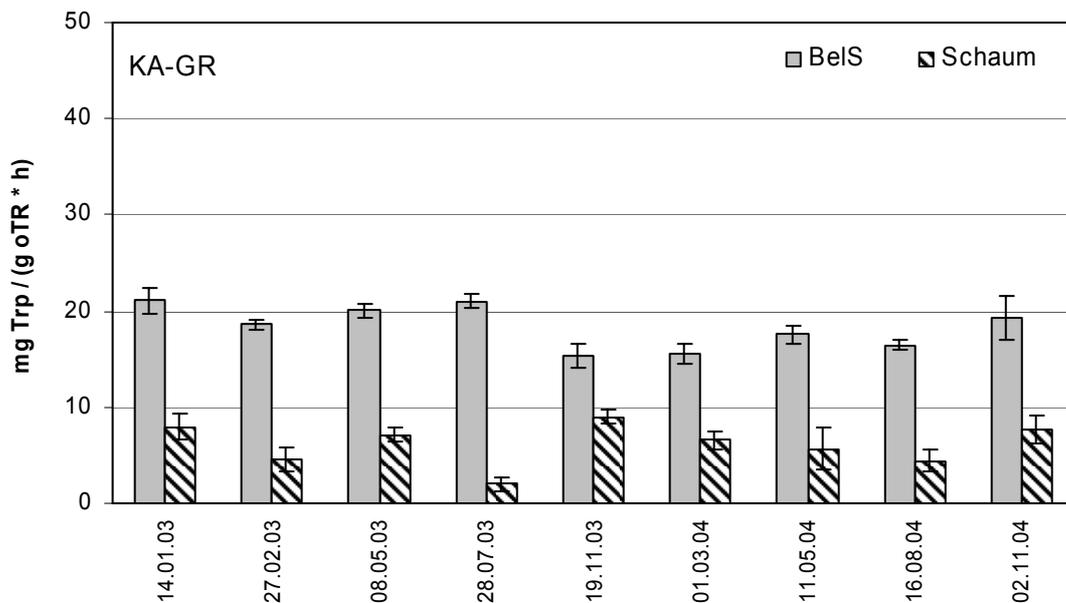


Abb. 12: Protease-Aktivitäten in der einstufigen kommunalen Kläranlage KA-GR (BelS: Belebtschlamm; Trp: Tryptophan)

1.2.1.3 Einstufige kommunale Kläranlage KA-BT mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten und *Microthrix parvicella*

Die höchsten gemessenen Protease-Aktivitäten im Belebtschlamm wurden in KA-BT festgestellt (Abb. 13). Sie lagen mit einer Ausnahme über 30 mg Trp/(g oTR · h) und z.T. mehr als doppelt so hoch wie in den Anlagen KA-M und KA-GR. Es traten deutliche Aktivitätsschwankungen von 13-42 mg Trp/(g oTR · h) auf, wobei der niedrige Wert im Juli 2003 überrascht und möglicherweise auf einem Messfehler beruht.

Die Aktivitäten im Schaum waren wie in KA-GR immer niedriger als im Belebtschlamm. Zwischen Mai und November 2003 lagen diese bei 4,5-7,5 mg Trp/(g oTR · h) und damit im

Bereich der Werte der KA-GR. Die weiteren Untersuchungen im Februar, Mai und Oktober 2004 zeigten einen deutlichen Anstieg auf Umsatzraten von 13-16 mg Trp/(g oTR · h). Diese Umsatzraten lagen, mit Ausnahme der Aktivität des Schaums der zweiten Stufe der KA-M im August 2004, weit über denen der Schäume der anderen Anlagen. Ein Zusammenhang mit der Population dominierender Fadenbildner wurde nicht beobachtet.

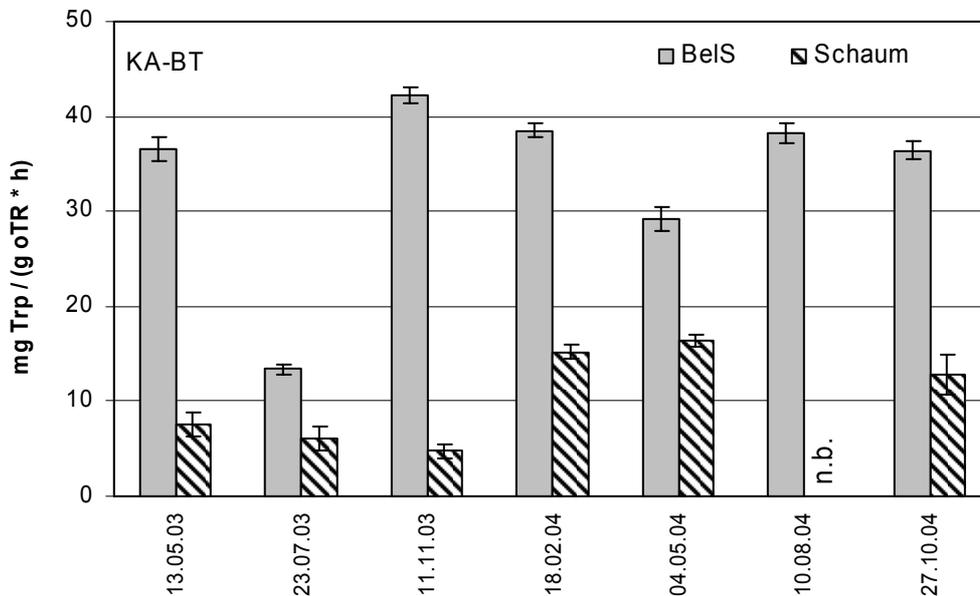


Abb. 13: Protease-Aktivitäten in der einstufigen kommunalen Kläranlage KA-BT (BelS: Belebtschlamm; Trp: Tryptophan; n.b.: nicht bestimmt)

1.2.2 Lipase-Aktivität

1.2.2.1 Vergleich verschiedener Lipase-Substrate

Die Lipase-Aktivitäten wurden in den Belebtschlämmen und Schäumen der beiden einstufigen kommunalen Anlagen KA-GR und KA-BT sowie im Schaum der zweiten Stufe der zweistufigen kommunalen Kläranlage KA-M unter Verwendung verschiedener Methylumbelliferyl (MUF)-Substrate untersucht. Verwendet wurden MUF-Oleat, MUF-Palmitat sowie MUF-Stearat, da Ölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure zu den häufigsten Fettsäuren im Abwasser gehören (Quéméneur und Marty 1994).

Die Aktivitätsbestimmungen zeigten, dass während der Testdauer von 2 h ein linearer Anstieg der Konzentration an freigesetztem Methylumbelliferon (MUFon) erfolgte. Das bedeutet, dass genügend Substrat vorhanden war und keine Sättigung vorlag. Weiterhin wurde keine lag-Phase beobachtet, d.h. die Spaltung der MUF-Substrate begann unmittelbar nach Versuchsbeginn, was darauf hinweist, dass die notwendigen Enzyme nicht erst synthetisiert werden mussten.

Die Ergebnisse in Abbildung 14 zeigen deutlich, dass sowohl für *M. parvicella*- als auch für Actinomyceten-dominierte Belebtschlämme und Schäume bei Verwendung des Substrats MUF-Oleat um ein Vielfaches höhere Aktivitäten gemessen wurden als mit MUF-Palmitat bzw. -Stearat. So wurden mit MUF-Palmitat nur etwa 1,7-13% und mit MUF-Stearat 1,7-6%

der MUF-Oleat-Lipase-Aktivität ermittelt. In KA-GR lagen die Aktivitäten im Belebtschlamm geringfügig niedriger als im Schaum, unabhängig davon, welches MUF-Substrat verwendet wurde (siehe Abb. 14). Die Lipase-Aktivitäten in KA-BT waren sowohl bei Verwendung von MUF-Oleat als auch von MUF-Palmitat im Belebtschlamm höher als im Schaum. Es wurden also hinsichtlich des Vergleichs von Belebtschlamm- und Schaum-Aktivitäten keine Unterschiede zwischen den MUF-Substraten beobachtet.

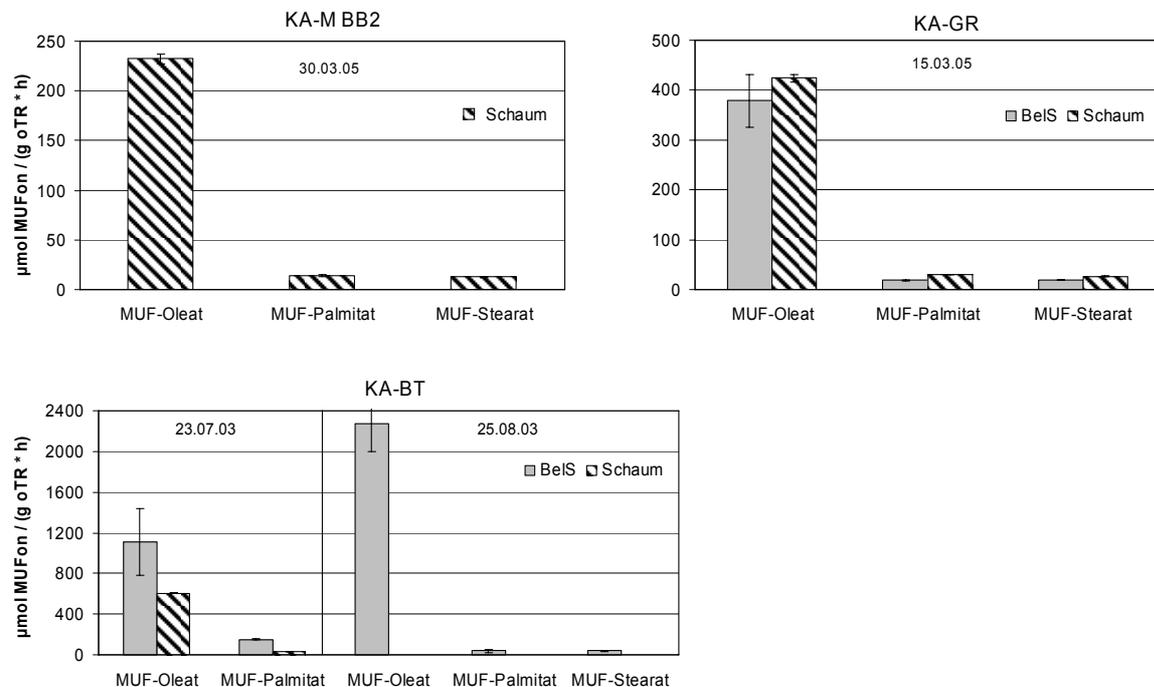


Abb. 14: Lipase-Aktivität bei Verwendung der Substrate Methylumbelliferyl (MUF)-Oleat, MUF-Palmitat und MUF-Stearat im Schaum der zweiten Stufe der KA-M sowie im Belebtschlamm (BeIS) und Schaum der beiden einstufigen Anlagen KA-GR und KA-BT (MUFon: Methylumbelliferon)

1.2.2.2 Zweistufige kommunale Kläranlage KA-M mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten

Die Abbildungen 15 und 16 zeigen die Ergebnisse der Lipase-Aktivitätsmessungen unter Verwendung des Substrats MUF-Oleat in den beiden Stufen der kommunalen Kläranlage KA-M. Über den gesamten Untersuchungszeitraum wurden im Belebtschlamm der ersten Stufe signifikant höhere Lipase-Aktivitäten als im Belebtschlamm der Stufe 2 gemessen. Von April 2002 bis Mai 2003 waren die Aktivitäten meist mehr als 4 mal so hoch: während im BB1 Werte von 170-360 µmol MUFon/(g oTR · h) gemessen wurden, lagen diese im BB2 nur bei 50-90 µmol MUFon/(g oTR · h). Dagegen waren sie von September bis November 2003 nur noch 1,5-2,5 mal höher mit 160-330 µmol MUFon/(g oTR · h) im BB1 und 100-170 µmol MUFon/(g oTR · h) im BB2. Im Zeitraum von April bis November 2004 erfolgte ein starker Aktivitätsrückgang im Belebtschlamm der Stufe 2 auf Werte um 85 µmol MUFon/(g oTR · h), sodass die Werte im BB1 von 160-260 µmol MUFon/(g oTR · h) wieder 2-3 mal höher lagen als in der zweiten Stufe.

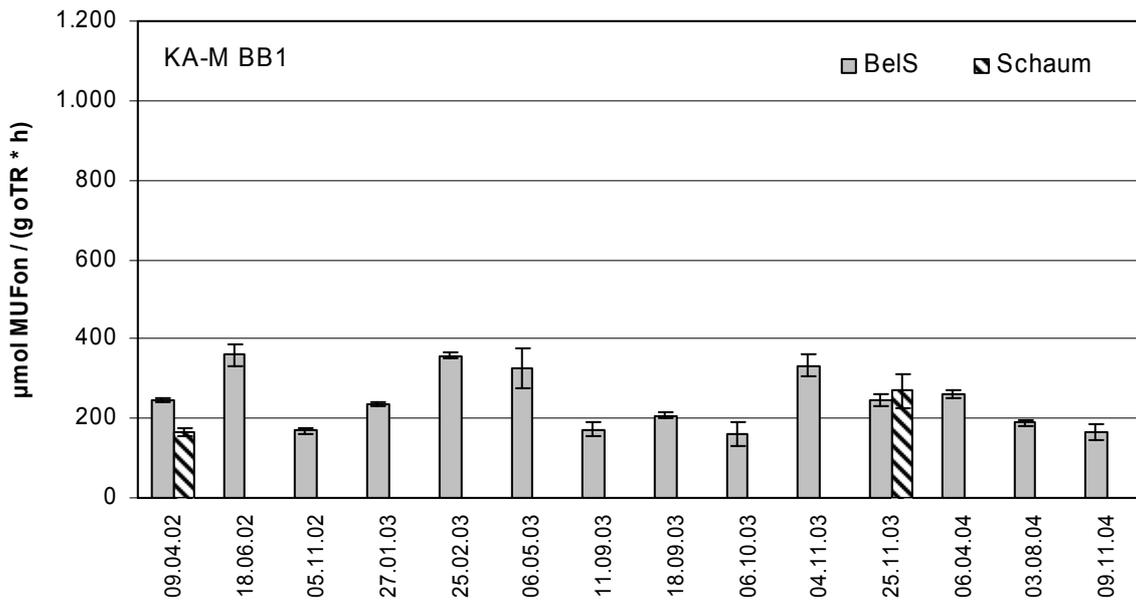


Abb. 15: Lipase-Aktivitäten im BB1 der zweistufigen kommunalen Kläranlage KA-M (BeIS: Belebtschlamm; MUFon: Methylumbelliferon)

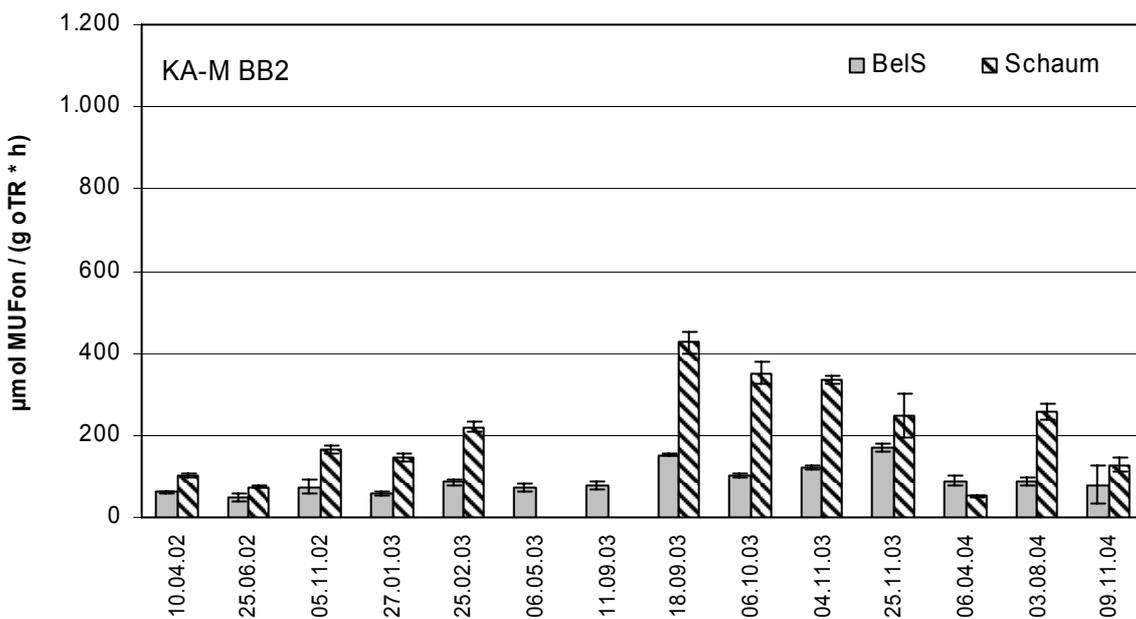


Abb. 16: Lipase-Aktivitäten im BB2 der zweistufigen kommunalen Kläranlage KA-M (BeIS: Belebtschlamm; MUFon: Methylumbelliferon)

Die Messung der Lipase-Aktivität im Schaum des BB1 ergab im April 2002 etwa 50% höhere Werte im Belebtschlamm verglichen mit der Schaumfraktion. Sie lagen im Belebtschlamm bei $245 \mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ und im Schaum bei $165 \mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$. Bei dem weiteren Schaumereignis im BB1 Ende November 2003 war dagegen kein signifikanter Unterschied zwischen Belebtschlamm und Schaum festzustellen mit Werten von 250 bzw. 270 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$. Die Aktivität des Schaums war deutlich höher als im April 2002. Möglicherweise spielt hier die unterschiedliche Zusammensetzung der Actinomyceten-Populationen eine Rolle (siehe Kap. C.1.1.1). Während die Schaumfraktion im April 2002

von *Dietzia* spp. dominiert war, wurden Ende November 2003 neben *Dietzia* spp. zahlreiche Organismen detektiert, die dem *Rhodococcus* sp. Cluster B angehören.

Im BB2 war mit Ausnahme der Probenahmen im Mai 2003 sowie Anfang September 2003 fast regelmäßig eine Schaumdecke vorhanden. Außer im April 2004 lag die Aktivität im Schaum immer 1,5-3,5fach höher als im Belebtschlamm. Insbesondere von Mitte September bis Anfang November 2003 wurden sehr hohe Lipase-Aktivitäten von 335-425 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ gemessen, die weit über den Aktivitäten des Belebtschlammes von 100-150 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ lagen und außerdem deutlich höher als im Zeitraum April 2002 bis Februar 2003 waren, wo die Aktivität im Schaum nur 75-220 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ betrug.

Es wurde nur ein einziges Mal (April 2004) im Schaum eine signifikant niedrigere Substratumsatzrate gemessen als im Belebtschlamm mit 50 gegenüber 90 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$. Dies hängt sehr wahrscheinlich mit der Beschaffenheit der Schaumfraktion zu diesem Zeitpunkt zusammen. Der Schaum wies eine fast tensidschaumartige Konsistenz mit vielen großen Gasblasen sowie eine geringe Bakterienbiomasse auf. Die geringe Bakteriendichte war mit einer niedrigen Lipase-Aktivität verbunden. Zusammen mit dem relativ hohen oTR-Gehalt von 45 g/kg resultierte dies in einer sehr niedrigen Umsatzrate. Im August 2004, als die Bakterienbiomasse im Schaum wieder höher lag, stieg entsprechend die Lipase-Aktivität deutlich auf 260 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ an.

1.2.2.3 Einstufige kommunale Kläranlage KA-GR mit Dominanz von *Microthrix parvicella*

Im Belebtschlamm der einstufigen Anlage KA-GR wurden v.a. zwischen Januar und Juli 2003 sehr hohe Lipase-Aktivitäten von 450-930 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ gemessen, mit einem Maximum im Mai 2003 (Substrat MUF-Oleat; Abb. 17). Im weiteren Verlauf von November 2003 bis März 2005 sank die Aktivität auf Werte zwischen 280-410 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$. Dagegen wurden im Schaum nicht so große Schwankungen beobachtet, hier wurden Umsatzraten von 270-410 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ ermittelt. Der Vergleich zwischen Schlamm- und Schaumfraktion ergab aufgrund der hohen Enzymaktivitäten des Belebtschlammes bis Juli 2003 in diesem Zeitraum wesentlich niedrigere Aktivitäten im Schaum. Zwischen November 2003 und März 2005 hingegen wurden meist keine signifikanten Unterschiede mehr beobachtet.

In der Anlage KA-GR dominierte über den gesamten Untersuchungszeitraum *Microthrix parvicella* im Belebtschlamm und im Schaum. Da *M. parvicella* als Substrat langkettige Fettsäuren und ihre Ester verwertet (Slijkhuis 1983a; Andreasen und Nielsen 1998), lag die Vermutung nahe, dass die Lipase-Aktivitäten in dieser Anlage auf dem häufigen Vorkommen von *M. parvicella* beruhen. Obwohl im Schaum die Fädigkeitskategorie von *M. parvicella* mit 4 bis 5 fast immer höher lag als im Belebtschlamm mit 3 bis 4, wurden dennoch im Schaum nur gleich hohe oder sogar signifikant niedrigere Aktivitäten beobachtet als im Schlamm (siehe auch Abb. 17). Dies gibt einen Hinweis darauf, dass *M. parvicella* im Schaum weniger aktiv ist als im Schlamm. In situ Untersuchungen sollten dies näher beleuchten (siehe Kap. C.1.3.1.1).

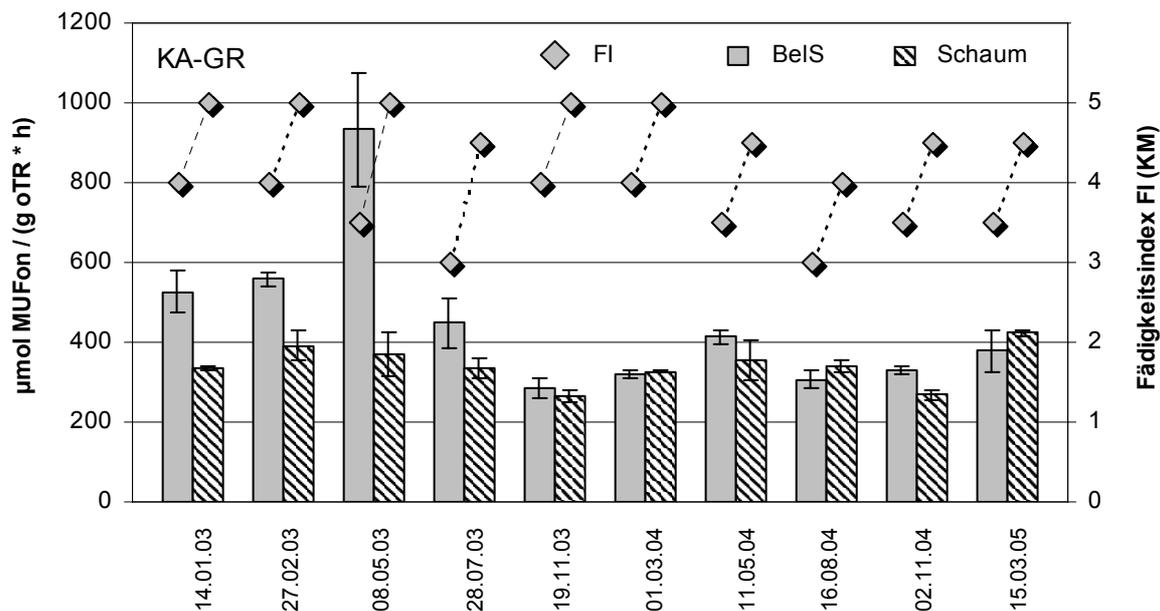


Abb. 17: Lipase-Aktivitäten in der einstufigen kommunalen Kläranlage KA-GR und Fädisindex (FI) von *M. parvicella* (BeLS: Belebtschlamm; MUFon: Methylumbelliferon; KM: Klassische Mikroskopie)

1.2.2.4 Einstufige kommunale Kläranlage KA-BT mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten und *Microthrix parvicella*

Die Anlage KA-BT zeigte im Mai 2003 relativ niedrige Aktivitäten, die sich im Belebtschlamm und Schaum nicht signifikant voneinander unterschieden und ca. 190 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ betragen (Substrat MUF-Oleat; Abb. 18). Im Schaum dominierten zu diesem Zeitpunkt nocardioforme Actinomyceten. Im Juli 2003 fällt vor allem die hohe Aktivität des Belebtschlammes mit 1100 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ auf, die sehr viel höher als im Mai lag. Ein starker Anstieg der Lipase-Aktivität auf 600 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ war auch im Schaum zu beobachten, der im Gegensatz zu Mai von *Microthrix parvicella* dominiert war. Die Aktivität des Schaums lag höher als in der Anlage KA-GR, in der ebenfalls *M. parvicella* im Schaum dominierte. Im November 2003 waren wie im Mai nocardioforme Actinomyceten im Schaum dominierend. Die Lipase-Aktivität lag mit 170 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ wieder deutlich niedriger als im Juli und erreichte im Schaum ähnliche Werte wie im Mai 2003. Bei den Untersuchungen im Februar sowie im Mai 2004 war die Schaumfraktion weiterhin von nocardioformen Actinomyceten dominiert. Die Lipase-Aktivität des Schaums nahm auf Werte von 240 bzw. 300 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ zu.

Nach Inbetriebnahme der umgebauten Anlage Mitte 2004 war im August zunächst ein signifikanter Anstieg der Enzymaktivität von 200 auf 500 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ im Belebtschlamm zu beobachten, der wieder von *M. parvicella* dominiert war. Dennoch lagen die Aktivitäten, v.a. im Schaum mit 200-270 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$, weit unter denen von Juli 2003. Allerdings lassen sich die Werte auch nicht direkt vergleichen, da durch den Umbau andere Bedingungen in der Anlage vorlagen. Des Weiteren wurde im Juli 2003 für *M. parvicella* im Schaum mit Kategorie 4-5 eine wesentlich höhere Häufigkeit festgestellt als im August 2004, wo dessen Fädisindex bei 2-3 lag.

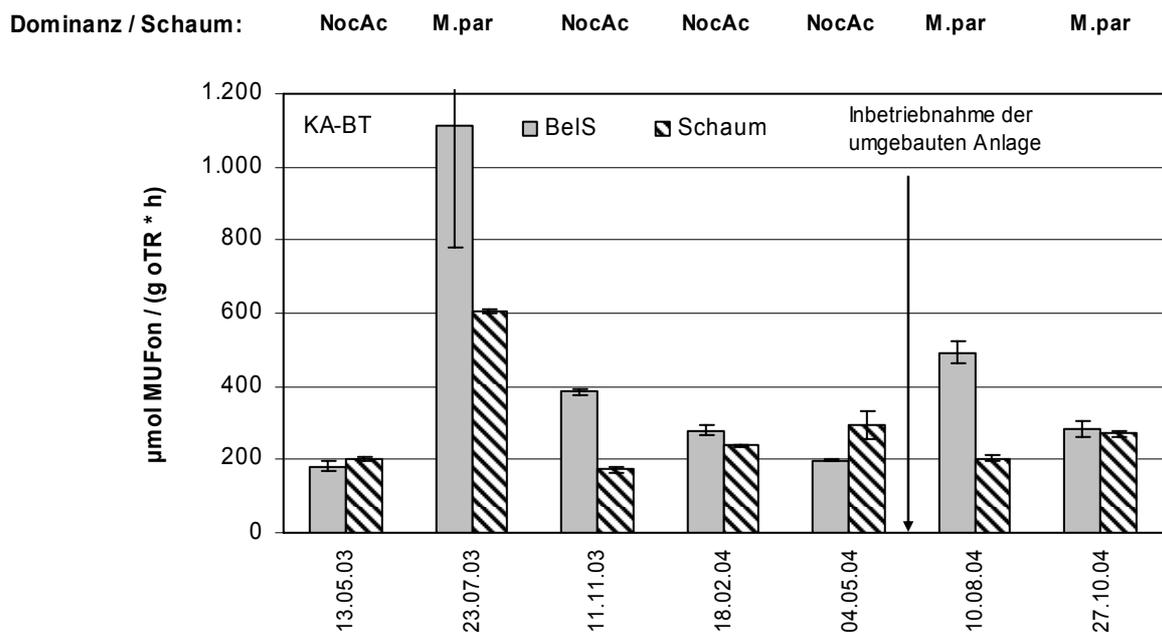


Abb. 18: Lipase-Aktivitäten in der einstufigen kommunalen Kläranlage KA-BT (BeIS: Belebtschlamm; MUFon: Methylumbelliferon) mit Dominanz von *Microthrix parvicella* (M.par) bzw. nocardioformen Actinomyceten (NocAc) im Schaum

1.2.3 β -Glucuronidase-Aktivität

Die Aktivitätsbestimmungen ergaben auch für β -Glucuronidase einen linearen Anstieg der freigesetzten MUFon-Menge unmittelbar nach Versuchsbeginn, d.h. es lag keine Substratsättigung vor und die zur Glucuronid-Abspaltung notwendigen Enzyme mussten nicht erst synthetisiert werden.

1.2.3.1 Zweistufige kommunale Kläranlage KA-M mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten

In Abbildung 19 sind die Ergebnisse der β -Glucuronidase-Aktivitätsmessungen für die zweistufige kommunale Kläranlage KA-M dargestellt. Im Belebtschlamm der hochbelasteten ersten Stufe wurden Aktivitäten gemessen, die deutlich höher als in allen übrigen untersuchten Anlagen waren. Es wurden konstante Umsatzraten von 36-37 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ erreicht. Die Aktivitäten im Belebtschlamm der niedrigbelasteten zweiten Stufe lagen mit 4-8 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ um ein Vielfaches niedriger. Im Schaum des BB2 wurden mit Ausnahme von August 2004 nur minimale Aktivitäten von 0,5-2 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ gemessen, die nochmals weit unterhalb derer des Belebtschlammes lagen. Im April 2004 war die Aktivität besonders niedrig. Der Grund hierfür liegt vermutlich in der bereits erwähnten tensidschaumartigen Konsistenz der flotierten Schlammfraktion mit vielen großen Gasblasen und einer sehr geringen Bakterienbiomasse. Die überraschend hohe Aktivität der Schaumfraktion im August 2004 beruht wahrscheinlich auf dem sehr geringen oTR-Gehalt von 10 g/kg verbunden mit einer dichten Bakterienpopulation. Da die Ergebnisse auf den organischen Trockenrückstand bezogen wurden, ergaben sich somit hohe Substratumsatzraten.

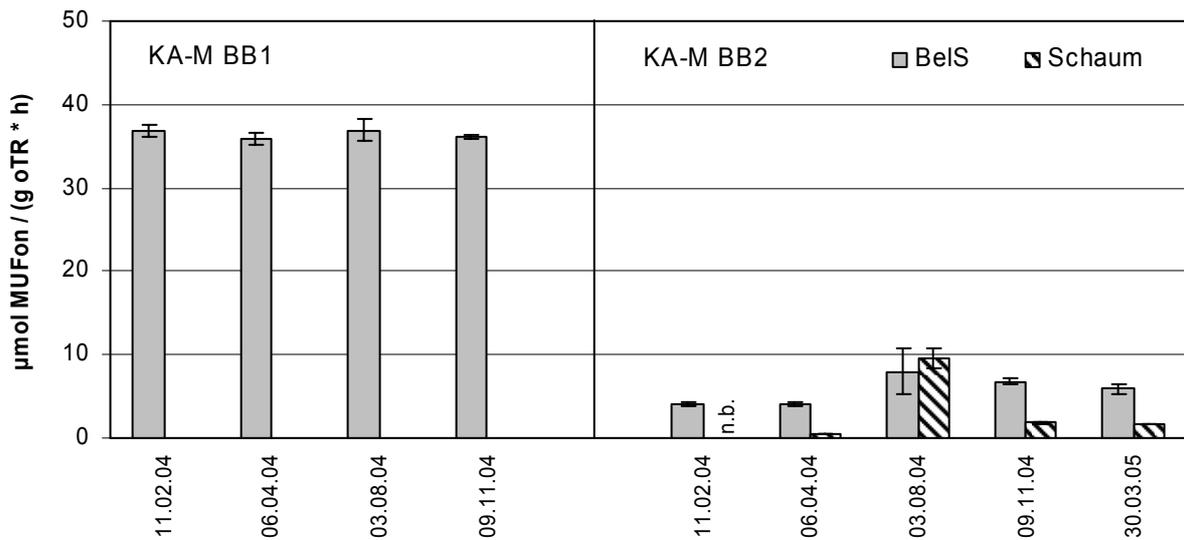


Abb. 19: β -Glucuronidase-Aktivitäten in den Belebungsbecken BB1 und BB2 der zweistufigen kommunalen Kläranlage KA-M (BeIS: Belebtschlamm; MUFon: Methylumbelliferon; n.b.: nicht bestimmt)

1.2.3.2 Einstufige kommunale Kläranlage KA-GR mit Dominanz von *Microthrix parvicella*

Die β -Glucuronidase-Aktivitäten im Belebtschlamm der einstufigen Kläranlage KA-GR lagen mit Umsatzraten von 14-24 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ durchschnittlich halb so hoch wie in der hochbelasteten ersten Stufe der KA-M (Abb. 20). Im Schaum wurden mit 9-18 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ durchwegs signifikant niedrigere Aktivitäten als im Schlamm gemessen, die aber weit höher als im Schaum des BB2 der KA-M waren.

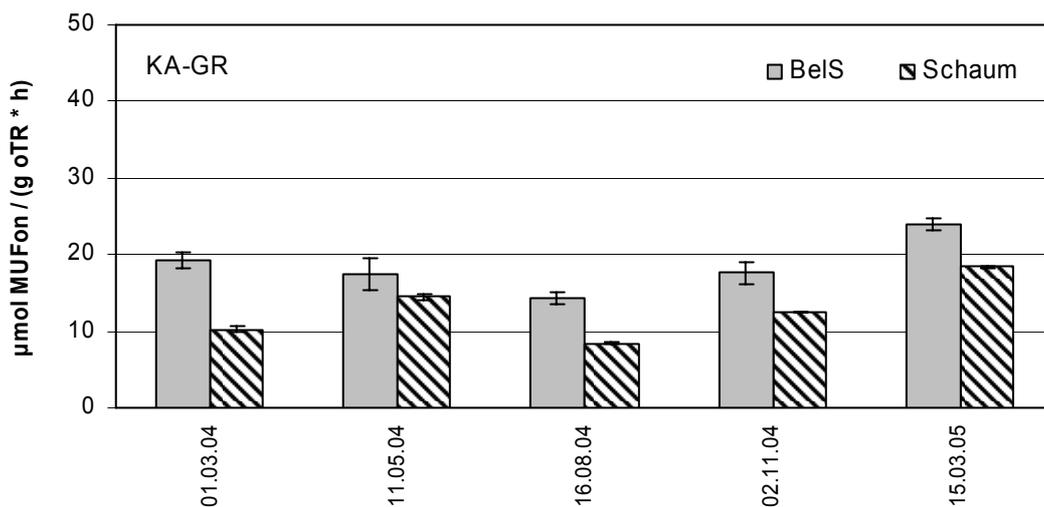


Abb. 20: β -Glucuronidase-Aktivitäten in der einstufigen kommunalen Kläranlage KA-GR (BeIS: Belebtschlamm; MUFon: Methylumbelliferon)

1.2.3.3 Einstufige kommunale Kläranlage KA-BT mit Dominanz von nocardioformen Actinomyceten und *Microthrix parvicella*

In der Anlage KA-BT lagen die Aktivitäten im Belebtschlamm, mit einer Ausnahme, im Bereich der Werte von KA-GR (19-26 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$; Abb. 21). Im Mai 2004 wurde allerdings eine extrem hohe Enzymaktivität von 77 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ ermittelt, die etwa 3mal höher als die zuvor und danach in dieser Anlage gemessenen Aktivitäten war. Es ist unklar, ob es sich dabei eventuell um einen Messfehler handelt. Die Aktivitäten im Schaum von 7-22 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ waren ähnlich hoch wie im Schaum von KA-GR und immer signifikant niedriger als in der Schlammfraktion. Auffallend ist jedoch, dass wie im Belebtschlamm auch im Schaum im Mai 2004 die Aktivitäten deutlich erhöht waren.

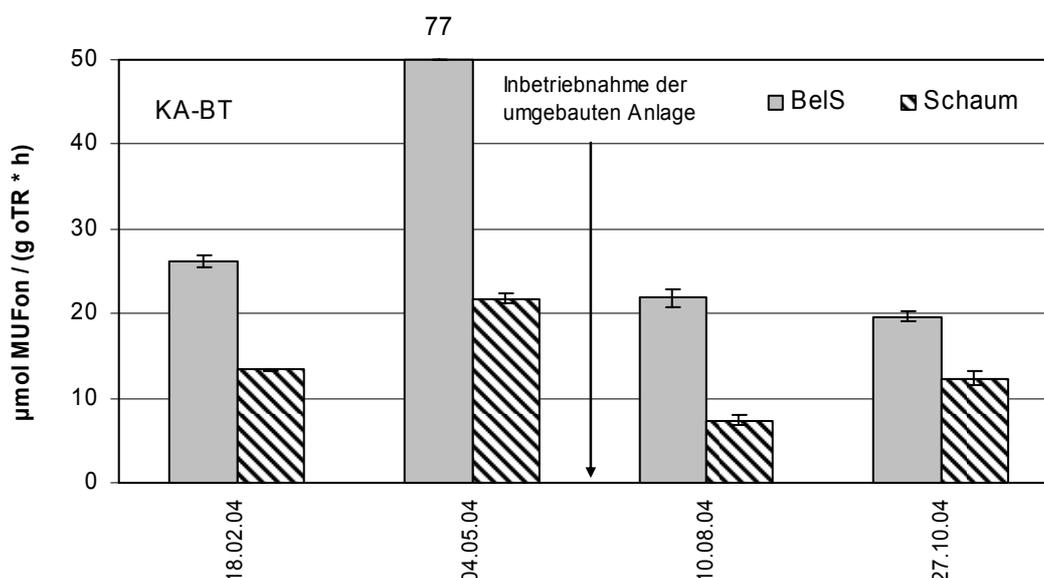


Abb. 21: β -Glucuronidase-Aktivitäten in der einstufigen kommunalen Kläranlage KA-BT (BeLS: Belebtschlamm; MUFon: Methylumbelliferon)

1.3 In situ Enzymaktivitäten (ELF; enzyme labeled fluorescence)

1.3.1 In situ Enzymaktivitäten in ausgewählten Kläranlagen

Die in situ Enzymaktivitäten von Phosphatase, Esterase, Lipase und β -Glucuronidase wurden in den beiden Belebungsbecken der zweistufigen kommunalen Anlage KA-M sowie in den einstufigen kommunalen Kläranlagen KA-GR, KA-BT, KA-AL, LA-LAU, KA-TB und KA-US untersucht. Es zeigte sich, dass die Enzymaktivitäten vorwiegend in den Belebtschlammflocken lokalisiert waren. In der freien Wasserphase wurden nur geringe bis mäßige Aktivitäten festgestellt. In allen Anlagen wurden sehr hohe Phosphatase-Aktivitäten ermittelt, was auf die intensive Stoffwechselaktivität innerhalb der Belebtschlammflocken hinweist. Hohe Aktivitäten wurden ebenso für die Enzyme Esterase und β -Glucuronidase beobachtet. Eine Ausnahme bildete lediglich die β -Glucuronidase-Aktivität im Belebtschlamm des BB2 der KA-M, die in diesem Becken deutlich niedriger lag als im Belebtschlamm der ersten Stufe. Dies wurde bereits bei der Bestimmung der Gesamtaktivität festgestellt (siehe Kap. C.1.2.3.1). Lipase-Aktivität wurde ebenfalls in allen untersuchten Anlagen nachgewiesen, teilweise mit etwas geringerer Intensität als die der anderen genannten Enzyme.

Die in situ Untersuchungen ergaben weiterhin, dass neben Bakterien auch zahlreiche Protozoen und Metazoen Enzymaktivitäten aufwiesen. Die meisten der freischwimmenden und sessilen Ciliaten zeigten sehr hohe Intensitäten, Rädertiere sowie ein Teil der Flagellaten besaßen mäßige Aktivitäten für die vier Enzyme. Dagegen konnten in Spirochäten in der Regel keine Aktivitäten nachgewiesen werden, nur in seltenen Fällen wurden geringe Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivitäten beobachtet.

1.3.2 Vergleich von Gesamt- und in situ Enzymaktivitätsbestimmungen

Zur quantitativen Bewertung der in situ Enzymaktivitäten wurden Menge und Intensität der fluoreszierenden Granula bestimmt und mit den Ergebnissen der enzymatischen Gesamtaktivitätsbestimmung verglichen. Dies geschah mittels visueller Abschätzung und Einteilung der in situ Aktivitäten in fünf Kategorien:

0	keine Aktivität
0,5 – 1	geringe Aktivität
1,5 – 2	mäßige Aktivität
2,5 – 3	hohe Aktivität
3,5 – 4	sehr hohe Aktivität

1.3.2.1 Lipase-Aktivität

In Abbildung 22 werden die Ergebnisse der klassischen Lipase-Aktivitätsmessungen mit denen der in situ Bestimmungen verglichen. Es zeigte sich, dass die Umsatzraten der Gesamtaktivitätsbestimmung nicht direkt mit den Kategorien des in situ Tests korreliert werden konnten. Das liegt zum einen daran, dass die Quantifizierung der in situ Aktivität auf einer visuellen Abschätzung der Menge fluoreszierender Granula beruhte, sodass hier mit Sicherheit von größeren Ungenauigkeiten als im klassischen Test auszugehen ist. Des Weiteren spielen vermutlich auch die – bereits erwähnten – unterschiedlichen Fettsäurereste der verwendeten Substrate eine Rolle (MUF-Oleat bzw. ELF-Palmitat; siehe auch Kap. C.1.2.2.1).

Dennoch konnte Folgendes festgestellt werden: Gesamtaktivitäten unter 200 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ wurden im in situ-Test den Kategorien 0,5-2 (geringe bis mäßige Aktivität) zugeordnet. Aktivitäten zwischen 200 und 450 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ entsprachen meistens den Kategorien 2-2,5 (mäßige bis hohe Aktivität), Aktivitäten über 500 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ wurden in die Kategorie 3 (hohe Aktivität) eingeteilt. Es zeigte sich, dass vor allem hohe Lipase-Aktivitäten sowohl im klassischen als auch im in situ Test mit hohen Umsatzraten bzw. Kategorien detektiert wurden.

1.3.2.2 β -Glucuronidase-Aktivität

Abbildung 23 zeigt den Vergleich von klassischer und in situ β -Glucuronidase-Aktivitätsbestimmung. Geringe β -Glucuronidase-Gesamtaktivitäten unter 10 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ wurden auch im in situ Test nur mit den Kategorien 0,5-1,5, d.h. geringe bis mäßige Aktivität, bewertet. Substratumsätze zwischen 10 und 40 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ wurden meist den Kategorien 2,5-3,5 (hohe bis sehr hohe Aktivität) zugeordnet. Der höchsten β -Glucuronidase-Aktivität im Belebtschlamm der KA-BT mit 77 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g oTR} \cdot \text{h})$ wurde auch im ELF-Test die höchste Kategorie 4 (sehr hohe Aktivität) zugewiesen. Insgesamt lieferte der

Vergleich von Gesamtzymaktivitäten und situ-Kategorien für β -Glucuronidase eine bessere Übereinstimmung als für Lipase.

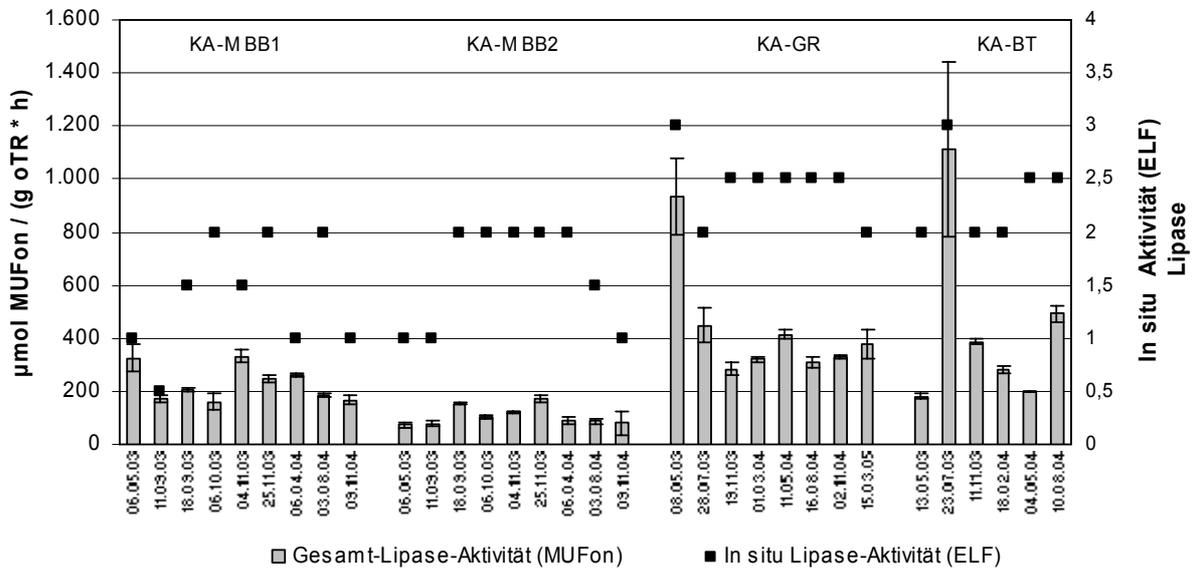


Abb. 22: Vergleich von Gesamt-Lipase-Aktivität (klassischer Enzymtest) und in situ Lipase-Aktivität (ELF-Technik) im Belebtschlamm der kommunalen Kläranlagen KA-M, KA-GR und KA-BT (MUFon: Methylumbelliferon)

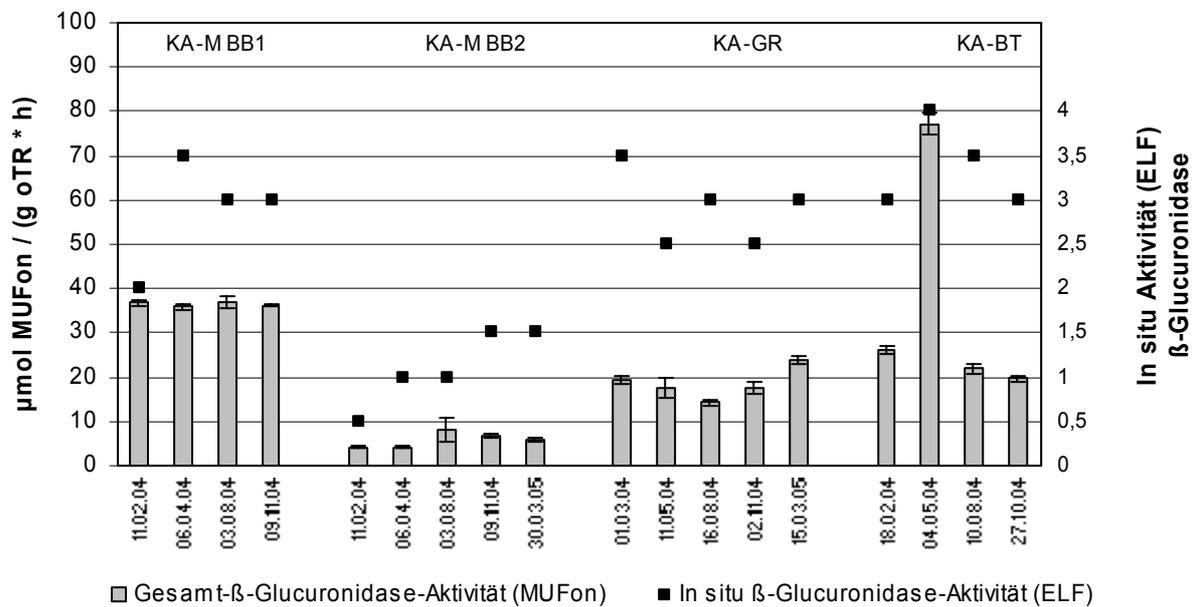


Abb. 23: Vergleich von Gesamt- β -Glucuronidase-Aktivität (klassischer Enzymtest) und in situ β -Glucuronidase-Aktivität (ELF-Technik) im Belebtschlamm der kommunalen Kläranlagen KA-M, KA-GR und KA-BT (MUFon: Methylumbelliferon)

1.3.3 In situ Enzymaktivitäten ausgewählter fadenbildender Organismen

Tabelle 7: In situ Enzymaktivitäten ausgewählter Organismen in den untersuchten Kläranlagen mit Schaumproblemen (Phako: Phasenkontrast; Neisser: Neisserfärbung; BelS: Belebtschlamm; S: Schaum)

Organismus	Aktivitäts- Zuordnung	In situ Enzymaktivität							
		Phosphatase		Esterase		Lipase		β-Glucuronidase	
		BelS	S	BelS	S	BelS	S	BelS	S
<i>Microthrix parvicella</i>	Phako / Neisser	++ / +	+ / +	++ / +	+ / +	+++ / +++	+ / +	++ / +	+ / +
Noc. Actinomyceten	Phako	+ / +	++ / +	+ / +	++ / +	+ / ±	++ / ±	+ / +	++ / +
Myc657-positiv	FISH	+ / +	++ / +	+ / +	++ / +	+ / ±	++ / ±	+ / +	++ / +
RHOb183-positiv	FISH	+ / +	++ / +	+ / +	++ / +	+ / ±	++ / ±	+ / +	++ / +
DIE993-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
N. limicola Morphotyp	Neisser	± / ±	± / ±	± / ±	± / ±	-	-	± / ±	± / ±
NLIMI 91-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	± / ±	-
NLII65-positiv	FISH	± / ±	-	± / ±	-	-	-	± / ±	-
NLIMII 175-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	± / ±	-
Noli-644-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
PPx3-1428-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
MC2-649-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
AHW183-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
Typ 0041/0675	Phako	++ / +++	± / +	++ / +++	± / +	-	-	++ / +++	± / +
EUB338-positiv	FISH	++ / +++	± / +	++ / +++	± / +	-	-	++ / +++	± / +
TM7905-positiv	FISH	+ / +++	± / ±	+ / +++	± / ±	-	-	+ / +++	± / ±
TM7305-positiv	FISH	+ / +	± / ±	+ / +	± / ±	-	-	+ / +	± / ±
Typ 1851	Phako	+ / +	± / ±	+ / +	± / ±	-	-	+ / +	± / ±
CHL 1851-positiv	FISH	+ / +	± / ±	+ / +	± / ±	-	-	+ / +	± / ±
Typ 0092	Neisser	± / +	± / ±	± / +	± / ±	-	-	± / +	± / ±
Isosphaera spp.	Phako	-	-	-	-	-	-	-	-
NLIMIII 301-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
H. hydrossis	Phako	-	-	-	-	-	-	-	-
HHY-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
Typ 021N	Phako	-	-	-	-	-	-	-	-
21N-positiv	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
Thiothrix spp. (TNI-pos.)	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
Typ 0961	Phako	± / ±	-	-	-	-	-	± / ±	-
Typ 1863 (ACA23a-pos.)	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-
S. natans (SNA-positiv)	FISH	-	-	-	-	-	-	-	-

+++ / +++ sehr hohe Organismenhäufigkeit mit sehr hoher Aktivität

++ / ++ hohe Organismenhäufigkeit mit hoher Aktivität

++ / + hohe Organismenhäufigkeit mit mäßiger Aktivität

+ / ++ mäßige Organismenhäufigkeit mit hoher Aktivität

+ / + mäßige Organismenhäufigkeit mit mäßiger Aktivität

+ / ± mäßige Organismenhäufigkeit mit niedriger Aktivität

± / + niedrige Organismenhäufigkeit mit mäßiger Aktivität

± / ± niedrige Organismenhäufigkeit mit niedriger Aktivität

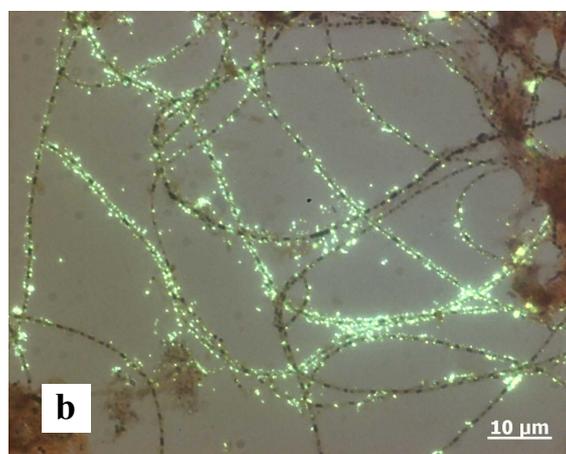
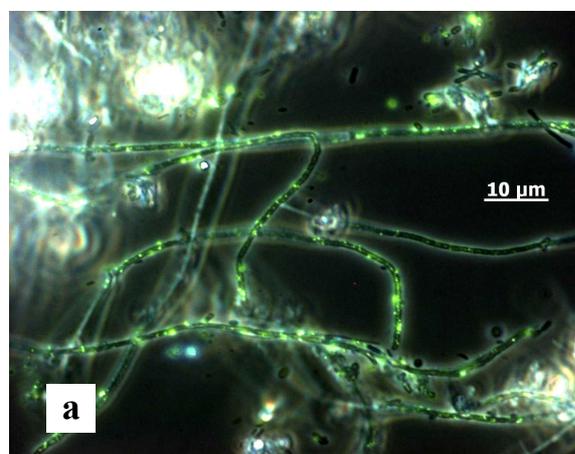
- keine Organismen mit Enzymaktivität detektiert

Die Zuordnung der in situ Enzymaktivitäten zu Belebtschlammorganismen erfolgte durch Überlagerung gleicher Bildausschnitte der Epifluoreszenzmikroskopie mit Phasenkontrastmikroskopie, Gram- und Neisserfärbung sowie Fluoreszenz in situ Hybridisierung. Die Kombination mit der Gramfärbung erwies sich als problematisch, da ELF-Kristalle in Ethanol löslich sind und deshalb durch die Ethanol-Behandlung ausgewaschen werden können. Daher wurden bereits vor der Gramfärbung Bildausschnitte ELF-markierter fadenbildender Organismen mittels digitaler Fotografie dokumentiert und dieselben Bildausschnitte nach der Färbung nochmals auf das Färbverhalten dieser Organismen untersucht. Ebenfalls mit Problemen verbunden war die Kombination von in situ Lipase-Aktivitäts-Bestimmung und FISH-Technik. Die ELF-Lipase-Signale, deren Intensitäten wesentlich schwächer als die der übrigen Enzyme waren, konnten nach der Hybridisierungsprozedur nicht mehr nachgewiesen werden. Möglicherweise wurden die Signale von einem Film aus Farbstoffresten überdeckt. Deshalb mussten auch hier gleiche Bildausschnitte vor und nach der Hybridisierung analysiert werden. Die in situ Enzymaktivitäten verschiedener Organismen sind in Tabelle 7 zusammengefasst. Zur Beschreibung der in situ Aktivitäten wurden sowohl die Häufigkeit aktiver Organismen als auch die Intensität und Anzahl der gebildeten ELF-Signale bewertet.

1.3.3.1 *Microthrix parvicella*

Microthrix parvicella zeigte im Belebtschlamm der Anlagen KA-GR und KA-BT deutliche Aktivitäten für die vier untersuchten Enzyme, insbesondere für Lipasen wurden sehr hohe Aktivitäten ermittelt (Tab. 7). Die fluoreszierenden ELF-Kristalle waren auf der Zelloberfläche lokalisiert. Des Weiteren wurde festgestellt, dass die untersuchten in situ Enzymaktivitäten im Schaum der Anlagen KA-GR und KA-BT wesentlich niedriger waren. Zum einen wiesen weniger Filamente Enzymaktivität auf und auch die Zahl fluoreszierender Granula pro Filament war deutlich niedriger als im Belebtschlamm.

Die Zuordnung der in situ Aktivitäten zu den *M. parvicella*-Filamenten erfolgte durch Kombination mit Phasenkontrastmikroskopie (Abb. 24a, c) sowie Neisserfärbung (Abb. 24b, d). Die Anwendung der Gramfärbung erlaubte zwar ebenfalls eine eindeutige Zuordnung, ist jedoch aufgrund der aufwändigeren Methodik weniger empfehlenswert, da gleiche Bildausschnitte vor und nach der Färbung ausgewertet werden müssen.



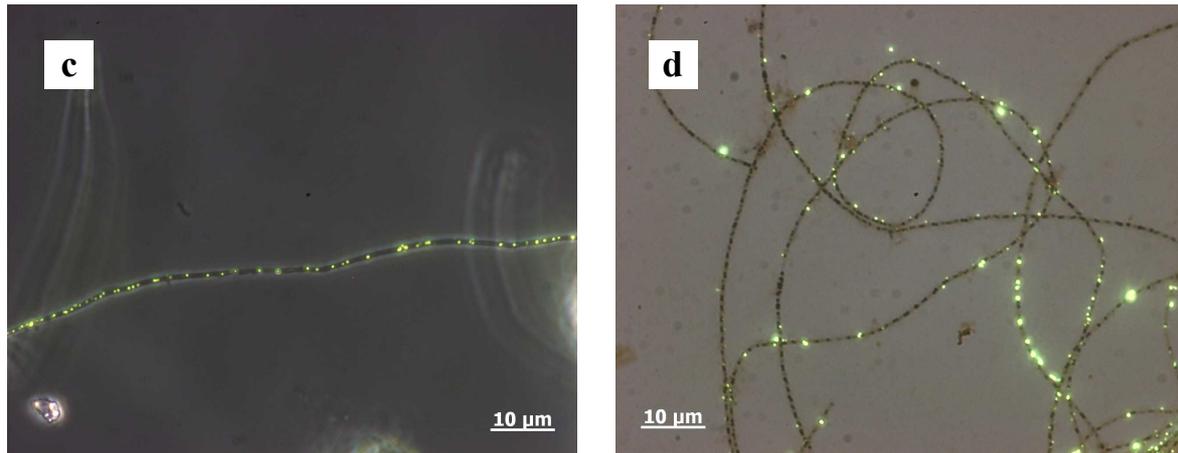
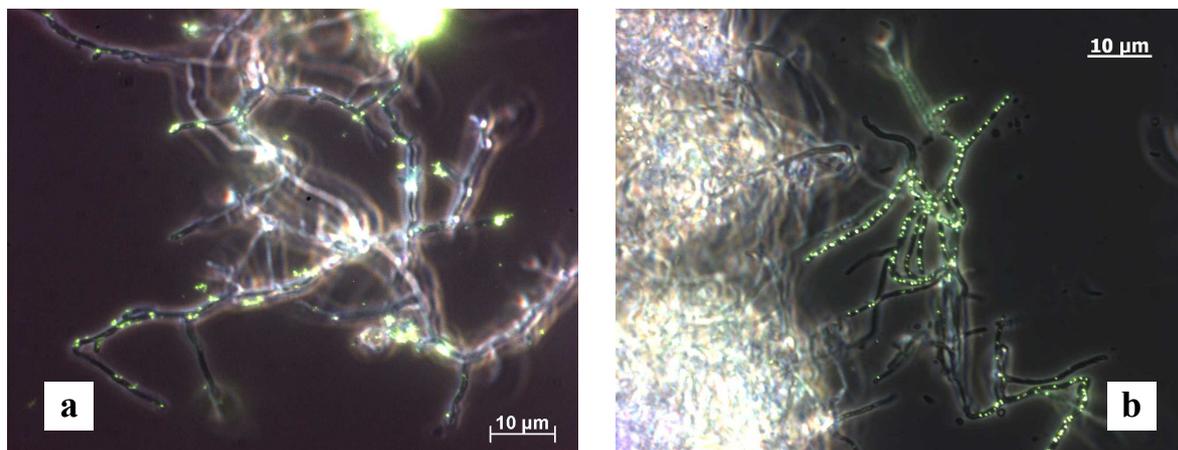


Abb. 24: In situ Enzymaktivitäten von *Microthrix parvicella*. (a) Lipase-Aktivität, Kombination mit Phasenkontrast. (b) Lipase-Aktivität, Kombination mit Neisserfärbung. (c) Phosphatase-Aktivität, Kombination mit Phasenkontrast. (d) Phosphatase-Aktivität, Kombination mit Neisserfärbung. Vergrößerung 1000fach

Die Fluoreszenz in situ Hybridisierung erwies sich ebenfalls als wenig geeignet, da fast die gesamten auf *M. parvicella* lokalisierten ELF-Kristalle nach der Hybridisierungsprozedur nicht mehr nachweisbar waren. Etwas bessere Ergebnisse erzielte man sowohl durch Verzicht auf die Lysozym-Vorbehandlung als auch durch eine Reduktion der Hybridisierungsdauer von 18 h auf 1 h. Allerdings waren dann die FISH-Signale schwach und unregelmäßig.

1.3.3.2 Nocardioforme Actinomyceten

Ein Teil der nocardioformen Actinomyceten aus dem Belebungsbecken der zweiten Stufe der KA-M wies sowohl im Belebtschlamm als auch im Schaum deutliche Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivität auf. Im Gegensatz dazu wurden nur geringe Lipase-Aktivitäten beobachtet (Tab. 7). Da die nocardioformen Actinomyceten im Schaum massiv angereichert waren (siehe Kap. C.1.1.1), war dort auch die Zahl aktiver Filamente um ein Vielfaches höher als im Belebtschlamm. Die Enzymaktivitäten waren ebenfalls auf der Zelloberfläche lokalisiert. Für die Zuordnung der Aktivitäten lieferten sowohl Phasenkontrastmikroskopie (Abb. 25a, b) als auch FISH (Abb. 25c, d) gute Ergebnisse. Allerdings ist die Kombination mit der FISH-Technik zu bevorzugen, da der Einsatz spezifischer Sonden eine präzisere Identifikation der Actinomyceten ermöglicht.



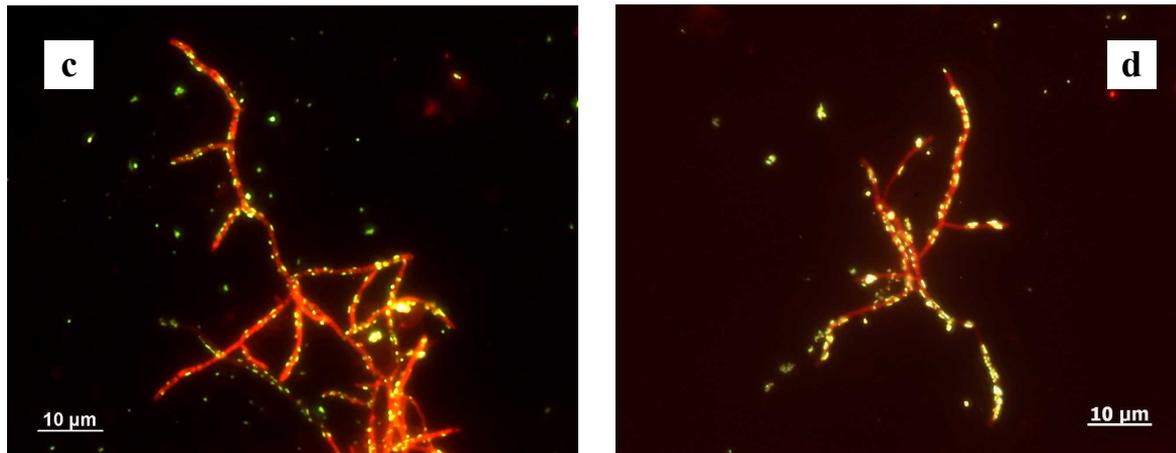


Abb. 25: In situ Enzymaktivitäten von nocardioformen Actinomyceten. (a) Lipase-Aktivität, Kombination mit Phasenkontrast. (b) Esterase-Aktivität, Kombination mit Phasenkontrast. (c) Phosphatase-Aktivität, Kombination mit FISH (Sonde Myc657-Cy3). (d) Phosphatase-Aktivität, Kombination mit FISH (Sonde RHO183-Cy3). Vergrößerung 1000fach

Mit Hilfe der FISH-Technik konnte nachgewiesen werden, dass die Phosphatase-, Esterase-, Lipase- und β -Glucuronidase-aktiven Actinomyceten positive Signale mit der Sonde Myc657 lieferten. Durch den Einsatz der Sonde RHO183 wurden diese als Organismen aus dem *Rhodococcus* sp. Cluster B charakterisiert. Dagegen wiesen die DIE993-positiven *Dietzia* spp. keine Enzymaktivität auf.

Rhodococcus erythropolis aus der Anlage KA-BT zeigte ebenfalls Phosphatase-, Esterase-, β -Glucuronidase- sowie eine geringe Lipase-Aktivität. Aufgrund der starken Anreicherung im Schaum war auch dort die Zahl aktiver Organismen höher als im Belebtschlamm.

1.3.3.3 Morphotyp *Nostocoida limicola*

In Filamenten des Morphotyps *Nostocoida limicola* wurden sowohl im Belebtschlamm als auch im Schaum meist nur geringe Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivitäten festgestellt. Lipase-Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden (Tab. 7). Für die Zuordnung der Aktivität erwiesen sich sowohl die Neisserfärbung (Abb. 26a) als auch die FISH-Technik (26b, c, d) als geeignet. Dennoch ist eine Kombination mit FISH aufgrund der großen phylogenetischen Diversität von *N. limicola* unumgänglich. Da Filamente des *N. limicola* Morphotyps verschiedenen phylogenetischen Gruppen angehören (z.B. *Firmicutes* oder *Chloroflexi*-Phylum; Klasse *Actinobacteria* oder *Alphaproteobacteria*), unterscheiden sich sehr wahrscheinlich auch deren physiologische Eigenschaften, wie z.B. Enzymaktivitäten, voneinander. Untersuchungen von Müller (2006), in denen klassische mikroskopische Belebtschlammanalysen mit FISH verglichen wurden, zeigten jedoch, dass die derzeit zur Verfügung stehenden Sonden noch nicht zur phylogenetischen Charakterisierung aller *N. limicola* Organismen ausreichen. Daher wurde in Proben, in denen *N. limicola*-Organismen mit keiner der bekannten Sonden Signale lieferten, die Neisserfärbung zur Zuordnung der Enzymaktivität verwendet.

In den untersuchten Belebtschlämmen und Schäumen wiesen NLII65-positive Organismen aus der Klasse der *Actinobacteria* Phosphatase-, Esterase- (Abb. 26b) und β -Glucuronidase-Aktivität auf. β -Glucuronidase-Aktivität wurde ebenfalls in NLIMII 175-positiven *Actinobacteria* (Abb. 26c) sowie NLIMI 91-positiven *Firmicutes*-Filamenten (Abb. 26d) gefunden.

Dagegen wurden in den zur Klasse der *Alphaproteobacteria* gehörenden Noli-644-, PPx3-1428- und MC2-649-positiven Filamenten sowie in den AHW183-positiven Organismen des *Chloroflexi*-Phylums keine Aktivitäten nachgewiesen (Tab. 7).

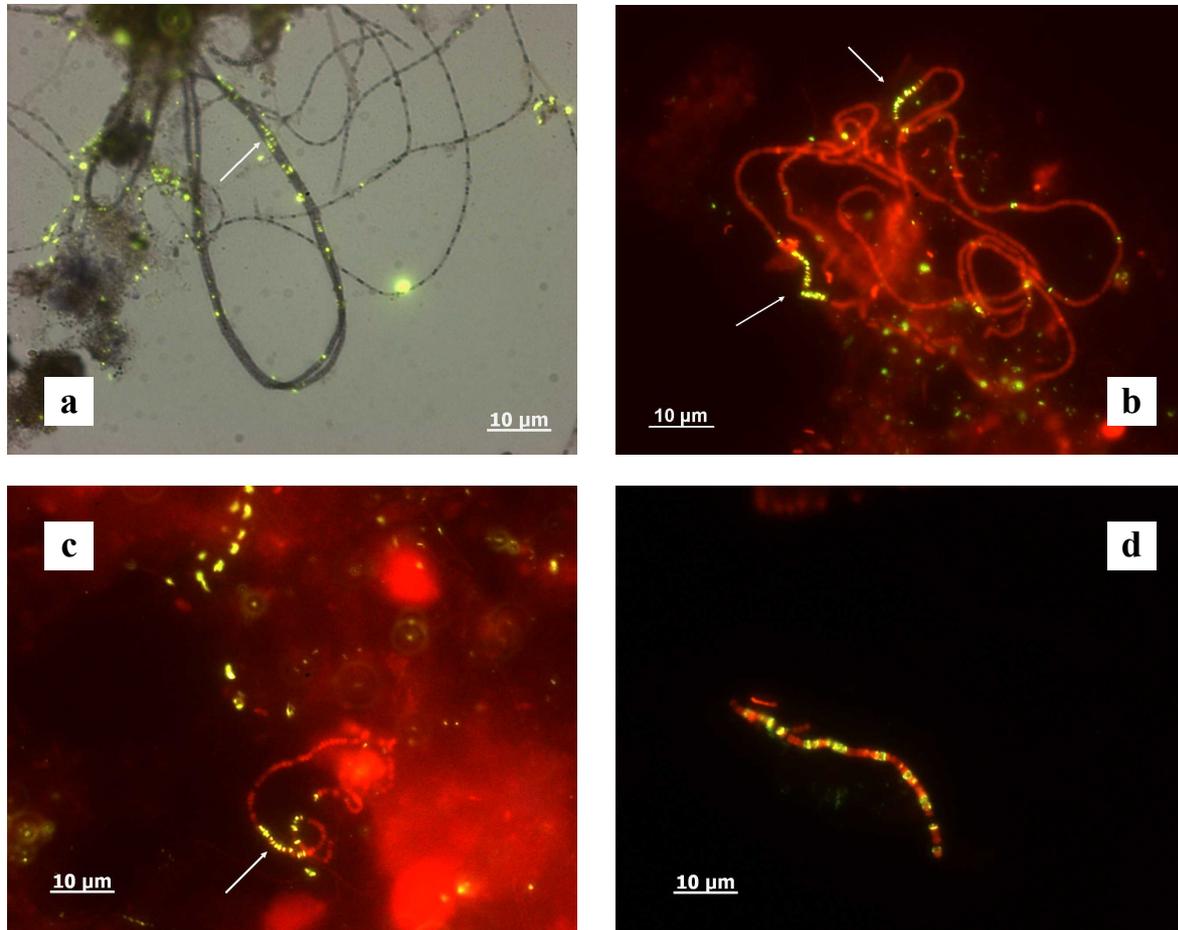


Abb. 26: In situ Enzymaktivitäten verschiedener *Nostocoida limicola* Morphotypen. (a) Phosphatase-Aktivität, Kombination mit Neisserfärbung. (b) Esterase-Aktivität, Kombination mit FISH (Sonde NLII65-Cy3). (c) β -Glucuronidase-Aktivität, Kombination mit FISH (Sonde NLIMII 175-Cy3). (d) β -Glucuronidase-Aktivität, Kombination mit FISH (Sonde NLIMI 91-Cy3). Vergrößerung 1000fach

1.3.3.4 Morphotyp 0041/0675

Zahlreiche Filamente des Morphotyps 0041/0675 waren im Belebtschlamm Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-positiv mit hohen Aktivitäten. Im Schaum zeigten nur noch wenige Typ 0041/0675-Organismen eine (mäßige) Enzymaktivität (Tab. 7). Während die Filamente selbst keine Lipase-Aktivität zeigten, erwiesen sich jedoch einige der Aufwuchsbakterien als Lipase-positiv. Die großen, unregelmäßig geformten ELF-Kristalle erlaubten eine einfache Detektion der Enzymaktivität von Phosphatase, Esterase und β -Glucuronidase in Verbindung mit der Phasenkontrast-Mikroskopie (Abb. 27a). Dies ermöglichte die Bestimmung aktiver Filamente auch innerhalb der Schlammflocke.

Die Zuordnung der Aktivitäten zu den 0041/0675-Organismen konnte auch mit Hilfe der Gramfärbung bestätigt werden, wurde allerdings aufgrund des bereits beschriebenen methodi-

schen Aufwands nur in Einzelfällen durchgeführt. Durch Kombination mit der FISH-Technik unter Anwendung TM7-gruppenspezifischer Sonden konnten einigen TM7905- und TM7305-positiven 0041/0675-Filamenten Enzymaktivitäten zugeordnet werden (Abb. 27b). Da beide Sonden jedoch nur einen Teil der 0041/0675-Filamente detektieren und für die übrigen Organismen dieses Morphotyps noch keine spezifischen Sonden zur Verfügung stehen, konnten diesen Organismen Enzymaktivitäten nur durch Kombination mit der allgemeinen *Bacteria*-Sonde EUB338 zugewiesen werden (Tab. 7).

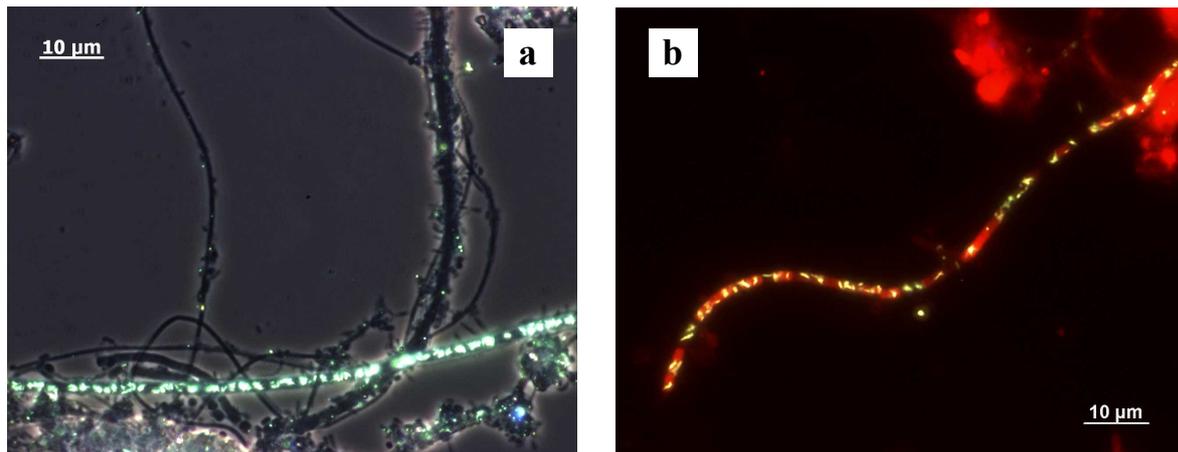


Abb. 27: In situ Enzymaktivitäten von Typ 0041/0675. (a) Phosphatase-Aktivität, Kombination mit Phasenkontrast. (b) Phosphatase-Aktivität, Kombination mit FISH (Sonde TM7905-Cy3). Vergrößerung 1000fach

1.3.3.5 Morphotyp 1851

Typ 1851-Filamente zeigten ebenfalls Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-, jedoch keine Lipase-Aktivität. Auch hier erwies sich ein Teil der Aufwuchsorganismen als Lipase-positiv. Im Belebtschlamm war sowohl die Anzahl aktiver Organismen als auch die Intensität der Aktivität höher als im Schaum (Tab. 7).

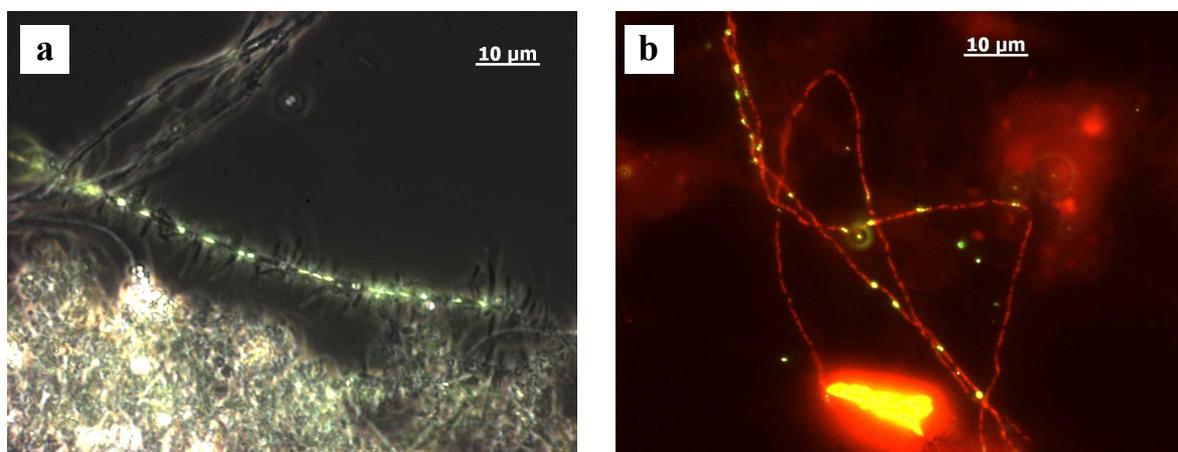


Abb. 28: In situ Enzymaktivitäten von Typ 1851. (a) Phosphatase-Aktivität, Kombination mit Phasenkontrast. (b) β -Glucuronidase-Aktivität, Kombination mit FISH (Sonde CHL 1851-Cy3). Vergrößerung 1000fach.

Die Aktivitäts-Zuordnung erfolgte sowohl mit Hilfe der Phasenkontrastmikroskopie (Abb. 28a), als auch durch Kombination mit FISH mit der Sonde CHL 1851 (Abb. 28b). Der Nachweis mittels FISH ist v.a. bei geringer Typ 1851-Fädigkeit vorteilhaft, da in diesem Fall enzymatisch aktive Typ 1851-Filamente im Phasenkontrast leicht übersehen werden können.

1.3.3.6 Morphotyp 0092

Auch wenn viele der in dieser Studie untersuchten Typ 0092-Organismen keine Enzymaktivität aufwiesen, wurden doch in einigen Filamenten deutliche Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivitäten festgestellt, die im Schaum etwas niedriger waren als im Belebtschlamm (Tab. 7). Eine Kombination mit FISH war aufgrund des Fehlens einer geeigneten Oligonukleotidsonde nicht möglich.

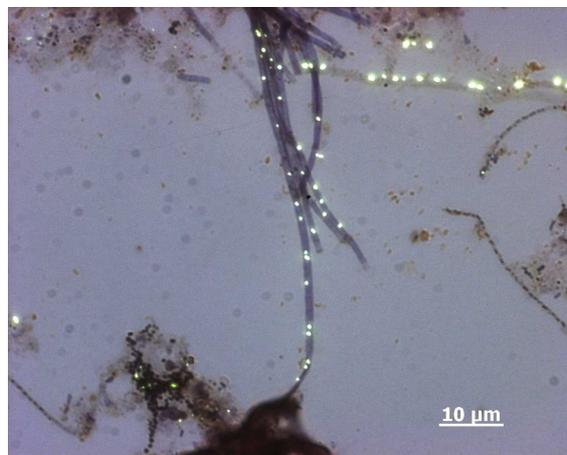


Abb. 29: In situ Enzymaktivität von Typ 0092. Phosphatase-Aktivität, Kombination mit Neisserfärbung. Vergrößerung 1000fach.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen anderer Untersuchungen hybridisierten die Typ 0092-Filamente weder mit der Sonde 0092-997, die *Bacteroidetes*-verwandte Organismen detektiert, noch mit CF319a, die das *Cytophaga-Flavobacterium* Cluster des *Cytophaga-Flavobacterium-Bacteroidetes*-Phylums erfasst. Auch die Phasenkontrastmikroskopie erwies sich als ungeeignet, um die Enzymaktivitäten den Typ 0092-Filamenten zuzuweisen, da diese im Phasenkontrast leicht übersehen werden können. Daher wurde zur Zuordnung der Aktivitäten die Kombination mit der Neisserfärbung ausgewählt (Abb. 29).

1.3.3.7 *Isosphaera* spp.

Bezüglich der Zuordnung von fadenbildenden Organismen zu dem Morphotyp *N. limicola* III bzw. zu *Isosphaera* spp. bestehen in der Literatur einige Unstimmigkeiten. Dies beruht auf der Verwendung verschiedener Parameter, die für die Unterscheidung von *N. limicola* Morphotypen herangezogen werden. Einige Autoren differenzieren die Morphotypen nur anhand des Zelldurchmessers, wobei Typ I die dünnsten und Typ III die dicksten Filamente aufweist (Liu und Seviour 2001), andere verwenden die klassische Beschreibung nach Eikelboom und van Buijsen (1983), wo Typ III als gebogenes, unbewegliches Filament mit scheibenförmigen Zellen und einem Durchmesser von ca. 1,5 μm charakterisiert wird. Die Differenzierung allein anhand des Zelldurchmessers kann dazu führen, dass *Isosphaera*-

Organismen, die von Staley et al. (1992) als leicht gebogene Filamente mit gleichmäßigen transparenten Kokken beschrieben werden, fälschlicherweise dem *N. limicola* Morphotyp III zugeordnet werden.

In dieser Studie wurden *Isosphaera*-Filamente anhand der Beschreibung von Staley et al. (1992) bestimmt und untersucht (Abb. 30a). Die Filamente hybridisierten mit der Sonde NLIMIII 301, die einen bisher unbekanntem Organismus aus der Ordnung *Planctomycetales* detektiert (Abb. 30b). Aufgrund der Sequenzhomologie ist dieser Organismus am nächsten verwandt zu *Isosphaera* spp.. Die Sonde wurde von Liu und Seviour (2001) für ein Isolat entwickelt, welches von den Autoren dem Eikelboom Morphotyp *N. limicola* III zugeordnet wurde.

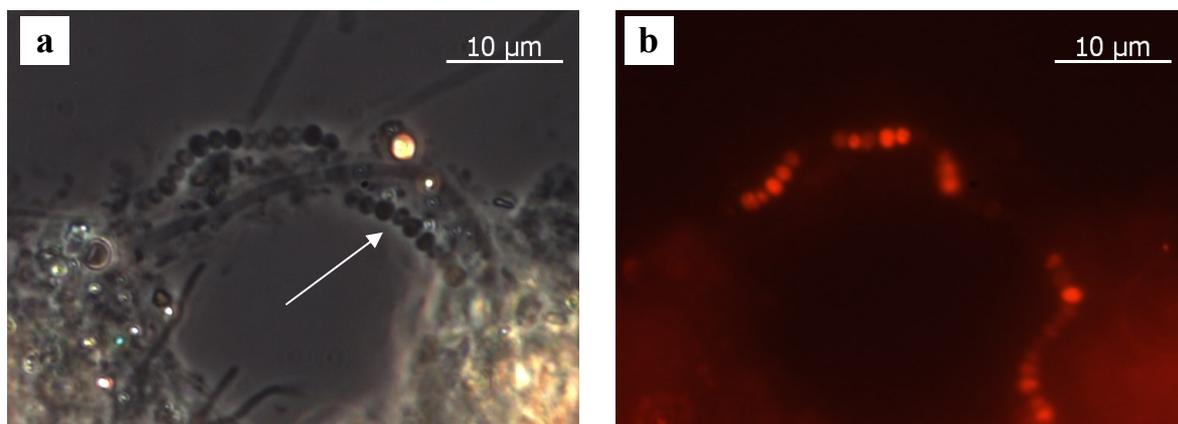


Abb. 30: (a) *Isosphaera* spp. (Pfeil): Phasenkontrast-Mikroskopie. (b) *Isosphaera* spp.: FISH mit der Sonde NLIMIII 301-Cy3. Vergrößerung 1000fach

In den beprobten Kläranlagen wurden keine Exoenzymaktivitäten für Phosphatase, Esterase, β -Glucuronidase bzw. Lipase in den untersuchten *Isosphaera*-Filamenten festgestellt. Dies wurde sowohl durch Kombination mit der Phasenkontrastmikroskopie als auch durch Anwendung der FISH-Technik mit Hilfe der Sonde NLIMIII 301 bestätigt (Tab. 7).

1.3.3.8 Sonstige fadenbildende Bakterien

Haliscomenobacter hydrossis war regelmäßig in den untersuchten Anlagen vorhanden. Die taxonomische Charakterisierung mittels FISH und der Sonde HHY ordnet diesen Organismus dem *Bacteroidetes*-Phylum zu. Im in situ Experiment konnte in den Filamenten keine Aktivität für Phosphatase, Esterase, β -Glucuronidase bzw. Lipase nachgewiesen werden (Tab. 7). Eine Zuordnung ist mit Phasenkontrastmikroskopie und durch Hybridisierung mit HHY möglich. Allerdings ist die Anwendung der FISH-Technik zu bevorzugen, da *H. hydrossis* im Phasenkontrast z.T. übersehen und daher zahlenmäßig häufig unterschätzt wird (siehe auch Kap. C.1.1.2).

Typ 021N wurde in zwei Anlagen in hoher Zelldichte gefunden. Die Organismen hybridisierten sowohl mit der Sonde 21N als auch mit G123T. Letztere detektiert neben dem Eikelboom Typ 021N auch diverse *Thiothrix* spp.. Die Enzymaktivitätsbestimmungen wurden mit Phasenkontrastmikroskopie sowie FISH kombiniert und ergaben für die hier untersuchten Typ 021N-Filamente keine positiven Reaktionen (Tab. 7).

Auch **Typ 0961** wurde in zwei Anlagen beobachtet und kam dort mit einer Häufigkeit von 2 bzw. 3 vor. Die Identifikation der Organismen erfolgte nur mit Hilfe des Bestimmungsschlüssels nach Eikelboom (2000), da bis jetzt noch keine Oligonukleotidsonden für diesen Organismus vorhanden sind. Die Analyse der in situ Enzymaktivitäten war für die meisten Typ 0961-Filamente negativ, nur in vereinzelt Fällen wurden sehr geringe Phosphatase- sowie β -Glucuronidase-Aktivitäten gefunden (Tab. 7).

Der **Fadentyp 1863** wurde nur vereinzelt in den Belebtschlamm und Schäumen detektiert. FISH mit der Sonde ACA23a zeigte, dass die Filamente phylogenetisch der Gattung *Acinetobacter* zuzuordnen sind. In situ Enzymaktivitäten wurden nicht beobachtet (Tab. 7). Allerdings sind diese Ergebnisse aufgrund des seltenen Vorkommens dieser Organismen in den untersuchten Anlagen noch nicht aussagekräftig. Dasselbe gilt für *Sphaerotilus natans*, der ebenfalls nur gelegentlich zu finden war. Auch hier wurde nach Detektion der Filamente mit der Sonde SNA keine in situ Enzymaktivität festgestellt (Tab. 7).

1.4 Anwendungsmöglichkeit in der Praxis: Monitoring der Lipase-Aktivität von *Microthrix parvicella* während Bekämpfungsmaßnahmen

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft (ehemals Wassergüte- und Abfallwirtschaft) der TU München die Wirkung von $AlCl_3$ bei der Bekämpfung von *Microthrix parvicella* in einer halbtechnischen Versuchsanlage untersucht (Paris 2004).

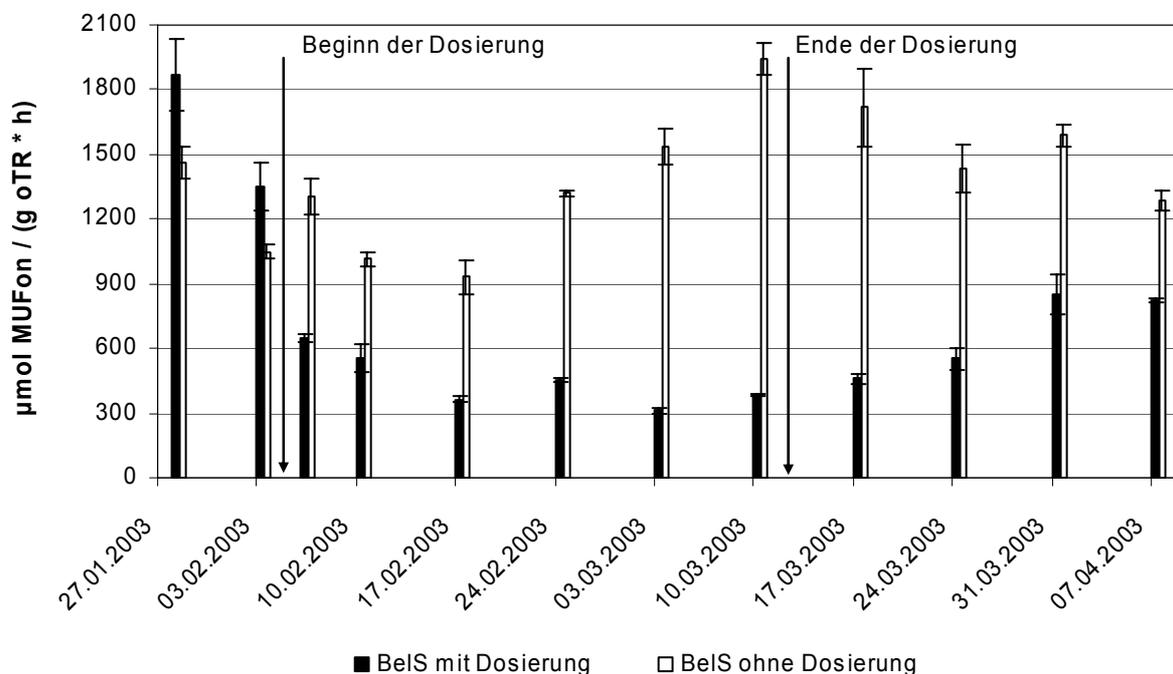


Abb. 31: $AlCl_3$ -Dosierung in einer halbtechnischen Versuchsanlage – Gesamt-Lipase-Aktivität (BeIS: Belebtschlamm; MUFon: Methylumbelliferon)

Mit Hilfe der klassischen Gesamt-Lipase-Aktivitätsmessung wurde bereits nach zwei Tagen $AlCl_3$ -Dosierung ein starker Rückgang der Aktivität im Vergleich zum Kontrollbecken be-

obachtet (Abb. 31). Im weiteren Verlauf sank die Lipase-Aktivität auf etwa ein Fünftel der anfänglichen Aktivität. Nach Beendigung der Dosierung war wieder ein deutlicher Aktivitätsanstieg zu verzeichnen. Diese Ergebnisse konnten auch in situ bestätigt werden. Die *M. parvicella*-Filamente enthielten nach der AlCl_3 -Dosierung deutlich weniger und wesentlich schwächer fluoreszierende Granula als im Kontrollbecken ohne Aluminium-Zugabe (Abb. 32). Nach dem Ende der Dosierung nahm die Zahl der Granula erneut zu.

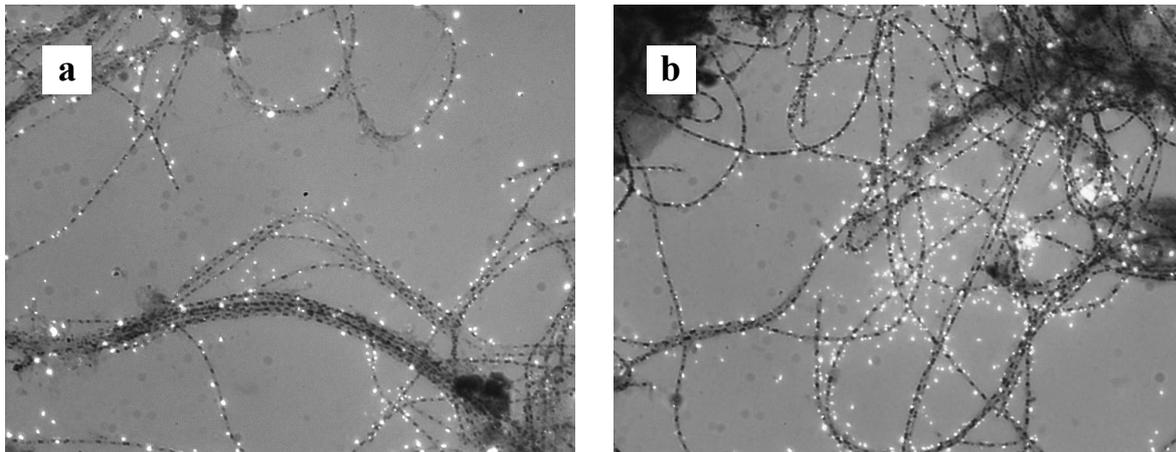


Abb. 32: AlCl_3 -Dosierung in einer halbtechnischen Versuchsanlage - In situ Lipase-Aktivitäten von *Microthrix parvicella*. (a) Belebtschlamm mit AlCl_3 -Dosierung (Überlagerung von Epifluoreszenzmikroskopie und Neisserfärbung). (b) Belebtschlamm ohne AlCl_3 -Dosierung (Überlagerung von Epifluoreszenzmikroskopie und Neisserfärbung)

2 Physiologische Untersuchungen an fadenbildenden *Microthrix parvicella*- und *Nostocoida limicola*-Reinkulturen

Alle Wachstumsuntersuchungen erfolgten bei einer Temperatur von 20-22°C.

2.1 *Microthrix parvicella*-Reinkulturen

2.1.1 Morphologische Charakterisierung

Insgesamt wurden 31 Reinkulturen aus Belebtschlammern der kommunalen Kläranlagen KA-AN, KA-B, KA-STA und KA-WOR isoliert. Die Reinkulturen wuchsen sowohl auf R2A- als auch auf Belebtschlammhydrolysat-Medium HA als kleine, unregelmäßig geformte Kolonien, an deren Rändern deutlich Filamente erkennbar waren. Die Bakterien bildeten dünne unverzweigte, stark gebogene bzw. geknäuelte Filamente ohne Scheide mit einem Durchmesser von 0,5-0,7 μm , die viele hundert μm lang werden konnten und in ihrer Morphologie den von van Veen (1973), Eikelboom (1975), Slijkhuis (1983b), Blackall et al. (1994) und Rossetti et al. (1997) isolierten Reinkulturen entsprachen. Innerhalb der Filamente waren keine Zellsepten zu erkennen. Sie zeigten eine positive Gram- und Neisserreaktion (Polyphosphatgranula). Morphologie und Färbeverhalten dieser Isolate stimmen mit dem Erscheinungsbild von *Microthrix parvicella* im Belebtschlamm überein.

2.1.2 Phylogenetische Charakterisierung

Fluoreszenz in situ Hybridisierungen der isolierten Reinkulturen mit den von Erhart et al. (1997) entwickelten Oligonukleotidsonden MPA60, MPA223 und MPA645 zur Detektion von Candidatus *Microthrix parvicella* ergaben positive Signale für alle untersuchten Stämme. Bei Anwendung der Sonden HGC1156 und HGC96a, die Organismen mit einem hohen Gehalt an Guanin und Cytosin in ihrem genetischen Material detektieren („Hoch-GC-Bakterien“), reagierten die Isolate nur mit der Sonde HGC1156. Dies wurde auch von Erhart (1997) beim Nachweis von *M. parvicella* im Belebtschlamm beobachtet. Die Ergebnisse bestätigen, dass es sich bei den Isolaten um *M. parvicella* handelt.

2.1.3 Physiologische Untersuchungen

Wachstum in komplexen Nährmedien

Während in R2A-Flüssigmedium nur ein geringes Wachstum der *M. parvicella*-Reinkulturen beobachtet wurde, war dieses in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium wesentlich stärker. Dabei bildete sich neben mehreren kleinen Flöckchen stets eine einzige große Flocke aus *M. parvicella*-Filamenten, deren Größe im Verlauf des Wachstums ständig zunahm (Abb. 33).

Eine Quantifizierung des Wachstums über die Zeit durch Bestimmung der optischen Dichte der Zellsuspension war aufgrund dieser Flockenbildung nicht möglich. Die hierzu notwendige homogene Verteilung der Zellen hätte eine mechanische Homogenisierung der Flocken erfordert und damit den Prozess der Flockenbildung zerstört. Daher wurde der Verlauf des Wachstums durch visuelle Beurteilung der Wachstumsintensität abgeschätzt und mit Kategorien bewertet. Es zeigte sich, dass nach ca. 4 bis 7 Tagen ein steiler Anstieg des Wachstums einsetzte, das nach etwa 10-12 Tagen die stationäre Phase erreichte. In Abbildung 34 ist der Wachstumsverlauf der *M. parvicella*-Reinkulturen STA 4 und MBER 6 dargestellt.



Abb. 33: Wachstum der *Microthrix parvicella*-Reinkultur STA 4 in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium

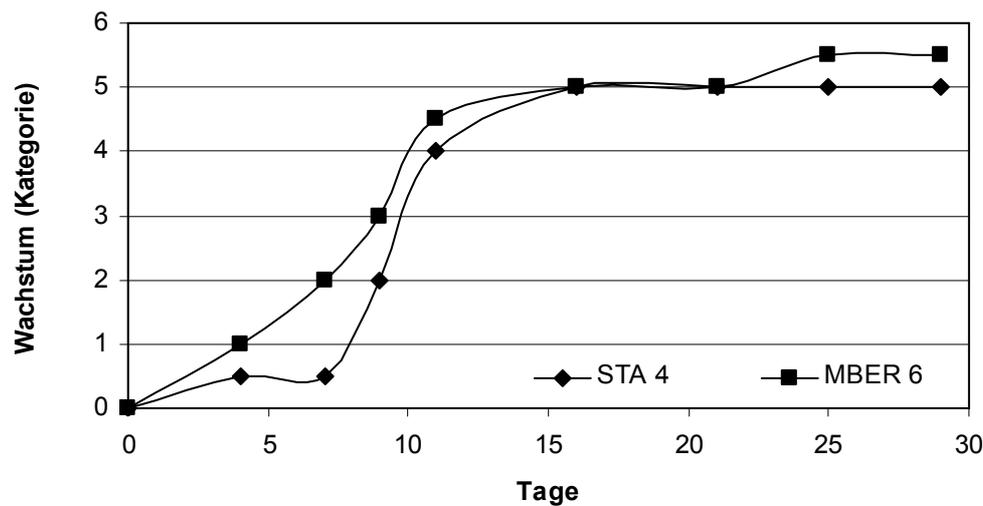


Abb. 34: Wachstumsverlauf der *Microthrix parvicella*-Reinkulturen STA 4 und MBER 6 in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium (CSB-Konzentration 2 g O₂/l; pH 8,0)

Die Untersuchungen zeigten außerdem, dass das Wachstum der Reinkulturen bei einem pH-Wert des Mediums von 8 unterstützt wurde, während bei pH-Werten von 6 und 7 nur geringes Wachstum erfolgte (Abb. 35).

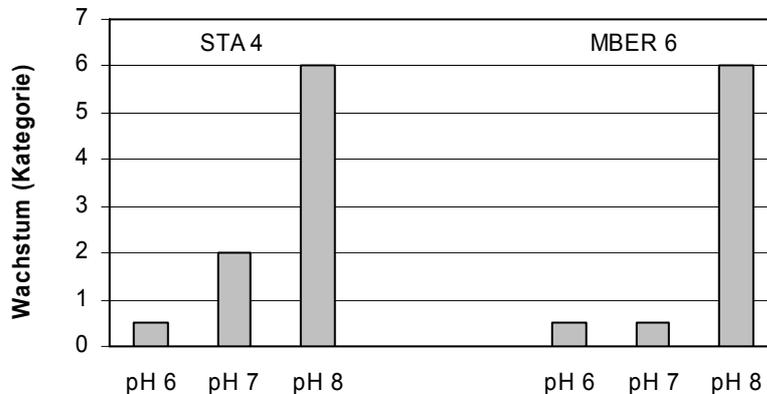


Abb. 35: Abhängigkeit des Wachstums der *Microthrix parvicella*-Reinkulturen STA 4 und MBER 6 in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium (CSB-Konzentration 2 g O₂/l) bei unterschiedlichen pH-Werten nach 19 Tagen

Wachstum in Minimalmedien mit verschiedenen C- und N-Quellen

Des Weiteren wurde das Wachstum der Reinkulturen in dem Minimalmedium MSV untersucht, das neben Mineralsalzen und Vitaminen Ammonium oder Nitrat als Stickstoffquelle sowie Glucose, Acetat, Citrat oder Tween 80 als Kohlenstoffquelle enthielt. Dabei zeigte sich, dass das Wachstum in keinem Fall unterstützt wurde. Auch in dem von Slijkhuis (1983b) beschriebenen Medium, das dieser zur Kultivierung seiner *M. parvicella*-Isolate einsetzte, erfolgte kein Wachstum der in dieser Studie untersuchten Reinkulturen.

Wachstum nach Zugabe von Rhamnolipiden

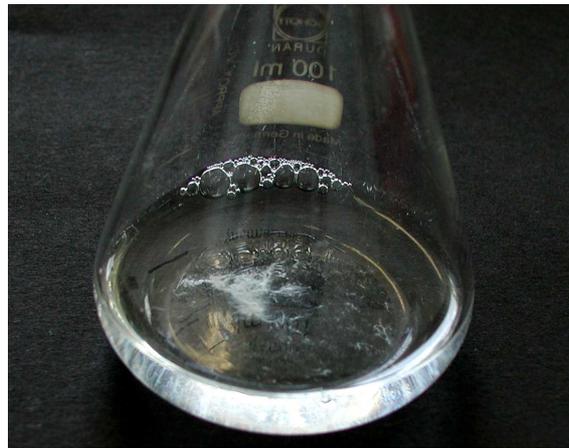


Abb. 36: Wachstum der *Microthrix parvicella*-Reinkultur STA 6 in ammoniumhaltigem MSV-Medium nach Zugabe von Rhamnolipiden

Die Zugabe der von *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 produzierten Rhamnolipide in einer Konzentration von 10 mg/l bewirkte eine auffallende Steigerung der Biomasseproduktion der *M. parvicella*-Reinkultur STA 6 in R2A-Flüssigmedium sowie im Mineralsalzmedium MSV mit Tween 80 als Kohlenstoffquelle. Dabei war das Wachstum mit NH_4^+ als Stickstoffquelle größer als mit NO_3^- . Da ein starkes Wachstum auch in ammoniumhaltigem MSV-Medium beobachtet wurde, das nur die Rhamnolipide und keine weitere Kohlenstoffquelle enthielt, konnten die Rhamnolipide von dieser Reinkultur anscheinend auch direkt als Substrat genutzt werden. Das Wachstum erfolgte, wie schon im HA-Medium, in Form einer großen Filament-Flocke (Abb. 36). Eine Analyse des Rhamnolipid-Extrakts mittels GC/MS (Gaschromatografie/Massenspektrometrie) am Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft (ehemals Wassergüte- und Abfallwirtschaft) der TU München ergab, dass die drei Fettsäuren Palmitinsäure, Ölsäure sowie eine weitere ungesättigte C16-Fettsäure dominierten.

Die Zugabe des Rhamnolipid-Extrakts der Firma Jeneil Biosurfactants zu HA-Flüssigmedium mit Endkonzentrationen von 0,01 bis 10 mg/l beschleunigte z.T. die Wachstumsgeschwindigkeit der untersuchten *M. parvicella*-Reinkulturen, der letztendlich erreichte Zellertrag war jedoch nicht höher. Rhamnolipid-Konzentrationen von 50 bzw. 100 mg/l unterdrückten dagegen das Wachstum von *M. parvicella* (Tab. 8).

Tabelle 8: Wachstumsintensität der *Microthrix parvicella*-Reinkultur MBER6 nach Zugabe eines Rhamnolipid-Extrakts

Rhamnolipid-Konzentration im Testansatz	Wachstumskategorie nach		
	10 Tagen	17 Tagen	21 Tagen
0 mg/l	1,5	2,5	6
1 mg/l	5	6	6
50 mg/l	0,5	0,5	0,5

2.2 *Nostocoida limicola*-Reinkulturen aus dem *Chloroflexi*-Phylum

2.2.1 Morphologische Charakterisierung

Es wurden 10 Reinkulturen aus der kommunalen Kläranlage KA-AN isoliert. Die Reinkulturen wuchsen auf HA-Medium als runde Kolonien mit einem leicht gekräuselten Rand. Sie bildeten gewundene, unverzweigte Filamente ohne Scheide mit einem Durchmesser von 1,0-1,2 μm und konnten mehrere hundert μm lang werden. 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. Die Neisserfärbung war meist negativ, vereinzelt enthielten einige Filamente Neisser-positive Granula.

2.2.2 Phylogenetische Charakterisierung

In Zusammenarbeit mit der Firma Vermicon wurde die 16S rDNS von vier Isolaten 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 zu den grünen Nichtschwefelbakterien (jetzt *Chloroflexi*-Phylum) gehören (Schade et al. 2002). 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.

Mit Hilfe des Programm-Paketes ARB wurde von der Firma Vermicon die spezifische Oligonukleotidsonde AHW183 zur Detektion der Isolate entwickelt. Die Sondenspezifität und die optimalen Hybridisierungsbedingungen wurden anhand der vorhandenen Reinkulturen evaluiert. Unter stringenten Bedingungen (35% Formamid, 46°C) zeigten alle isolierten Stämme helle und starke Hybridisierungssignale (Schade et al. 2002).

2.2.3 Physiologische Untersuchungen

Wachstum in komplexen Nährmedien

Das Wachstum der Reinkulturen wurde in den komplexen Nährmedien HA und R2A untersucht. Während in R2A-Medium kein Wachstum festgestellt wurde, wuchsen die Reinkulturen in HA-Medium in Form zahlreicher Filament-Flocken, die einem Durchmesser von 0,5-1 mm besaßen. Der Verlauf des Wachstums wurde ebenfalls mit Hilfe von Kategorien bewertet, um den Prozess der Flockenbildung nicht durch Homogenisierung zu zerstören. Nach etwa einer Woche wurde ein langsamer Anstieg des Wachstums beobachtet, welches nach ca. drei Wochen die stationäre Phase erreichte (Abb. 37).

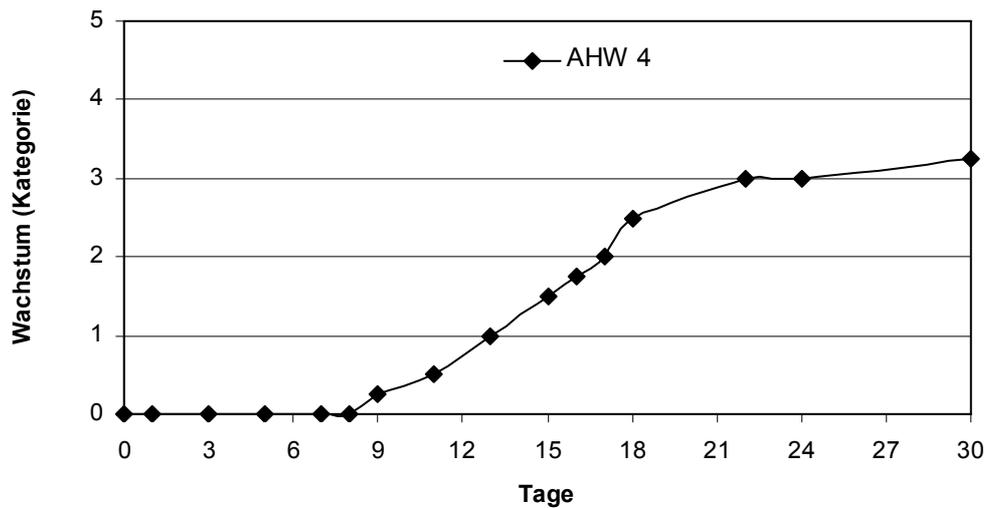


Abb. 37: Wachstumsverlauf der *Nostocoida limicola*-Reinkultur AHW 4 aus dem *Chloroflexi*-Phylum in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium (CSB-Konzentration 2 g O₂/l; pH 7,0)

Weiter wurde der Einfluss der CSB-Konzentration sowie des pH-Wertes des HA-Mediums auf das Wachstum untersucht. Hier wurde die Wachstumsintensität nach drei Wochen über eine Messung der optischen Dichte ermittelt und quantifiziert. Dazu wurden die Flüssigkulturen durch Behandlung mit einem Potter homogenisiert (3 min; 1000 UpM) und anschließend bei einer Wellenlänge von 405 nm im Photometer gemessen. CSB-Konzentrationen zwischen 1 und 4 g O₂/l bei einem pH-Wert von 7,2 ermöglichten ein deutliches Wachstum der Isolate, welches jedoch bei einer Konzentration von 1 g O₂/l bereits signifikant reduziert war (Abb. 38). Bei noch niedrigeren CSB-Konzentrationen von 0,2 bzw. 0,4 g O₂/l wurde dagegen kaum Wachstum beobachtet. In einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,0 und einer CSB-Konzentration von 2 g O₂/l wurde das Wachstum unterstützt mit etwas niedrigerer Intensität bei einem pH-Wert von 6,0 (Abb. 39).

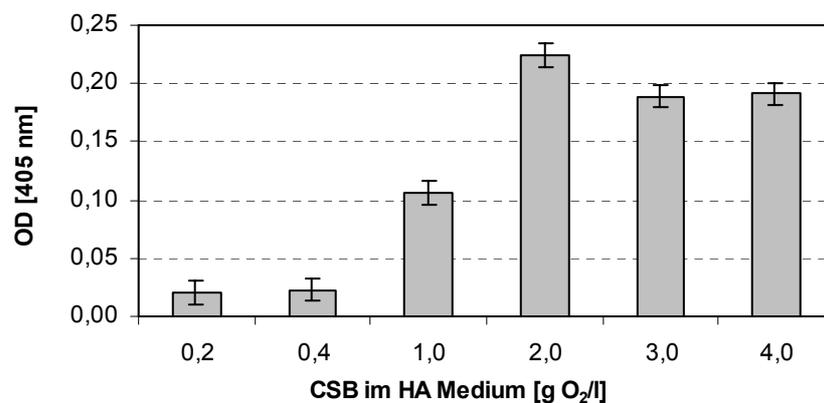


Abb. 38: Wachstum der *Nostocoida limicola*-Reinkultur AHW 27 aus dem *Chloroflexi*-Phylum in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium bei unterschiedlichen CSB-Konzentrationen (pH 7,2)

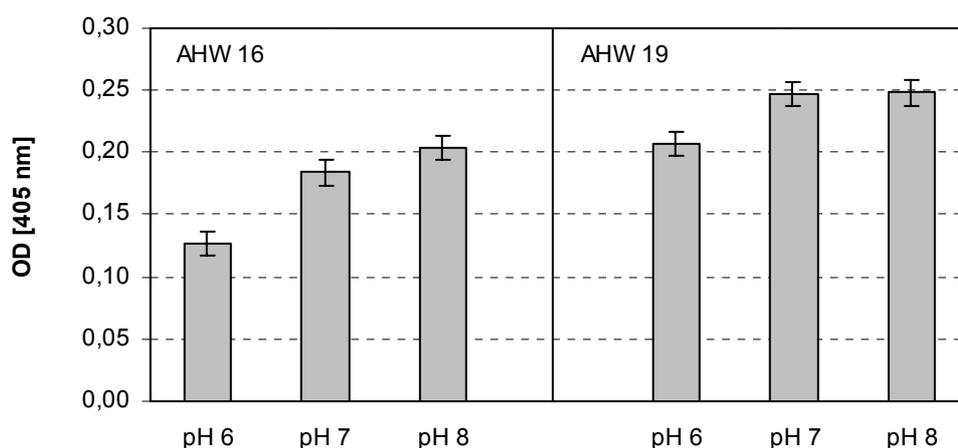


Abb. 39: Wachstum der *Nostocoida limicola*-Reinkulturen AHW 16 und AHW 19 aus dem *Chloroflexi*-Phylum in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium bei unterschiedlichen pH-Werten (CSB-Konzentration 2 g O₂/l)

Wachstum in Minimalmedien mit verschiedenen C- und N-Quellen

Ein Wachstum der Reinkulturen in ammonium- bzw. nitrathaltigem MSV-Medium mit Glucose, Acetat, Citrat oder Tween 80 als Kohlenstoffquelle wurde in keinem Fall nachgewiesen.

2.3 *Nostocoida limicola*-Reinkulturen aus der Klasse der *Actinobacteria*

2.3.1 Morphologische Charakterisierung

Aus der kommunalen Kläranlage KA-AN wurden drei Reinkulturen isoliert. Die Reinkulturen wuchsen auf HA-Medium als runde Kolonien mit einem leicht gekräuselten Rand. Sie bildeten gewundene, unverzweigte Filamente ohne Scheide mit einem Durchmesser von 1,0-1,2 µm und konnten mehrere hundert µm lang werden. 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.

2.3.2 Phylogenetische Charakterisierung

Die Analyse der 16S rRNS Sequenz des Isolats AN 31 wurde in Zusammenarbeit mit der Firma Vermicon durchgeführt. Es zeigte sich, dass der isolierte Stamm zur Klasse der *Actinobacteria* gehört. Ein Ähnlichkeitsvergleich der 16S rRNS-Sequenzen zeigte, dass der Organismus sehr nah mit einem von Blackall et al. (2000) isolierten *Nostocoida limicola*-Stamm verwandt ist (98,5% Ähnlichkeit).

Mit Hilfe der Fluoreszenz in situ Hybridisierung konnten die Ergebnisse der phylogenetischen Untersuchung bestätigt werden. Für die von Blackall et al. (2000) isolierten *Nostocoida*-Stämme wurde bereits von Bradford (1997) die spezifische Oligonukleotidsonde NLII65 entwickelt, die nach Hybridisierung mit den drei isolierten Reinkulturen AN 26, AN 29 und

AN 31 deutlich positive Signale lieferte. Auch die Oligonukleotidsonde HGC1156, die Hoch-GC-Bakterien und somit auch *Actinobacteria* detektiert, zeigte eine positive Reaktion mit den isolierten Stämmen. In situ Hybridisierungen mit den Oligonukleotidsonden NLIMI 91, AHW183, Noli-644, MC2-649 und PPx3-1428, die *Nostocoida limicola*-ähnliche Organismen aus anderen taxonomischen Gruppen detektieren, ergaben, wie zu erwarten, keine Signale.

2.3.3 Physiologische Untersuchungen

Wachstum in komplexen Nährmedien

Die Reinkulturen AN 26, AN 29 und AN 31 wuchsen in flüssigem HA-Medium in Form zahlreicher Filament-Flocken, die einen Durchmesser von 1-2 mm besaßen. Im Gegensatz zu den *Nostocoida limicola*-Reinkulturen aus dem *Chloroflexi*-Phylum setzte das Wachstum unmittelbar nach Versuchsbeginn ein und erreichte nach einem steilen Anstieg bereits nach einer Woche die stationäre Phase (Abb. 40). Auch hier wurde aufgrund der Flockenbildung zur Beschreibung des Wachstumsverlaufs eine Bewertung anhand von Kategorien vorgenommen.

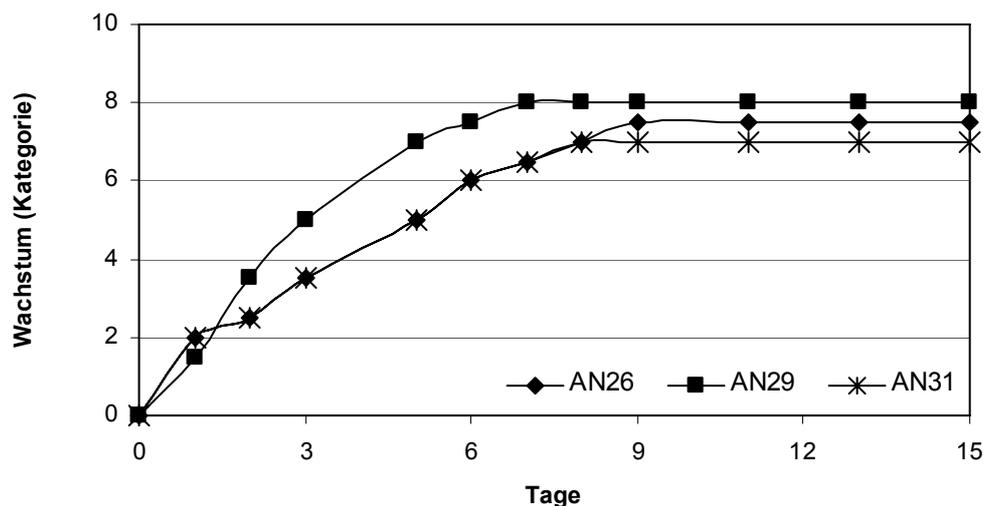


Abb. 40: Wachstumsverlauf der *Nostocoida limicola*-Reinkulturen AN 26, AN 29 und AN 31 aus der Klasse der *Actinobacteria* in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium (CSB-Konzentration 2 g O₂/l; pH 7,0)

Des Weiteren wurde die Wachstumsintensität der Reinkulturen AN 26 und AN 31 in flüssigem HA- und R2A-Medium nach einer Woche über eine Messung der optischen Dichte (siehe Kap. C.2.2.3) verglichen. Dabei zeigte sich, dass das Wachstum in R2A-Medium signifikant höher lag (Abb. 41).

Die Morphologie der Reinkulturen wurde durch die verschiedenen Medien deutlich beeinflusst. In HA-Medium wuchsen die Stämme als lange, verschlungene Filamente mit scheibenförmigen Zellen und einem Durchmesser von ca. 1,2 µm. Sie glichen in ihrer Morphologie den *Nostocoida limicola*-Organismen, die im Belebtschlamm gefunden werden. In R2A-Medium dagegen war die Morphologie der Reinkulturen vollkommen anders. Sie wuchsen in

Form von Zellknäueln, die aus kokkoiden Zellen bestanden, sowie sehr kurzen Filamenten. Die Zellen wiesen hier einen deutlich größeren Durchmesser von 1,5-1,8 μm auf.

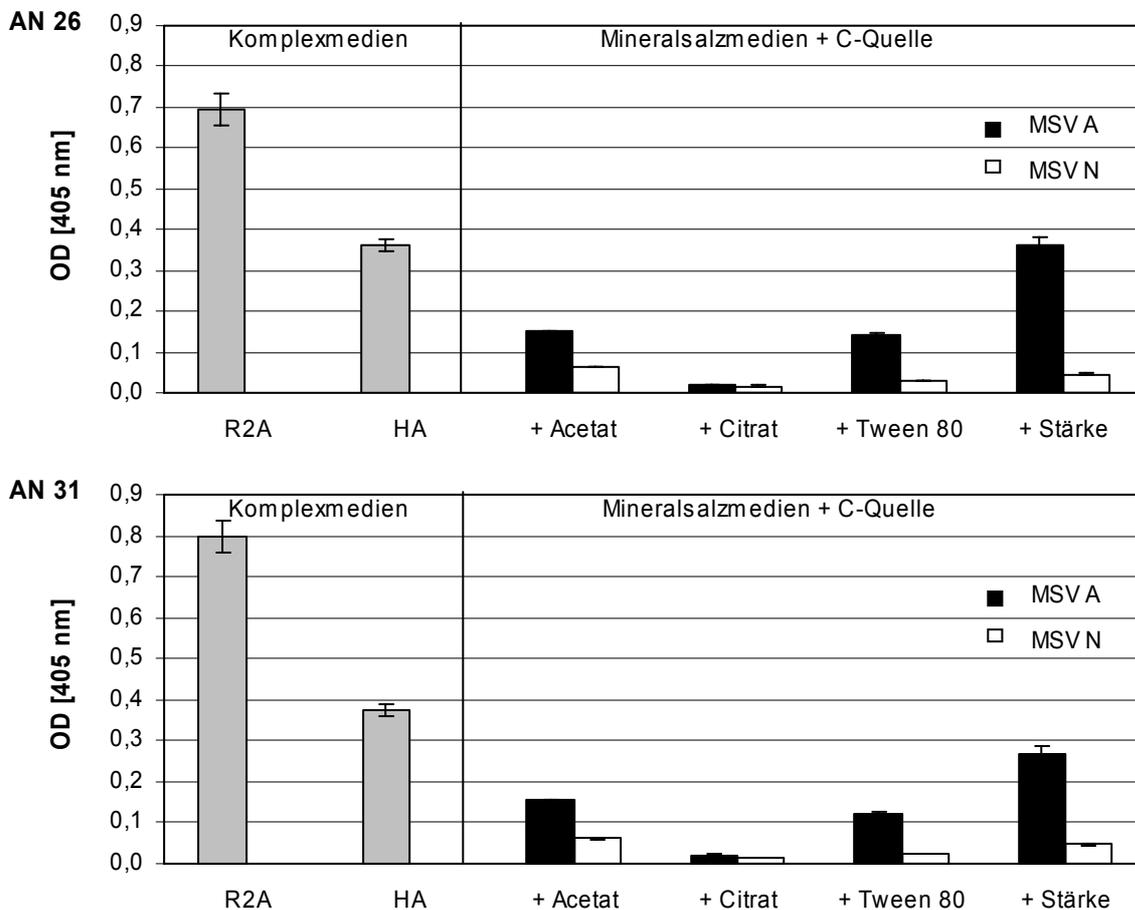


Abb. 41: Wachstum der *Nostocoida limicola*-Reinkulturen AN 26 und AN 31 aus der Klasse der *Actinobacteria* in flüssigem R2A- und Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium sowie in MSV-Medium mit unterschiedlichen C- und N-Quellen (MSV A: Mineralsalz-Vitamin-Medium mit Ammonium; MSV N: Mineralsalz-Vitamin-Medium mit Nitrat)

In HA-Medium zeigten die Reinkulturen AN 26, AN 29 und AN 31 einen deutlichen Anstieg der Wachstumsintensität mit Zunahme der CSB-Konzentration des Mediums (Abb. 42). Bei einer CSB-Konzentration von 3,0 g O_2/l wurde bei allen Reinkulturen ein maximales Wachstum erreicht. Eine noch höhere CSB-Konzentration von 4,0 g O_2/l führte zu keiner weiteren Steigerung der Intensität.

Hinsichtlich des pH-Wertes verhielten sich die drei Reinkulturen unterschiedlich (Abb. 43). Während das Wachstum des Stammes AN 29 in einem pH-Bereich von 6,0 bis 8,0 keine signifikanten Unterschiede aufwies, war dieses bei AN 26 bei einem pH-Wert von 6,0 leicht reduziert. Deutliche Unterschiede wurden für die Reinkultur AN 31 beobachtet, die eindeutig einen pH-Wert von 7,0 bevorzugte. Bei pH 8,0 lag die Wachstumsintensität bereits wesentlich niedriger, bei pH 6,0 wurde nur noch ein minimales Wachstum beobachtet.

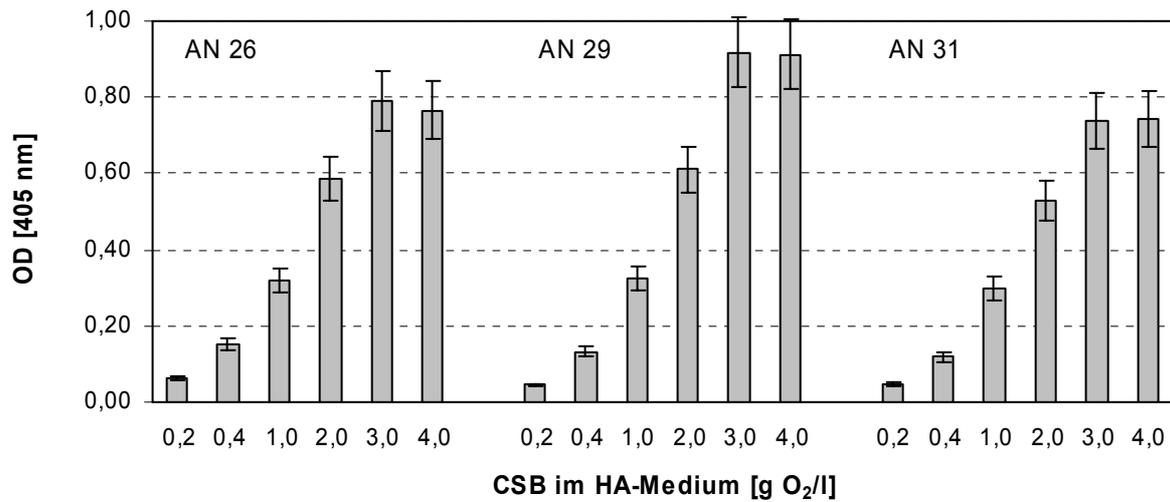


Abb. 42: Wachstum der *Nostocoida limicola*-Reinkulturen AN 26, AN 29 und AN 31 aus der Klasse der *Actinobacteria* in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium bei unterschiedlichen CSB-Konzentrationen (pH 7,2)

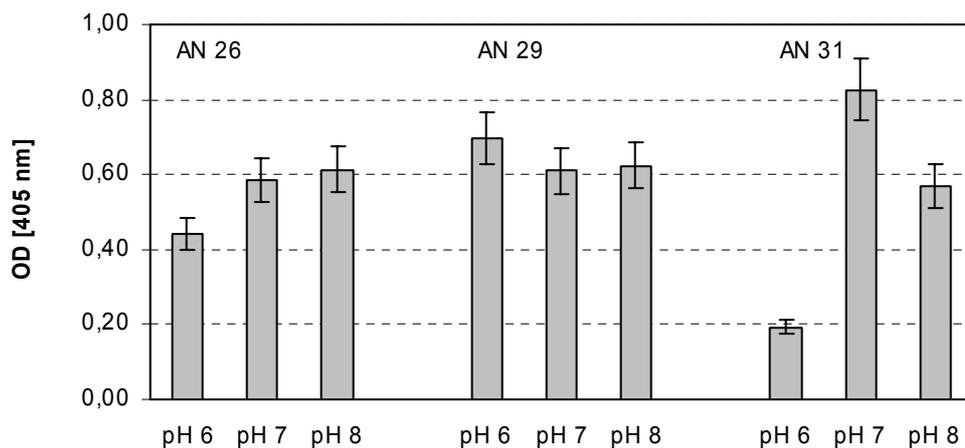


Abb. 43: Wachstum der *Nostocoida limicola*-Reinkulturen AN 26, AN 29 und AN 31 aus der Klasse der *Actinobacteria* in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA)-Medium bei unterschiedlichen pH-Werten (CSB-Konzentration 2 g O₂/l)

Wachstum in Minimalmedien mit verschiedenen C- und N-Quellen

Beim Wachstum der Reinkulturen AN 26 und AN 31 in ammonium- bzw. nitrathaltigem MSV-Medium mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen zeigte sich, dass Citrat von beiden Reinkulturen weder in Gegenwart von Ammonium noch von Nitrat als C-Quelle genutzt werden konnte. Dagegen wurde sowohl mit Acetat als auch mit Tween 80 ein deutliches Wachstum in ammoniumhaltigem MSV-Medium beobachtet (Abb. 41). In nitrathaltigem MSV-Medium war das Wachstum vor allem mit Tween 80 stark reduziert. Das eindeutig beste Wachstum erfolgte jedoch mit Stärke als Kohlenstoff- und Ammonium als Stickstoffquelle. In Gegenwart von Nitrat war der Abbau der Stärke ebenfalls deutlich reduziert.

Tabelle 9: Anzahl der Reinkulturen, die die jeweilige C-Quelle nutzen konnten (in Klammern die Anzahl mit mäßigem Wachstum)

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

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, sodass die Fadenstruktur nicht eindeutig zu erkennen war.

Das Wachstum der *Nostocoida limicola*-Reinkulturen aus der Klasse der *Actinobacteria* wurde darüber hinaus in Biolog-GN-Mikrotiterplatten untersucht, in denen der Abbau von 95 verschiedenen Kohlenstoffquellen getestet werden kann (Tab. 9). Im Gegensatz zu den *Microthrix parvicella*- und *Nostocoida limicola*-Reinkulturen aus dem *Chloroflexi*-Phylum lieferten die Isolate AN 26, AN 29 und AN 31 genügend Zellmaterial für diese Untersuchung.

Es zeigte sich, dass die Reinkulturen vor allem Polysaccharide (α -Cyclodextrin, Dextrin, Glycogen) hervorragend als Kohlenstoffquelle verwerten konnten. So wurde bereits in den zuvor beschriebenen Versuchen festgestellt, dass die Isolate AN 26 und AN 31 das Polysaccharid Stärke ausgezeichnet zum Wachstum nutzen konnten. Ebenfalls sehr gut abgebaut wurden die einfachen Kohlenhydrate Glucose, Fructose, Maltose, Raffinose und Saccharose sowie die Carboxylsäuren Gluconsäure und Propionsäure.

Ein, wenn auch schwächeres, Wachstum war mit den Carboxylsäuren Ameisensäure, γ -Hydroxybuttersäure, α -Ketobuttersäure und α -Ketovaleriansäure sowie den Esterverbindungen Monomethylsuccinat 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.

D Diskussion

1 Vergleich der Biozöosen ausgewählter Kläranlagen mit Schaumproblemen mittels klassischer Mikroskopie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Die Zusammensetzung der Belebtschlamm- und Schaumbiozöosen fadenbildender Mikroorganismen wurde in den beiden Belebungsbecken der zweistufigen kommunalen Kläranlage KA-M sowie den beiden einstufigen kommunalen Anlagen KA-GR und KA-BT mittels klassischer Mikroskopie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) untersucht und verglichen. Da zahlreiche fadenbildende Morphotypen, wie z.B. nocardioforme Actinomyceten, *Nostocoida limicola* oder Typ 0041/0675, verschiedenen taxonomischen Gruppen angehören, ist die klassische Mikroskopie zur Abklärung der taxonomischen Zugehörigkeit dieser Organismen nicht ausreichend. Nachdem zu erwarten ist, dass Organismen unterschiedlicher phylogenetischer Herkunft auch in ihren physiologischen Eigenschaften differieren, ist zunächst eine genaue Klassifizierung erforderlich, bevor physiologische Daten bewertet werden.

Microthrix parvicella wurde anhand der Analyse der 16S rRNS taxonomisch in die Klasse der *Actinobacteria* eingereiht (Blackall et al. 1994). Da die Verzweigung im Stammbaum jedoch tief liegt, ist der Organismus nur weitläufig mit den nocardioformen Actinomyceten verwandt. Die phylogenetische Position von *M. parvicella* wurde von Rossetti et al. (1997) bestätigt, deren Isolate eine identische 16S rRNS-Sequenz im Vergleich zu den von Blackall et al. (1994) isolierten Stämmen aufwiesen. Mit Hilfe der von Erhart et al. (1997) entwickelten Oligonukleotidsonden wurde *M. parvicella* in verschiedenen Kläranlagen in Deutschland, Frankreich und Australien detektiert. Daher handelt es sich bei diesem Organismus sehr wahrscheinlich um eine phylogenetische Einheit (Erhart et al. 1997; Lemmer et al. 2005). Die Dominanz von *M. parvicella* im Belebtschlamm und im Schaum der kommunalen Anlage KA-GR wurde sowohl mittels klassischer Mikroskopie als auch durch Anwendung dieser Sonden nachgewiesen. Die Beurteilung der Häufigkeit lieferte in dieser Anlage mit beiden Methoden ähnliche Ergebnisse und weist somit eine gute Übereinstimmung auf. In den *M. parvicella*-dominierten Schäumen der Anlage KA-BT wurde die Häufigkeit mit FISH oft etwas höher bewertet. Dennoch kann festgestellt werden, dass *M. parvicella* sowohl mit klassischer Mikroskopie als auch mit FISH zuverlässig nachgewiesen werden kann, sodass für eine Identifizierung dieses Organismus die Anwendung spezifischer Sonden nicht unbedingt erforderlich ist.

Nocardioforme Actinomyceten in Kläranlagen weisen dagegen eine hohe Diversität auf und sind vielen verschiedenen Gattungen bzw. Species, wie *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella* und *Skermania piniformis*, zuzuordnen (Schuppler et al. 1995; Goodfellow et al. 1996; Goodfellow et al. 1998; Soddell et al. 1998; Stainsby et al. 2002; Wagner und Cloete 2002; Nam et al. 2003). Die Entwicklung spezifischer Oligonukleotidsonden für die Gattungen *Gordonia* (de los Reyes et al. 1997; Schuppler et al. 1998) und *Dietzia* (Müller 2006), verschiedene *Rhodococcus* spp. (Müller 2006) sowie *Skermania piniformis* (Bradford 1997) ermöglicht mittlerweile eine weitergehende Identifizierung. Mittels klassischer Mikroskopie wurden nocardioforme Actinomyceten als dominierende Organismen in den Schaumfraktionen beider Belebungsbecken der Anlage KA-M und zeitweise auch im Schaum von KA-BT detektiert. Die weitergehende Charakterisierung mit Hilfe der spezifischen Sonden ergab, dass sich die Populationen nocardioformer Actinomyceten sowohl in den

einzelnen Kläranlagen bzw. Belebungsbecken als auch innerhalb einer Kläranlage im Verlauf der Zeit voneinander unterschieden. So wurden im Schaum des ersten Belebungsbeckens der KA-M zunächst nur DIE993-positive *Dietzia* spp. detektiert, später war dort auch *Rhodococcus* sp. Cluster B (Sonde RHOOb183) angereichert. Dagegen wurden im Schaum des zweiten Belebungsbeckens der KA-M *Dietzia* spp. nur in geringer Häufigkeit gefunden. Dort dominierten *Rhodococcus* spp. Cluster A (Sonde RHOa429) und *Rhodococcus* sp. Cluster B. Organismen dieser Gruppe wurden wiederum nicht im Schaum der Anlage KA-BT detektiert. Neben *Dietzia* spp. war dort zunächst vor allem *Rhodococcus erythropolis* (Sonde R.ery619) angereichert. Nach dem Umbau der Anlage KA-BT wurden zahlreiche Myc657-positive Actinomyceten detektiert, die jedoch nicht genauer charakterisiert werden konnten. Die unterschiedliche Populationsstruktur Actinomyceten-dominierten Schäume weist darauf hin, dass klassische Mikroskopie allein zur Identifizierung nocardioformer Actinomyceten nicht ausreicht und unterstreicht die Bedeutung des Einsatzes spezifischer Sonden zur genaueren Charakterisierung, da dies für eine gezielte Bekämpfung von großer Wichtigkeit ist.

Neben den dominierenden Organismen *M. parvicella* und nocardioformen Actinomyceten wurden in den drei Anlagen mit klassischer Mikroskopie weitere fadenbildende Organismen identifiziert, die in untergeordneter Häufigkeit vorkamen, wie *Nostocoida limicola*, Typ 0041/0675, Typ 1851, Typ 0092 und *Haliscomenobacter hydrossis*.

Hinter dem **Morphotyp *Nostocoida limicola*** verbirgt sich ebenfalls eine Vielzahl von Organismen aus den unterschiedlichsten phylogenetischen Gruppen, wie dem *Firmicutes*-Phylum (Liu und Seviour 2001), der Klasse der *Actinobacteria* (Bradford 1997; Liu und Seviour 2001), dem *Chloroflexi*-Phylum (Schade et al. 2002) und den *Alphaproteobacteria* (Snaidr et al. 2002; Levantesi et al. 2004), die inzwischen durch Anwendung spezifischer Oligonukleotidsonden charakterisiert werden können. Jedoch zeigten Untersuchungen von Müller (2006), dass die phylogenetische Zuordnung von *N. limicola* noch nicht abgeschlossen ist, da in einigen der dort untersuchten Belebtschlämme und Schäume mit klassischer Mikroskopie detektierte *N. limicola*-Organismen mit keiner der vorhandenen Sonden positive Signale lieferten. In der vorliegenden Studie wurden mit FISH sowohl im ersten Belebungsbecken der zweistufigen Anlage KA-M als auch in den einstufigen Anlagen KA-GR und KA-BT regelmäßig *N. limicola*-Organismen aus dem *Firmicutes*-Phylum (Sonde NLIMI 91) sowie dem *Chloroflexi*-Phylum (Sonde AHW183) detektiert, gelegentlich auch solche aus der Klasse der *Actinobacteria* (Sonde NLIMII 175). *N. limicola*-Organismen aus der Klasse der *Alphaproteobacteria* wurden dagegen in diesen drei Anlagen nicht gefunden. Diese Organismen treten allerdings vor allem in industriellen Kläranlagen mit Schaumproblemen auf (Snaidr et al. 2002; Levantesi et al. 2004), wo sowohl hinsichtlich der Abwasserzusammensetzung als auch der Betriebsführung andere Bedingungen vorliegen als in kommunalen Anlagen. Insgesamt zeigte sich, dass der Morphotyp *Nostocoida limicola* in den Anlagen KA-M, KA-GR und KA-BT mit klassischer Mikroskopie immer unterschätzt wurde.

Das gilt auch für *Haliscomenobacter hydrossis*, dessen Häufigkeit in den Belebtschlämmen der KA-GR und KA-BT sowie der ersten Stufe der KA-M mit FISH (Sonde HHY) fast immer wesentlich höher beurteilt wurde. Innerhalb der Belebtschlammflocken können diese sehr dünnen fadenbildenden Organismen mit einem Durchmesser von nur 0,3-0,4 µm mit klassischer Mikroskopie leicht übersehen und somit in ihrer Häufigkeit unterschätzt werden. Daher ist für *H. hydrossis* die Anwendung von FISH empfehlenswert.

Typ 1851 wurde im Belebtschlamm der KA-GR sowohl mit klassischer Mikroskopie als auch mit FISH zuverlässig identifiziert. In der Schaumfraktion der KA-GR wurde dieser fadenbildende Organismus mit klassischer Mikroskopie jedoch häufig übersehen bzw. in seiner Häufigkeit unterschätzt, was vermutlich mit der hohen Dichte an *M. parvicella* dort zusammenhängt. Infolgedessen ist auch für diesen Organismus der Einsatz der FISH-Technik sinnvoll.

Der **Morphotyp 0041/0675** weist ebenfalls eine phylogenetische Diversität auf, jedoch kann derzeit nur ein Teil dieser Organismen mit FISH identifiziert werden (Schade und Lemmer 2002; Thomsen et al. 2002). Hugenholz et al. (2001) detektierten mit den Oligonukleotidsonden TM7905 und TM7305 fadenbildende Organismen in einem Belebtschlamm, die morphologisch Typ 0041/0675 entsprachen. TM7 ist eine Division der *Bacteria*-Domäne und umfasst unkultivierte Bakterien, deren Sequenzen mittels kultivierungsunabhängiger PCR-Klonstudien ermittelt wurden. Diese Klone sind in der Umwelt weit verbreitet und wurden in den unterschiedlichsten Habitaten entdeckt, z.B. im Boden, Grundwasser, Süßwasser, Meerwasser und in der menschlichen Mundhöhle (Hugenholz et al. 2001). In der vorliegenden Untersuchung wurden in den Anlagen KA-M, KA-GR und KA-BT fadenbildende Organismen vom Typ 0041/0675 sowohl im Belebtschlamm als auch im Schaum mittels klassischer Mikroskopie nachgewiesen. Eine Anreicherung im Schaum wurde nicht festgestellt. Die Anwendung der Oligonukleotidsonde TM7905 lieferte teilweise niedrigere, z.T. aber auch höhere Häufigkeiten. Die mit FISH ermittelten höheren Häufigkeiten überraschen, da in einer Studie von Thomsen et al. (2002) nur ca. 15% der Typ 0041 Organismen mit TM7-gruppenspezifischen Sonden hybridisierten. Dies kann verschiedene Gründe haben. Die Oligonukleotidsonde TM7905 ist keine spezifische Sonde, die im Belebtschlamm ausschließlich Typ 0041/0675 Organismen detektiert, sondern auch verschiedene andere Morphotypen, wie Stäbchen, Kokken und fadenbildende Organismen, die nicht dem Morphotyp 0041/0675 angehören (Hugenholz et al. 2001). Daher könnte die Häufigkeit TM7905-positiver 0041/0675-Filamente mit FISH überschätzt werden. Es ist aber auch durchaus möglich, dass Typ 0041/0675 mit klassischer Mikroskopie unterschätzt wurde. So lange noch keine Oligonukleotidsonden vorliegen, die spezifisch Typ 0041/0675 detektieren, ist deshalb eine verlässliche Charakterisierung dieses Morphotyps mittels FISH nicht möglich. Somit eignet sich diese Methode im Moment noch nicht für einen routinemäßigen Einsatz.

Dies gilt ebenso für den **Morphotyp 0092**, der aufgrund des Fehlens geeigneter Oligonukleotidsonden in den drei Anlagen nur mittels klassischer Mikroskopie nachgewiesen werden konnte. Hybridisierungen mit den Sonden 0092-997 sowie CF319a waren nicht erfolgreich. Daher ist eine taxonomische Zuordnung dieses Organismus derzeit noch nicht möglich.

2 Enzymaktivitäten in ausgewählten Kläranlagen mit Schaumproblemen

2.1 Gesamtenzymaktivitäten von Protease, Lipase und β -Glucuronidase

Der Anteil von Proteinen und Lipiden am organischen Material des Abwassers ist groß und liegt im Bereich von 60 bis 70% (Raunkjaer et al. 1994). Daher sind insbesondere Erkenntnisse über die Aktivitäten von Proteasen und Lipasen, die den Abbau dieser Verbindungen katalysieren, für ein besseres Verständnis der im Abwasserreinigungsprozess ablaufenden Vorgänge von großer Bedeutung. Die in dieser Untersuchung erhaltenen Ergebnisse sollen darüber hinaus weitere Einblicke in die Abbau-Aktivität von Biozönosen in Kläranlagen mit

Schaumproblemen liefern, um die komplexen Vorgänge und Ursachen, die zu Schaumbildung führen, näher zu beleuchten.

Protease-Aktivität

Proteine sind die häufigsten organischen Moleküle in Zellen und hinsichtlich ihrer biologischen Funktionen von fundamentaler Bedeutung. In Abwasser beträgt der Anteil der Proteine etwa ein Drittel des chemischen Sauerstoffbedarfs (CSB; Raunkjaer et al. 1994). Dementsprechend spielt der Proteinstoffwechsel auch eine wesentliche Rolle beim Umsatz organischer Materie in Abwasser. Der Abbau von polymeren und oligomeren Proteinen ist daher ein zentraler Bestandteil des mikrobiellen Stoffwechsels, insbesondere bei der Verwertung abgestorbener Biomasse.

Die Bestimmung der Protease-Aktivität lieferte in den Belebtschlämmen der KA-GR sowie den beiden Stufen der KA-M ähnliche Substratumsatzraten im Bereich von 10-20 mg Trp/(g oTR · h). Die höchsten Aktivitäten wurden im Belebtschlamm der KA-BT gemessen mit Werten, die in der Regel zwischen 30 und 40 mg Trp/(g oTR · h) lagen. Eine Abhängigkeit vom jahreszeitlichen Verlauf wurde nicht festgestellt. Des Weiteren wurden auch keine auffälligen Unterschiede zwischen *M. parvicella*- und nocardioformen Actinomyceten-dominierten Anlagen beobachtet. Es zeigte sich, dass die Protease-Aktivitäten in den Schaumfraktionen meist deutlich niedriger lagen als in den Belebtschlämmen. Vermutlich ist die Diffusion des Substrats im Schaum aufgrund der wesentlich höheren Biomasse erschwert. Verschiedene Autoren berichten, dass die Diffusion hochmolekularer Substanzen durch Bakterien-Aggregate und deren extrazelluläre Matrices behindert ist (Tanaka et al. 1984; Lawrence et al. 1994). Lawrence et al. (1994) zeigten dies durch in situ Monitoring mittels Fluoreszenzmarkierter Substrate und konfokaler Laser Scanning Mikroskopie in einem Biofilm. Die Diffusions-Koeffizienten der untersuchten Substrate mit unterschiedlichen Molekulargewichten lagen im Biofilm immer niedriger als in der wässrigen Phase. Jedoch folgerten Cadoret et al. (2002) aus den Ergebnissen ihrer Protease-Aktivitätsmessungen, dass die Proteinhydrolyse nicht durch Diffusion hochmolekularer Substanzen in der EPS (extrazelluläre polymere Substanzen)-Matrix reduziert ist. Allerdings verwendeten die Autoren im Gegensatz zu der vorliegenden Untersuchung nicht Casein, sondern Azocasein als Substrat für den Enzymtest. Möglicherweise bewirkt die Ladungsverteilung von Azofarbstoffen eine bessere Diffusion dieses Substrats durch die EPS-Matrix.

Die in der vorliegenden Arbeit ermittelten Protease-Aktivitäten wurden mit den entsprechenden Proteingehalten der EPS verglichen, die im Bereich von 27-110 mg/g oTR lagen (Müller et al. 2005). Es ergab sich kein direkter Zusammenhang zwischen beiden Parametern. Jedoch zeigten die gemessenen Enzymaktivitäten, dass in allen untersuchten Anlagen ein hohes Potential zum Proteinabbau vorhanden war. Richards et al. (1984) beobachteten in ihren Untersuchungen eine positive Korrelation zwischen Protease-Aktivität und CSB-Abbaurrate sowie Respirationsrate. Sie schlugen daher vor, die Messung der Aktivität der Protease, neben der anderer Enzyme, als Maß für die Gesamtaktivität von Belebtschlämmen einzusetzen. Goel et al. (1998) untersuchten verschiedene Enzymaktivitäten in einem SBR-Reaktor, wobei sich die Protease als relativ stabil im Belebtschlamm-System erwies. Die Untersuchungen zeigten die vorwiegende Lokalisation der Protease-Aktivität in den Flocken. Auch Guellil et al. (2001)

stellten fest, dass die Protein-Hydrolyse hauptsächlich auf der enzymatischen Aktivität der EPS beruht.

Frølund et al. (1996) fanden einen hohen Anteil extrazellulärer Proteine in Belebtschlämmen, wobei Schlämme mit einem hohen Schlammalter mehr Proteine enthielten als solche mit niedrigem Schlammalter. Die Hydrolyse dieser Proteine könnte als Stickstoffquelle für *M. parvicella* dienen, der für effizientes Wachstum auf reduzierte Stickstoffverbindungen wie NH_4^+ angewiesen ist (Slijkhuis 1983b).

Lipase-Aktivität

Lipide machen etwa 30 bis 40% des organischen Materials im Abwasser aus (Raunkjaer et al. 1994) und spielen eine wichtige Rolle bei der Bildung von Schäumen in Kläranlagen. Untersuchungen von Quéméneur und Marty (1994) zeigten, dass Fettsäuren im Abwasser hauptsächlich partikulär gebunden und nur zu einem geringen Teil in gelöster Form vorliegen. Das Fettsäure-Profil ist in beiden Fraktionen ähnlich, wobei Ölsäure, Palmitinsäure, Stearinsäure und Linolsäure mit 21-29%, 19-27%, 10-20% bzw. 9-19% die häufigsten Fettsäuren darstellen. Zusammengenommen beträgt deren Anteil an der partikulären Lipid-Fraktion 75 bis 85%. Dueholm et al. (2001) wiesen durch Messung von Sauerstoffaufnahmeraten nach, dass der Abbau langkettiger Fettsäuren (LKFS) im Belebtschlamm rasch erfolgte. Die Adsorption von LKFS an die Flocken macht es allerdings schwierig, diese Methode zur detaillierten Charakterisierung des Lipid-Abbaus zu nutzen. Des Weiteren ist die Hydrolyse von Triacylglyceriden zu LKFS sehr langsam, weshalb die Messung von Sauerstoffaufnahmeraten ebenfalls nicht zu deren Beschreibung geeignet ist. Die Autoren schlagen daher ein Modell zur besseren Charakterisierung der Abläufe beim Lipid-Abbau vor, das die Adsorption/Desorption von Triacylglyceriden und LKFS an Belebtschlammflocken, die Hydrolyse der Triacylglyceride durch Lipasen sowie die Aufnahme von LKFS durch Bakterien unter verschiedenen Bedingungen beinhaltet.

Da Ölsäure, Palmitinsäure und Stearinsäure zu den häufigsten Fettsäuren im Abwasser gehören (Quéméneur und Marty 1994), wurden die Lipase-Aktivitäten in den ausgewählten Kläranlagen zunächst unter Anwendung verschiedener Methylumbelliferyl (MUF)-Substrate untersucht. Mit MUF-Oleat wurden dabei um ein Vielfaches höhere Substratumsatzraten ermittelt als mit MUF-Palmitat und -Stearat. Für die weiteren Untersuchungen wurde daher das Substrat MUF-Oleat verwendet. Auch Dueholm et al. (2005) erzielten mit MUF-Stearat mit ca. 2% nur einen Bruchteil der Aktivität von MUF-Oleat. Dies kann mit einer Substratpräferenz der Belebtschlammorganismen für Ölsäure-Ester zusammenhängen, aber auch mit den unterschiedlichen physiko-chemischen Eigenschaften dieser Fettsäuren. Palmitin- und Stearinsäure sind gesättigte Fettsäuren mit 16 bzw. 18 C-Atomen. Es liegen keine Doppelbindungen vor. Ölsäure, eine ungesättigte Fettsäure, besitzt 18 C-Atome und eine Doppelbindung zwischen dem 9. und 10. Kohlenstoffatom. Die physiko-chemischen Eigenschaften der Fettsäuren werden im Wesentlichen durch die Anzahl der C-Atome, v.a. aber durch die Doppelbindungen beeinflusst. Je länger und je gesättigter die Kohlenwasserstoffkette ist, desto schlechter löst sich die Fettsäure in Wasser. Von besonderer Bedeutung ist der Schmelzpunkt der Fettsäuren, der mit wachsender Zahl der Doppelbindungen sinkt. Daher liegt der Schmelzpunkt von Ölsäure (18:1) mit 13,4°C deutlich niedriger als der von Palmitinsäure (16:0; 63,1°C) und Stearinsäure (18:0; 69,6°C). Aufgrund des niedrigeren Schmelzpunkts der

Ölsäure und deren besserer Löslichkeit in Wasser ist das Substrat MUF-Oleat für die Organismen daher besser verfügbar als MUF-Palmitat und -Stearat. Da in Abhängigkeit des verwendeten Substrats große Aktivitätsunterschiede festgestellt wurden, können Lipase-Aktivitäten folglich nicht miteinander verglichen werden, wenn unterschiedliche MUF-Substrate verwendet wurden.

Die Lipase-Aktivitäten lagen im Belebtschlamm der ersten Stufe (BB1) der KA-M über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant höher als im Belebtschlamm der zweiten Stufe (BB2). Im Actinomyceten-dominierten Schaum des BB2 war die Lipase-Aktivität im Vergleich zur Schlammfraktion deutlich erhöht. Die höchsten Lipase-Aktivitäten wurden Mitte September 2003 gemessen, als es nach mehrmonatiger Pause wieder zu einer Schaumbildung auf diesem Belebungsbecken kam. Möglicherweise sind die Organismen in einer „frischen“ Schaumdecke aktiver als in einem Schaum, der bereits längere Zeit auf dem Belebungsbecken gelegen hat. Dafür würde auch die Abnahme der Lipase-Aktivität von September bis Ende November 2003 sprechen. In diesem Zeitraum wurden nur geringe Konzentrationen an lipophilen Stoffen gemessen, die viel niedriger als im Zeitraum April 2002 bis Februar 2003 lagen (Müller 2006). Da bekannt ist, dass Actinomyceten Fette verwerten (Lemmer 1985), werden vermutlich die in der Schaumfraktion vorhandenen lipophilen Stoffe rasch durch die dort dominierenden nocardioformen Actinomyceten verstoffwechselt. Mit Hilfe von in situ Untersuchungen, die eine direkte Zuordnung von Enzymaktivitäten zu Organismen ermöglichen, konnte dies untermauert werden (siehe Kap. D.3).

Im Gegensatz zur zweiten Stufe der KA-M wurden in der von *M. parvicella* dominierten einstufigen KA-GR in der Schaumfraktion im Vergleich zum Belebtschlamm nur gleich hohe oder signifikant niedrigere Lipase-Aktivitäten gemessen. Da *M. parvicella* als Substrat langkettige Fettsäuren und ihre Ester verwertet (Slijkhuis 1983b; Andreasen und Nielsen 1998), lag die Vermutung nahe, dass die Lipase-Aktivitäten in dieser Anlage auf dem häufigen Vorkommen von *M. parvicella* beruhen. Obwohl die Häufigkeit von *M. parvicella* im Schaum mit einem Fädigkeitsindex von 4 bis 5 immer höher lag als im Belebtschlamm, waren die Lipase-Aktivitäten dort nicht erhöht. Dies gibt einen Hinweis darauf, dass *M. parvicella* im Schaum weniger aktiv ist als in der Schlammfraktion. Dies wurde durch in situ Untersuchungen bestätigt (siehe Kap. D.3). Von Januar bis Mai 2003 wurde eine Abnahme des Gehalts an lipophilen Stoffen im Belebtschlamm der KA-GR beobachtet (Müller 2006). Dies deutet auf einen verstärkten Abbau dieser Substanzen im Belebtschlamm hin, der sich auch an der deutlichen Zunahme der Lipase-Aktivität zeigte. Im Frühjahr des Untersuchungsjahrs 2004 wurde ebenfalls ein Aktivitätsanstieg beobachtet. Der Schmelzpunkt von Ölsäure, der bei 13,4°C liegt, kann bei niedrigen Temperaturen im Winter im Belebungsbecken unterschritten werden. Mit dem Temperaturanstieg im Frühjahr ist vermutlich eine verbesserte Verfügbarkeit Ölsäurehaltigen Substrats und damit ein verstärkter Abbau verbunden.

In der einstufigen KA-BT war der Schaum im Mai 2003 zunächst von nocardioformen Actinomyceten dominiert. Im Juli 2003 kam es zu einem starken Anstieg der *M. parvicella*-Population sowohl im Belebtschlamm als auch im Schaum, verbunden mit sehr hohen Lipase-Aktivitäten, die weit über denen vom Mai 2003 lagen. Lipophile Stoffe konnten zu diesem Zeitpunkt im Belebtschlamm nicht nachgewiesen werden (Müller 2006), was auf einen vollständigen Abbau dieser Substanzen im Belebtschlamm hindeutet, der sich in der hohen Lipase-Aktivität widerspiegelt. Mit der Abnahme der *M. parvicella*-Häufigkeit und einer erneuten

Dominanz von nocardioformen Actinomyceten im Schaum wurde im November 2003 auch ein Rückgang der Lipase-Aktivität beobachtet. Im weiteren Verlauf wurde zwar mit Zunahme der Häufigkeit der nocardioformen Actinomyceten im Schaum zwischen November 2003 und Mai 2004 auch ein Anstieg der Lipase-Aktivität festgestellt, dennoch lagen die Substratumsatzraten weit unterhalb der Werte, die im Juli 2003 bei *M. parvicella*-Dominanz ermittelt wurden. Dies legt die Vermutung nahe, dass in dieser Anlage nocardioforme Actinomyceten zwar am Abbau von Lipiden beteiligt sind, jedoch eine deutlich niedrigere Aktivität beim Abbau von Ölsäure-Estern aufweisen als *M. parvicella*. Nach Inbetriebnahme der umgebauten Anlage Mitte 2004 mit Einführung biologischer Phosphor-Elimination war erneut *M. parvicella* der dominierende fadenbildende Organismus im Belebtschlamm und im Schaum. Es kam wieder zu einem Anstieg der Lipase-Aktivität im Belebtschlamm. Versuche mit mikroautoradiografischen Methoden ergaben in situ eine Aufnahme langkettiger Fettsäuren, wie Ölsäure und Palmitinsäure, durch *M. parvicella* nicht nur unter aeroben Bedingungen, sondern auch im anaeroben und anoxischen Milieu (Andreasen und Nielsen 1998). Durch Einführung anaerober Zonen zur biologischen Phosphor-Elimination hat *M. parvicella* somit einen zusätzlichen Konkurrenzvorteil gegenüber anderen Belebtschlamm-Bakterien und konnte sich so im Belebtschlamm der KA-BT erneut durchsetzen.

Die in dieser Untersuchung bestimmten Lipase-Aktivitäten lagen in der gleichen Größenordnung wie die von Nielsen et al. (2005) in dänischen Kläranlagen ermittelten. Dort wurden Aktivitäten im Bereich von 30-530 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g TR} \cdot \text{h})$ gemessen. Die Autoren konnten jedoch keine Unterschiede zwischen Anlagen mit und solchen ohne *M. parvicella* feststellen. Frølund et al. (1995) berichten über Lipase-Aktivitäten von ca. 2,7 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g TR} \cdot \text{h})$ im Belebtschlamm der Kläranlage Aalborg. Die Aktivität lag hier niedriger, da in dieser Studie nicht das Substrat MUF-Oleat, sondern MUF-Stearat eingesetzt wurde. Daher kann dieser Wert nicht mit den hier beschriebenen Aktivitäten verglichen werden. Allerdings zeigt ein Vergleich mit der Lipase-Aktivität des Belebtschlammes von KA-GR mit 12 $\mu\text{mol MUFon}/(\text{g TR} \cdot \text{h})$ für MUF-Stearat, dass die Aktivität dort zwar etwas höher, aber dennoch in einer ähnlichen Größenordnung liegt.

Die deutlichen Lipase-Aktivitäten weisen auf einen beträchtlichen Eintrag an lipophilen Stoffen in die untersuchten Anlagen hin. So vermuteten auch Nybroe et al. (1992), dass die Zusammensetzung des Zulaufs das Profil und die Häufigkeit der vorhandenen Enzyme bestimmt. Sie stellten in einer Kläranlage, die Abwasser einer Obst-verarbeitenden Fabrik erhielt, sowie in den Belebtschlämmen zweier Denitrifikationsbecken, denen hydrolysierte Stärke als Kohlenstoffquelle zugegeben wurde, sehr hohe α -Glucosidase-Aktivitäten fest. Ebenso fanden Richards et al. (1984) hohe α -Glucosidase-Aktivitäten in einer Anlage, in die Abwasser einer Nahrungsmittel-verarbeitenden Industrie mit hohem Stärkeanteil eingeleitet wurde.

β -Glucuronidase-Aktivität

β -Glucuronidasen spielen vermutlich bei der Dekonjugation von Glucuronid-Verbindungen im Abwasserreinigungsprozess eine Rolle. So werden beispielsweise natürliche sowie synthetische Östrogene, aber auch einige Medikamente größtenteils in Form weitgehend inaktiver Konjugate über die Niere im Urin ausgeschieden und gelangen über das Kanalsystem in die Kläranlage (Ternes 1998; Ternes et al. 1999a; Belfroid et al. 1999).

β -Glucuronidase-Aktivitäten wurden in allen untersuchten Belebtschlämmen und Schäumen gemessen. Auffallend waren die um ein Vielfaches höheren Aktivitäten des Belebtschlammes der ersten Stufe der KA-M im Vergleich zur zweiten Stufe. Vermutlich wird im ersten Belebungsbecken ein Großteil der mit dem Abwasser in die Anlage gelangten Glucuronid-Konjugate an den Belebtschlammflocken gespalten, sodass nur noch geringe Mengen in die zweite Stufe gelangen. Die Spaltung der Glucuronide findet daher hauptsächlich im hochbelasteten BB1 statt. Entsprechend ist auch in diesem Becken die β -Glucuronidase-Aktivität wesentlich höher.

Ternes et al. (1999b) führten ebenfalls Untersuchungen zur Bestimmung der β -Glucuronidase-Aktivität in einem kommunalen Belebtschlamm durch. Wie in der vorliegenden Studie wurde auch dort gezeigt, dass die Konzentration an freigesetztem MUFon linear mit der Zeit zunahm und keine lag-Phase vorlag. Die Substratumsatzrate betrug ca. $3,5 \mu\text{mol MUFon}/(\text{g TS} \cdot \text{h})$ und war damit relativ niedrig im Vergleich zu den meisten in der vorliegenden Untersuchung ermittelten Werten. Sie lag in dem Bereich des Belebtschlammes der zweiten Stufe der KA-M ($2,5\text{-}4,5 \mu\text{mol MUFon}/(\text{g TR} \cdot \text{h})$), dessen β -Glucuronidase-Aktivität deutlich geringer als die der übrigen Belebtschlämme war. Allerdings ist zu beachten, dass ein direkter Vergleich der Aktivitäten schwierig ist, da in der Untersuchung von Ternes et al. (1999b) andere Bedingungen vorlagen, wie beispielsweise die im Versuch eingesetzte Belebtschlamm-Menge oder die Konzentration der Substratlösung im Testansatz. Die Autoren schließen aus ihren Ergebnissen, dass die gemessenen Aktivitäten die Spaltung von Östrogen-Glucuronid-Konjugaten sowie Glucuronid-Konjugaten anderer organischer Verbindungen im Belebtschlamm durch Mikroorganismen bestätigen.

Insgesamt betrachtet weisen die gemessenen β -Glucuronidase-Aktivitäten darauf hin, dass Glucuronid-Konjugate einen Substrat-Pool für Belebtschlammorganismen darstellen können. Das bedeutet, dass inaktive Konjugate von Östrogen und anderen organischen Verbindungen durch mikrobielle Aktivität in der Kläranlage wieder in ihre aktive Form zurückgeführt werden können. Unterschiede in *M. parvicella*- bzw. Actinomyceten-dominierten Anlagen konnten nicht festgestellt werden.

2.2 In situ Enzymaktivitäten von Phosphatase, Esterase, Lipase und β -Glucuronidase

Mit Hilfe der in situ Enzymaktivitäts-Bestimmungen, mit denen Aktivitäten direkt in der Probe lokalisiert werden können, wurde nachgewiesen, dass die in der Wasserphase des Belebtschlammes gelöste Menge an extrazellulären Enzymen gering ist und die Aktivität hauptsächlich in den Belebtschlammflocken konzentriert ist. Dies korreliert mit früheren Untersuchungen, die beschreiben, dass ein Großteil der extrazellulären Enzyme durch Adsorption in der EPS-Matrix immobilisiert ist (Frølund et al. 1995; Goel et al. 1998; Confer und Logan 1998; Guellil et al. 2001; Boczar et al. 2001). Die EPS der Belebtschlammflocken setzt sich größtenteils aus Proteinen, Kohlenhydraten, Uronsäuren, Huminstoffen, Lipiden und Fettsäuren zusammen (Goodwin und Forster 1985; Urbain et al. 1993; Frølund et al. 1996; Bura et al. 1998; Dignac et al. 1998; Conrad et al. 2003; Wilen et al. 2003). Auch große Mengen an DNS und RNS konnten nachgewiesen werden (Palmgren und Nielsen 1996; Nielsen und Jahn 1999). Diese Substanzen werden entweder aktiv von den Zellen ausgeschieden oder passiv z.B. durch die Lyse von Zellen freigesetzt (Wingender et al. 1999). Darüber hinaus können auch Abwasserinhaltsstoffe durch Adsorptionsprozesse in der Flockenmatrix akkumulieren

(Nielsen et al. 1997). Da in den heutigen niedrigbelasteten Systemen die Menge an gelösten Substanzen in der Wasserphase gering ist, finden die Organismen ihr Substrat vorwiegend in dieser EPS-Matrix. Folglich findet auch dort die Hydrolyse der Makromoleküle statt, wie die hohen *in situ* Aktivitäten von Phosphatasen, Esterasen, Lipasen und β -Glucuronidasen zeigen.

Des Weiteren wurde im Rahmen der *in situ* Enzymaktivitäts-Untersuchungen festgestellt, dass im Belebtschlamm neben Bakterien auch zahlreiche Protozoen wie Ciliaten und Flagellaten sowie Rädertiere in der Lage sind, hochmolekulare Substrate zu hydrolysieren. Štrojsová und Vrba (2005) beobachteten ebenfalls *in situ* Phosphatase- und Lipase-Aktivität in planktischen Rädertieren. Sie stellten fest, dass die Enzymaktivitäten im Verdauungstrakt lokalisiert waren.

2.3 Vergleich der klassischen Messung der enzymatischen Gesamtaktivität mit *in situ* Enzymaktivitätsbestimmungen

Die *in situ* Enzymaktivitäten wurden in den Belebtschlämmen und Schäumen nicht nur qualitativ beurteilt und Organismen zugeordnet (siehe Kap. D.3), sondern auch mittels Aktivitäts-Kategorien quantitativ bewertet. Die auf diese Weise ermittelten Aktivitäten von Lipasen und β -Glucuronidasen wurden mit den Ergebnissen der klassischen Gesamtaktivitäts-Bestimmungen dieser Enzyme verglichen. Dabei wurde festgestellt, dass für eine wirklich quantitative Beurteilung der Enzymaktivität einer Biozönose klassische Tests, bei denen der Umsatz eines Testsubstrats fluorimetrisch oder photometrisch bestimmt wird, notwendig sind. Die visuelle Abschätzung der Aktivität, wie sie im *in situ* Test erfolgt, liefert zwar einen groben Hinweis, ob es sich um geringe, mäßige oder sehr hohe Aktivitäten handelt, feinere Differenzierungen sind jedoch nicht möglich. Des Weiteren ist die visuelle Abschätzung subjektiv und daher vom jeweiligen Betrachter abhängig. Mit dem *in situ* Test können dagegen die Enzymaktivitäten bestimmten Organismen der Bakteriengemeinschaft zugeordnet werden, was mit der klassischen Methode nicht möglich ist. Eine optimale Aussage zur Enzymaktivität einer Biozönose erhält man also durch Kombination beider Methoden: mit der klassischen Methode lässt sich die Aktivität eines Enzyms quantitativ verfolgen und die *in situ* Technik liefert die Information, welche Organismen Enzymaktivität besitzen. So kann bei Zu- oder Abnahme einer Enzymaktivität verfolgt werden, welche Organismen der Biozönose ein verändertes Aktivitätsmuster aufweisen. Im folgenden Kapitel wird dies beispielhaft anhand eines Monitorings der Lipase-Aktivität während einer Bekämpfungsmaßnahme dargestellt.

2.4 Anwendungsmöglichkeit in der Praxis: Monitoring der Lipase-Aktivität von *Microthrix parvicella* während Bekämpfungsmaßnahmen

Anhand einer Erhebung aus dem Jahr 1996 beobachteten Lind und Lemmer (1998), dass der Einsatz von Aluminiumverbindungen zur Phosphorfällung das Vorkommen von *Microthrix parvicella* zurückdrängte. Auch Eikelboom et al. (1998) stellten bei Untersuchungen in nährstoffeliminierenden Anlagen aus vier europäischen Ländern fest, dass Simultanfällung mit Aluminiumsalzen fast immer zu geringeren Zahlen an *M. parvicella* sowie guten Schlammabsetzeigenschaften führte. Die damalige Dosierungsempfehlung von Eikelboom lag bei 3 g Al/(kg TS · d).

Mittlerweile liegen verschiedene Studien vor, in denen die Auswirkungen der Dosierung von Polyaluminiumchlorid in Kläranlagen mit Absetzproblemen untersucht wurden. So stellten Roels et al. (2002) fest, dass durch Zugabe des Polyaluminiumchlorids PAX-14 Schaumprobleme, die durch *M. parvicella* verursacht wurden, erfolgreich bekämpft werden konnten. PAX-14 wurde dabei in einer Konzentration von 1,5-4,5 g Al/(kg TS · d) dosiert. Nach 10-15 Tagen begannen sowohl Schlammvolumenindex als auch Schaum abzunehmen. Der Fädigkeitsindex ging nach etwa drei Wochen zurück. Sie beobachteten weiter, dass sich die morphologischen Eigenschaften von *M. parvicella* veränderten, während andere Fadenbildner wie *Nostocoida limicola* oder *Nocardia* spp. nicht beeinflusst wurden. Nielsen et al. (2005) untersuchten detailliert die Mechanismen, wie PAX-14 gegen *M. parvicella* wirkt. Nach der Zugabe von PAX-14 wurde mit Hilfe der MAR (Mikroautoradiografie)-Technik eine Reduzierung der Aufnahme von radioaktiv markierter Ölsäure sowie deren Triglycerid durch *M. parvicella* unter anaeroben Bedingungen festgestellt. Dies weist auf einen Effekt auf die Abbau-Eigenschaften von *M. parvicella* hin oder auf die Fähigkeit, Substrat zu transportieren. Die hydrophoben Oberflächeneigenschaften wurden nicht verändert. Allerdings konnte eine signifikante Abnahme der Esterase- und Lipase-Aktivität gemessen werden. Die Bildung neuer Lipase wurde jedoch nicht gehemmt, sodass eine kontinuierliche PAX-14-Dosierung erforderlich war. PAX-14 ist des Weiteren ein effektives Flockungsmittel, das die Bildung dichter Flocken fördert. Dies führte zu einer Einbettung von *M. parvicella* in das Flockenmaterial, sodass der Zugang zum Substrat aufgrund von Diffusionswiderständen erschwert wurde. Andere Untersuchungen zeigten, dass auch AlCl₃ erfolgreich zur Bekämpfung *M. parvicella*-bedingter Schaumprobleme eingesetzt werden kann. Lebek und Rosenwinkel (2002) führten in einer halbtechnischen Anlage Versuche zur Simultanfällung mit AlCl₃ durch. Eine Zugabe von 2,5 g Al/(kg TS · d) hatte ähnliche Effekte wie der Einsatz von Polyaluminiumchlorid.

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Siedlungswasserwirtschaft (ehemals Wassergüte- und Abfallwirtschaft) der TU München durchgeführten Untersuchungen zur Wirkung von AlCl₃ bei der Bekämpfung von *M. parvicella* ergaben eine deutliche Abnahme der Lipase-Aktivität von *M. parvicella* nach Zugabe von 2,2 g Al/(kg TS · d), was sowohl mittels klassischer Messung der Gesamtzymaktivität als auch mit in situ Untersuchungen der zellgebundenen Enzymaktivität nachgewiesen wurde. Nach Beendigung der AlCl₃-Zugabe kam es zu einem erneuten Anstieg der Lipase-Aktivität. Diese Beobachtungen zeigen, dass wie mit PAX-14 (Nielsen et al. 2005) auch mit AlCl₃ die Wirkung nicht langfristig anhält, sondern eine kontinuierliche Zugabe erforderlich ist, um die Lipase-Aktivität dauerhaft zu hemmen. Nielsen et al. (2005) nennen zwei denkbare Mechanismen für den neuerlichen Aktivitätsanstieg nach Beendigung der PAX-14-Zugabe. Eine mögliche Erklärung wäre, dass PAX-14 sehr schnell in der Flockenmatrix immobilisiert wird und so seine hemmende Wirkung auf neu produzierte Exoenzyme verliert. Das bedeutet, dass PAX-14 zwar die Aktivität der Enzyme unmittelbar nach seiner Zugabe hemmt, nicht aber deren Neuproduktion. Eine alternative Möglichkeit wäre eine Reaktivierung der Enzyme, nachdem die Aluminium-bedingte Hemmung allmählich nachlässt.

Um den Aktivitätsanstieg nach Beendigung der Aluminium-Zugabe besser zu verstehen, muss man die Mechanismen genauer betrachten, mit denen die Synthese extrazellulärer Enzyme reguliert wird. Da eine konstante Synthese extrazellulärer Enzyme, wie Lipasen, in Abwesenheit des zu hydrolysierenden Substrats für die Bakterien einen unnötigen Energieverlust darstellen würde, ist eine Regulation der Enzym-Synthese erforderlich. Eine Induktion ist hier

jedoch wesentlich komplizierter als bei intrazellulären Enzymen, da die hochmolekularen Substrate zu groß sind, um in die Zelle aufgenommen zu werden und dort die Synthese zu induzieren. Daher wird angenommen, dass ständig eine geringe Menge an extrazellulären Enzymen sekretiert wird. Bei Anwesenheit des Substrats kann so eine Hydrolyse unter Bildung niedrigmolekularer Produkte erfolgen, die in die Zelle aufgenommen werden und dort als Induktor wirken (Priest 1984, zitiert nach Chróst 1991). Wird die Aktivität der extrazellulären Enzyme jedoch durch Umweltbedingungen, wie beispielsweise Aluminiumsalze, gehemmt, kann diese Induktion nicht stattfinden, da keine Hydrolyse-Produkte gebildet werden. Verlieren die Aluminiumsalze z.B. durch Immobilisierung in der Flockenmatrix ihre hemmende Wirkung auf die Enzyme, kann eine neuerliche Induktion der Enzym-Synthese erfolgen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die AlCl_3 -Zugabe vermutlich über die Reduktion der Lipase-Aktivität den Abbau der lipophilen Stoffe durch *M. parvicella* beeinflusst. Dies führt zu einer Stagnation des Wachstums und so zu einer Eindämmung dieses Organismus. In mikroskopischen Untersuchungen wurde deutlich, dass nach einigen Tagen der AlCl_3 -Dosierung morphologische Veränderungen auftraten (Paris 2004). Je nach Dosierung waren die *M. parvicella*-Filamente zu Bündeln zusammengelagert oder traten als kurze Fäden auf. Der schlechte physiologische Zustand hängt vermutlich mit der Reduktion der Lipase-Aktivität zusammen. Des Weiteren hat die über einen längeren Zeitraum durchgeführte Untersuchung gezeigt, dass die Wirkung von AlCl_3 auf seinen Einsatzzeitraum beschränkt ist. Nach Beendigung der Dosierung nimmt bei ansonsten gleichbleibenden Versuchsbedingungen sowohl die Lipase-Aktivität als auch das Wachstum von *M. parvicella* wieder zu. Da sich in der Praxis jedoch die Wintermonate als besonders günstig für ein exzessives Wachstum von *M. parvicella* erwiesen haben, besteht die Möglichkeit, mit Aluminium-Dosierungen die Phase zu überbrücken, bis in der wärmeren Jahreszeit das *M. parvicella*-Wachstum ohnehin zurückgeht.

3 Physiologie fadenbildender Schaumbakterien in vitro und in situ

Zur Bekämpfung von Schlammabsetzproblemen wie Schaumbildung ist es wichtig, die physiologischen Eigenschaften der daran beteiligten Organismen zu kennen, um Bedingungen zu definieren, die ihrem Wachstum förderlich sind. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse können Maßnahmen ergriffen werden, die optimalen Milieu- und Substratbedingungen dieser Organismen zu vermeiden und deren Wachstum einzudämmen. Neben *Microthrix parvicella* und nocardioformen Actinomyceten, deren physiologische Eigenschaften bereits in früheren Studien intensiv untersucht wurden, lag in der vorliegenden Arbeit ein besonderes Augenmerk auch auf den weniger bekannten Schaum-relevanten fadenbildenden Organismen, wie *Nostocoida limicola* und den Eikelboom Morphotypen 0041/0675, 1851 und 0092, deren Wachstumsstrategien noch wenig bekannt sind und daher einer genaueren Charakterisierung bedürfen. Durch den Einsatz der Enzyme Labeled Fluorescence (ELF)-Technik war es möglich, zellgebundene Enzymaktivitäten dieser Organismen in situ nachzuweisen und deren Potential beim Abbau hochmolekularen Substrats abzuschätzen. Auch anhand von Reinkulturuntersuchungen wurden weitere Erkenntnisse gewonnen, die mit dem in der Literatur vorhandenen Datenmaterial verglichen wurden.

Microthrix parvicella

Hohe in situ Lipase-Aktivitäten von *M. parvicella* wurden in den Belebtschlämmen der Anlage KA-GR immer, in der Anlage KA-BT nur im Juli 2003 gefunden. Dies bestätigt die Vermutung, dass die hohen Lipase-Aktivitäten, die mit dem klassischen Test ermittelt wurden, auf die Aktivität von *M. parvicella* zurückzuführen sind. Außerdem wurde mit Hilfe der in situ Technik festgestellt, dass im Schaum der Anlage KA-GR deutlich weniger Filamente Lipase-Aktivität zeigten als im Belebtschlamm. Dies war auch in der Anlage KA-BT im Juli 2003 der Fall, als sowohl Belebtschlamm als auch Schaum von *M. parvicella* dominiert waren. So erklären sich die mit der klassischen Methode gemessenen niedrigeren Aktivitäten des Schaums trotz höherer Häufigkeit von *M. parvicella*. Ein Abbau lipophiler Substanzen und somit das Wachstum von *M. parvicella* findet daher vorwiegend im Belebtschlamm statt.

Das Vorhandensein hoher Lipase-Aktivitäten deckt sich mit Untersuchungen von Andreasen und Nielsen (1998), die mit Hilfe der Mikroautoradiografie (MAR) die Aufnahme von Ölsäure und Palmitinsäure durch *M. parvicella* beobachteten. Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten deutlichen in situ Lipase-Aktivitäten von *M. parvicella* zeigen dessen Fähigkeit, Palmitinsäure-Reste aus dem Substrat ELF-Palmitat abzuspalten. Leider konnte in Ermangelung eines entsprechenden Substrats die enzymatische Abspaltung von Ölsäure nicht in situ verfolgt und mit der Intensität der Palmitinsäure-Abspaltung verglichen werden. Allerdings ergaben die Ergebnisse der klassischen Lipase-Aktivitätsmessung in den *M. parvicella*-dominierten Belebtschlämmen von KA-GR und KA-BT, dass Ölsäure-Ester hier besser genutzt wurden als Palmitinsäure-Ester. Bereits Slijkhuis (1983b) zeigte an *M. parvicella*-Reinkulturen, dass diese Ölsäure sowie deren Polyoxyethylensorbitan-Derivat Tween 80 als Kohlenstoff- und Energiequelle bevorzugten. Auch die Polyoxyethylensorbitan-Derivate von Stearin-, Palmitin- und Laurinsäure förderten das Wachstum in ähnlicher Weise, allerdings wurden die entsprechenden freien langkettigen Fettsäuren nur schwach genutzt. Ölsäure-Konzentrationen über 0,15 g/l hemmten sogar das Wachstum von *M. parvicella*. Die Untersuchungen der vorliegenden Studie an Reinkulturen zeigten, dass auch Rhamnolipid-Konzentrationen über 50 mg/l eine Wachstumshemmung von *M. parvicella* bewirkten. Slijkhuis (1983b) weist darauf hin, dass nicht die absolute Ölsäuremenge, sondern das Verhältnis von Ölsäure zu Biomasse ausschlaggebend ist und ermittelte für seine Reinkulturen ein Ölsäure:Biomasse-Verhältnis von 40 mg/g als Grenzwert für toxische Wirkungen. Polyoxyethylensorbitan-Derivate und freie langkettige Fettsäuren besitzen unterschiedliche Wirkungen auf die Bildung des Enzyms Lipase. So wurde für *Pseudomonas aeruginosa* festgestellt, dass die Kultivierung mit Tween 80 stark stimulierend auf die Lipase-Bildung wirkte, während freie Ölsäure einen deutlichen inhibitorischen Effekt ausübte (Jaeger und Wohlfarth 1993; Jaeger et al. 1994).

Die Anwendung der MAR-Technik zeigte weiterhin, dass Acetat nicht von *M. parvicella* aufgenommen wurde (Andreasen und Nielsen 1998). Dagegen beobachteten Tandoi et al. (1998) ein Wachstum ihrer Reinkulturen mit Acetat. Slijkhuis (1983b) stellte in seinen Untersuchungen fest, dass flüchtige Fettsäuren wie Acetat und Butyrat in Kombination mit geringen Mengen Tween 80 das Zellwachstum von *M. parvicella* verbesserten. Dies deutet auf eine Wachstumsstrategie von *M. parvicella* hin, die auch in Kläranlagen eine Rolle spielen könnte, da die Analyse der in situ Aktivitäten neben hohen Lipase- auch deutliche Esterase-Aktivitäten er-

gab. Die beobachtete β -Glucuronidase-Aktivität lässt weiterhin auf die Fähigkeit von *M. parvicella* schließen, Glucuronid-Konjugate zu spalten.

Wachstumsuntersuchungen mit *M. parvicella*-Reinkulturen in flüssigem Belebtschlammhydrolysat (HA) ergaben ein starkes Wachstum, das nach einer lag-Phase von ca. 4-7 Tagen einen exponentiellen Verlauf zeigte und nach etwa 10-12 Tagen die stationäre Phase erreichte. Daher ist *M. parvicella* in hochbelasteten Anlagen mit einem Schlammalter von nur wenigen Tagen nicht konkurrenzfähig und kann sich nur in niedrigbelasteten Systemen etablieren, in denen das Schlammalter mehrere Wochen beträgt. Eine charakteristische Wachstumsstrategie der *M. parvicella*-Reinkulturen war die Ausbildung einer einzigen großen Flocke, die so bei anderen Reinkulturen von fadenbildenden Bakterien, wie z.B. *Nostocoida limicola*, nicht beobachtet wurde. Vermutlich wirkt die Flocke wie ein Netz, welches Substrate, wie z.B. lipophile Stoffe, einfängt, wodurch deren Verfügbarkeit verbessert wird und es zu einer „Substrat-Aufkonzentrierung“ kommt, ähnlich wie in Belebtschlammflocken. Damit kann die für Lipasen notwendige Schwellenkonzentration an Substrat überschritten werden, die erforderlich ist, damit diese eine hohe Aktivität zeigen (Bornscheuer 2002). Auch die beobachtete Abhängigkeit des Wachstums vom pH-Wert des Mediums mit dem höchsten Zellwachstum bei einem pH-Wert von 8,0 weist auf einen Zusammenhang mit der Lipase hin, die bei pH 8 ihre maximale Aktivität besitzt (Fojan et al. 2000). Bereits Slijkhuis (1983a) hatte festgestellt, dass für das Wachstum von *M. parvicella*-Reinkulturen ein pH-Wert von 7,7-8,0 notwendig ist. Daher ist *M. parvicella* in nitrifizierenden Anlagen, in denen der pH-Wert unter 6 absinken kann, selten zu finden.

Während des Zerfalls von Zellen in Schlammfraktionen werden durch Zellyse u.a. Pentosen wie Rhamnose und Ribose freigesetzt (Dignac et al. 1998), aus denen viele Organismen Bioside wie Rhamnolipide herstellen können. Diese mikrobiell produzierten Tenside können aufgrund ihrer oberflächenaktiven Eigenschaften nicht nur zur Stabilisierung von Schäumen beitragen, sondern auch die Verfügbarkeit hydrophober Kohlenstoffquellen durch eine verbesserte Löslichkeit im wässrigen Milieu erhöhen und damit deren Abbau verbessern (Käppeli und Finnerty 1979, Ito und Inoue 1982, Oberbremer et al. 1990, Zhang und Miller 1992). Die Reinkultur-Untersuchungen der vorliegenden Studie zeigten, dass anionische Rhamnolipide in einem Konzentrationsbereich von 0,01-10 mg/l in einigen, jedoch nicht allen Fällen zu einem beschleunigten Wachstum von *M. parvicella* in HA-Medium beitragen. Da das Wachstum auch in einem Minimalmedium mit Rhamnolipiden als einziger Kohlenstoffquelle unterstützt wurde, können diese anscheinend auch direkt als Substrat genutzt werden. Daher bleibt unklar, ob das beschleunigte Wachstum in HA-Medium auf der durch die Tensidwirkung verbesserten Verfügbarkeit von Kohlenstoffquellen beruht oder die Rhamnolipide lediglich eine zusätzliche Substratquelle für *M. parvicella* darstellen. Die Untersuchungen in dem Minimalmedium ergaben zudem, dass mit Ammonium als Stickstoffquelle wesentlich höhere Zellerträge erzielt wurden als mit Nitrat. Slijhuis (1983b) hatte in seinen Versuchen ebenfalls beobachtet, dass *M. parvicella* auf reduzierte Stickstoffverbindungen angewiesen ist. Auch dies ist ein Grund dafür, dass *M. parvicella* selten in vollständig nitrifizierenden Anlagen vorkommt.

Weiter wurde festgestellt, dass sich Rhamnolipid-Konzentrationen über 50 mg/l im HA-Medium wachstumshemmend auswirkten. Eine hemmende bzw. antimikrobielle Wirkung von Rhamnolipiden auf verschiedene grampositive und gramnegative Bakterien-Reinkulturen, wie

Bacillus spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* spp. und verschiedene *Enterobacteriaceae*, wurde bereits in verschiedenen Studien nachgewiesen (Itoh et al. 1971; Abalos et al. 2001; Benincasa et al. 2004). Dabei lagen die minimalen Konzentrationen, ab der eine Hemmung stattfand, in einem Bereich von 4-250 mg/l. Allerdings gab es auch Stämme, deren Wachstum nicht durch Rhamnolipide gehemmt wurde. Verantwortlich für die antimikrobielle Wirkung sind vermutlich die physiko-chemischen Eigenschaften des Biotensids, die zu einer Veränderung der Zelloberfläche der Bakterien führen.

Nocardioforme Actinomyceten

Im Gegensatz zu den DIE993-positiven *Dietzia* spp. in der Anlage KA-M, für die keine in situ Enzymaktivität nachgewiesen wurde, zeigten RHOb183-positive nocardioforme Actinomyceten aus dem *Rhodococcus* sp. Cluster B in der Anlage KA-M sowie *Rhodococcus erythropolis* in der Anlage KA-BT deutliche Aktivitäten für Phosphatase, Esterase und β -Glucuronidase, jedoch nur eine geringe Lipase-Aktivität. Untersuchungen von Eales et al. (2005) zur in situ Physiologie von PTLO (pine tree like organisms; Actinomyceten mit einer pinienartigen Morphologie) zeigten ebenfalls in situ Aktivitäten dieser Organismen für Phosphatase, Esterase und β -Glucuronidase. Dabei konnte jedoch in situ keine Lipase-Aktivität nachgewiesen werden. Die Autoren vermuten, dass PTLO zwar Lipase-Aktivität besitzen, dieses Enzym jedoch nicht den Palmitinsäure-Rest des benutzten ELF-Substrats abspalten kann. Sie schließen dies aus den Ergebnissen ihrer MAR-Experimente, die zeigten, dass Oleat, aber kein Palmitat aufgenommen wurde. Demgegenüber weisen die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung darauf hin, dass die RHOb183-positiven *Rhodococcus* sp. aus dem Cluster B sowie *Rhodococcus erythropolis* der hier beprobten Belebtschlämme und Schäume eine, wenn auch nur geringe, Fähigkeit zur Abspaltung des Palmitinsäure-Rests besitzen. Wie schon bei *M. parvicella* ergaben die klassischen Lipase-Aktivitätsmessungen in einem Actinomyceten-dominierten Belebtschlamm höhere Umsatzraten bei Verwendung von MUF-Oleat im Vergleich zu MUF-Palmitat, was darauf schließen lässt, dass die hier untersuchten Rhodokokken das Substrat Oleat bevorzugen. Weiterhin beschreiben Eales et al. (2005), dass keines der PTLO-Filamente im MAR-Experiment Acetat aufnahm. Jedoch ergaben die Ergebnisse ihrer in situ Enzymaktivitätsbestimmungen deutliche Esterase-Aktivitäten dieser Organismen mit einem hohen Potential, Acetat abzuspalten.

Zahlreiche Studien zeigten bereits das breite Substratverwertungsspektrum nocardioformer Actinomyceten. So wurden neben leicht abbaubaren Substraten wie Mono- und Disacchariden, Polyalkoholen und kurzkettigen Fettsäuren auch langkettige Fettsäuren und Alkane, Aromaten sowie polychlorierte Kohlenwasserstoffe als Kohlenstoff- und Energiequelle genutzt (Lemmer und Kroppenstedt 1984; Lemmer 1985; Goodfellow et al. 1996; Soddell et al. 1998). Die in der vorliegenden Untersuchung ermittelten deutlichen Aktivitäten von Phosphatasen, Esterasen und β -Glucuronidasen RHOb183-positiver Rhodokokken bestätigen, dass diese Organismen nicht nur hydrophobe, sondern auch hydrophile Substrate nutzen können und unterstreichen deren stoffwechselfysiologische Vielseitigkeit. Aktuelle in situ Studien von Carr et al. (2005) zeigten, dass auch *Gordonia amarae* ein vielseitiges Substratspektrum besitzt. Im MAR-Experiment wurde eine Reihe hydrophober und hydrophiler Substanzen unter aeroben, anaeroben und anoxischen Bedingungen aufgenommen. Während für Glucose, Ölsäure und Estradiol unter den getesteten Inkubationsbedingungen keine Aufnahme stattfand, wurden Glycin, Glycerin, Acetat und Palmitat unter allen getesteten Bedingungen von

G. amarae assimiliert. Interessant ist, dass *G. amarae*, im Gegensatz zu den von Eales et al. (2005) untersuchten PTLO, Palmitat, aber keine Ölsäure aufnehmen konnte.

Ein Vergleich der in situ Enzymaktivitäten RHOb183-positiver *Rhodococcus* sp. aus dem Cluster B im Belebtschlamm und Schaum der zweiten Stufe der KA-M ergab für alle untersuchten Enzyme eine Anreicherung aktiver Organismen in der Schaumfraktion. Diese Organismen dominierten die Population nocardioformer Actinomyceten im Schaum zwischen Mitte September 2003 und November 2004. Die gemessenen Gesamt-Lipase-Aktivitäten lagen in diesem Zeitraum besonders hoch und waren im Schaum verglichen mit dem Belebtschlamm stark erhöht. Es ist daher davon auszugehen, dass diese hohen Gesamt-Lipase-Aktivitäten auf die Anreicherung aktiver, RHOb183-positiver Rhodokokken zurückzuführen ist, die die in der Schaumschicht vorhandenen lipophilen Stoffe rasch verstoffwechseln und dabei durch ihr Wachstum zur Schaumstabilisierung auf der Wasseroberfläche beitragen. Da diese Organismen neben Lipase- vor allem hohe Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivitäten aufwiesen, wird dieses Wachstum auch durch die Nutzung anderer hochmolekularer Substanzen gefördert.

In der einstufigen KA-BT wurde ebenfalls eine Anreicherung enzymatisch aktiver nocardioformer Actinomyceten im Schaum festgestellt, die mit der Sonde R.ery619 als *Rhodococcus erythropolis* identifiziert wurden. Der zwischen November 2003 und Mai 2004 beobachtete Anstieg der Gesamt-Lipase-Aktivität in der Schaumfraktion hängt daher vermutlich mit der Zunahme der dort dominierenden *R. erythropolis*-Organismen von Kategorie 3 auf 5 zusammen, für die in situ eine, wenn auch nur geringe, Lipase-Aktivität nachgewiesen wurde. Die in situ Aktivitäten von Phosphatase, Esterase und β -Glucuronidase dieser Organismen weisen auch hier darauf hin, dass neben lipophilen Stoffen andere hochmolekulare Substrate zum Wachstum genutzt werden können.

Insgesamt betrachtet liefern die Ergebnisse zwei wichtige Erkenntnisse: zum einen unterscheiden sich verschiedene Spezies nocardioformer Actinomyceten anhand ihrer Enzymaktivitätsmuster und damit auch in ihrer Fähigkeit, bestimmte Substrate zum Wachstum zu nutzen. Deshalb ist eine genaue Charakterisierung der Actinomyceten-Population Voraussetzung für gezielte Bekämpfungsmaßnahmen. Zum anderen bedeutet die Anreicherung enzymatisch aktiver Actinomyceten in der Schaumfraktion, dass diese dort gute Wachstumsbedingungen vorfinden.

Morphotyp *Nostocoida limicola*

Für Organismen des Morphotyps *Nostocoida limicola* besteht, wie bereits erwähnt, eine große phylogenetische Diversität. Daher ist zu vermuten, dass sich auch deren physiologische Eigenschaften, wie z.B. Enzymaktivitäten, voneinander unterscheiden. In den Untersuchungen zur in situ Enzymaktivität konnte dies auch festgestellt werden. Allerdings sind die Ergebnisse aufgrund der geringen Häufigkeit von *N. limicola* in den untersuchten Proben als vorläufig zu betrachten.

Einige der NLII65-positiven *N. limicola*-Organismen aus der Klasse der *Actinobacteria* zeigten sowohl im Belebtschlamm als auch im Schaum eine geringe Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivität. Dagegen wurde bei NLIMII 175-positiven Organismen, die eben-

falls den *Actinobacteria* angehören, nur eine geringe β -Glucuronidase-Aktivität nachgewiesen. Lipase-Aktivität wurde bei keinem dieser Organismen detektiert. Dies stimmt mit den Beobachtungen einer Studie von Seviour et al. (2005) überein, die zeigten, dass NLMII 175-positive *N. limicola*-Filamente weder Palmitat noch Ölsäure unter aeroben Bedingungen nutzen konnten. Eine geringe β -Glucuronidase-Aktivität wurde auch in NLIMI 91-positiven *N. limicola*-Organismen aus dem *Firmicutes*-Phylum festgestellt. Keinerlei Enzymaktivität wurde dagegen in *N. limicola*-Filamenten aus dem *Chloroflexi*-Phylum und aus der Klasse der *Alphaproteobacteria* beobachtet.

Kragelund et al. (2005) beschreiben die physiologischen Eigenschaften von *Meganema perideroedes*, einem fadenbildenden Organismus mit *N. limicola* II-Morphologie aus der Klasse der *Alphaproteobacteria*. Untersuchungen mit MAR zeigten, dass die Filamente unter aeroben Bedingungen ein sehr vielseitiges Substratspektrum besitzen. So wurden zahlreiche kurzkettige und langkettige Fettsäuren, Zucker und Aminosäuren aufgenommen, wie Acetat, Propionat, Butyrat, Ölsäure, Glucose, Galaktose, Mannose, Glycin und Leucin. Eine derartige Vielseitigkeit hinsichtlich der in situ Substrataufnahme wurde bis jetzt noch bei keinem anderen fadenbildenden Belebtschlamm-Organismus beobachtet. Exoenzymaktivitäten von Esterase, Lipase, Phosphatase, β -Glucuronidase, Chitinase und Galactosidase wurden im ELF-Test jedoch nicht festgestellt. Dies bestätigt die Ergebnisse der vorliegenden Untersuchung, in der *N. limicola*-Filamente aus der Klasse der *Alphaproteobacteria* ebenfalls keine Exoenzymaktivität für Lipase, Phosphatase, Esterase und β -Glucuronidase aufwiesen. Kragelund et al. (2005) schließen aus dem Fehlen der Exoenzymaktivität, dass *M. perideroedes* hauptsächlich lösliche kurzkettige Substrate konsumiert und nicht auf eine Hydrolyse hochmolekularer Substrate vor der Aufnahme angewiesen ist. Dies stimmt auch mit der Beobachtung überein, dass *M. perideroedes* zahlreiche Substrate assimiliert und große PHA (Polyhydroxyalkanoat)-Granula bildet.

Dagegen weist die Exoenzymaktivität einiger *N. limicola*-Filamente aus der Klasse der *Actinobacteria* auf eine Hydrolyse hochmolekularer Substrate hin. So zeigten auch die Untersuchungen an den NLII65-positiven Reinkulturen aus Belebtschlamm, dass diese hochmolekulare Substrate, wie z.B. die Polysaccharide Dextrin, Glycogen oder Stärke, hervorragend zum Wachstum nutzen konnten. Neben hochmolekularen Substraten konnten diese Organismen im Reinkulturversuch aber auch eine Vielzahl einfacher Kohlenhydrate wie Glucose, Fructose, Maltose, Raffinose und Saccharose abbauen. Diese Vorliebe für Kohlenhydrate, insbesondere Polysaccharide, zeigte sich auch in dem massenhaften Auftreten NLII65-positiver *N. limicola*-Filamente in Kläranlagen mit hohem Eintrag an zuckerhaltigem Abwasser aus der Getränke-, Speiseeis- oder Süßwarenindustrie (Schade und Lemmer 2002). Ein deutliches Wachstum der Reinkulturen wurde ebenfalls mit Gluconsäure und Propionsäure festgestellt. Während Acetat das Wachstum mäßig förderte, wurde Citrat als Kohlenstoffquelle nicht oder kaum genutzt. Auch die von Blackall et al. (2000) beschriebenen NLII65-positiven *N. limicola*-Isolate zeigten ein Wachstum in synthetischen Medien mit Glucose und Acetat als einziger Kohlenstoffquelle, nicht jedoch mit Citrat. Der Einfluss des Nährmediums auf die Morphologie dieser Reinkulturen, die je nach Substratangebot als lange, verschlungene Fäden mit scheibenförmigen Zellen (z.B. mit Acetat oder Tween 80 als Kohlenstoffquelle) oder als Zellhaufen kokkoider Zellen (z.B. auf R2A-Medium oder mit Stärke als Kohlenstoffquelle) wuchsen, wurde nicht nur in der vorliegenden Untersuchung, sondern auch von Blackall et al.

(2000) beobachtet. Als Stickstoffquelle bevorzugten die Isolate in der vorliegenden Arbeit Ammonium im Reinkulturversuch.

Die AHW183-positiven Isolate aus dem *Chloroflexi*-Phylum zeigten ein völlig anderes Wachstumsverhalten im Reinkulturversuch. Im Gegensatz zu den zuvor beschriebenen Reinkulturen aus der Klasse der *Actinobacteria* konnten diese weder in dem synthetischen Komplexmedium R2A noch in Mineralsalzmedien mit unterschiedlichen Kohlenstoffquellen, wie Glucose, Acetat, Tween 80 oder Citrat, und Stickstoffquellen, wie Ammonium oder Nitrat, kultiviert werden. Das Wachstum wurde lediglich in dem aus Belebtschlamm hergestellten Medium HA unterstützt, was darauf hinweist, dass diese Organismen auf eine komplexe Nährstoffversorgung angewiesen sind. Vermutlich sind in diesem Medium spezielle Substanzen oder Wachstumsfaktoren enthalten, die das Wachstum dieser Bakterien ermöglichen. Auch hinsichtlich der Wachstumsgeschwindigkeiten in HA-Medium wurden deutliche Unterschiede zwischen den Isolaten aus dem *Chloroflexi*-Phylum und denen aus der Klasse der *Actinobacteria* festgestellt. Während die zu den *Actinobacteria* gehörenden Reinkulturen bereits nach wenigen Tagen ihr maximales Wachstum erreicht hatten und hohe Zellerträge lieferten, war das Wachstum der Organismen aus dem *Chloroflexi*-Phylum stark verzögert und zeigte erst nach ca. einer Woche einen langsamen Anstieg der Biomasse. Der Zellertrag lag hier wesentlich niedriger. Außerdem bevorzugten die Isolate aus der Klasse der *Actinobacteria* höhere CSB-Konzentrationen des HA-Mediums, was darauf schließen lässt, dass diese Organismen in höher belasteten Kläranlagen konkurrenzfähiger sind als *N. limicola* aus dem *Chloroflexi*-Phylum.

In der Literatur sind weitere Untersuchungen zur Physiologie von *N. limicola*-Organismen beschrieben, die jedoch phylogenetisch nicht genauer charakterisiert sind. Sie geben zwar weitere Hinweise auf die physiologische Vielfalt dieses Morphotyps, können aber nicht direkt mit den Ergebnissen der vorliegenden Studie verglichen werden. So isolierten Nowak und Brown (1990) *N. limicola*-Reinkulturen, die nur geringfügiges Wachstum in synthetischen Medien zeigten, die lediglich eine einzige Kohlenstoff- und Energiequelle enthielten. Jedoch waren die Isolate in Gegenwart von Pepton in der Lage, auf verschiedenen Kohlenhydraten, wie Glucose, Saccharose, Glycerol oder Tween 80, zu wachsen. Dagegen war das Wachstum auf Acetat und Citrat auch in Gegenwart von Pepton schwach. Andreasen und Nielsen (1997) konnten mit Hilfe von MAR eine starke Aufnahme von Glucose und Ölsäure durch nicht genauer charakterisierte *N. limicola*-Organismen beobachten. Dagegen wurden Acetat, Glycin und Leucin nur schwach, in einer anderen Kläranlage sogar gar nicht aufgenommen.

Morphotypen 0041/0675, 1851 und 0092

Auch der Morphotyp 0041/0675 weist eine phylogenetische Diversität auf. Allerdings ist es aufgrund des Fehlens geeigneter Sonden nicht möglich, alle Typ 0041/0675 Organismen eindeutig taxonomisch zuzuordnen. Durch Einsatz der Oligonukleotidsonde TM7905 wurden in einigen Typ 0041/0675-Filamenten, die der TM7-Gruppe angehören, hohe Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivitäten beobachtet. Den übrigen TM7-negativen Typ 0041/0675-Organismen konnten die Enzymaktivitäten nur durch Kombination mit Phasenkontrastmikroskopie bzw. Hybridisierung mit dem *Bacteria*-Sondenmix EUB338 (EUB338, EUB338-II, EUB338-III) zugeordnet werden. Hier zeigten zahlreiche Organismen ebenfalls Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivität. Eine genauere taxonomische Charak-

terisierung dieser Organismen mit Hilfe gruppenspezifischer Sonden war nicht möglich (Thomsen et al. 2002). Lipase-Aktivität wurde weder in TM7-positiven noch TM7-negativen 0041/0675-Filamenten nachgewiesen.

Im MAR-Experiment erwies sich Typ 0041/0675 hinsichtlich seiner Substratnutzung als vielseitig. In der Untersuchung von Thomsen et al. (2002) nahmen die 0041/0675-Filamente die Monosaccharide Glucose und Galactose mit sehr hoher Intensität sowie Mannose auf. Auch Leucin wurde von den meisten Filamenten aufgenommen, Glycin dagegen nur von einigen. Im Gegensatz dazu wurde keine Aufnahme von Acetat sowie Ölsäure beobachtet. Es konnte kein deutlicher physiologischer Unterschied zwischen TM7-positiven und TM7-negativen Filamenten festgestellt werden. Sowohl die vielseitige Substrataufnahme als auch die starken Enzymintensitäten von Phosphatase, Esterase und β -Glucuronidase unterstreichen die hohe Stoffwechselaktivität der Typ 0041/0675-Organismen.

Eine Analyse der in situ Physiologie der Aufwuchsorganismen von Typ 0041/0675 zeigte auch hier eine hohe Vielseitigkeit in der Substratnutzung. Glucose und Galaktose wurden von 50-100% der Organismen, Mannose, Leucin und Acetat von 5-50% aufgenommen. Eine geringere Substrataufnahme wurde für Glycin und Ölsäure beobachtet, die abhängig von der untersuchten Kläranlage war (Thomsen et al. 2002). Sowohl die Ölsäure-Aufnahme im MAR-Experiment als auch die Lipase-Aktivität der in situ Enzymaktivitäts-Untersuchungen deuten auf die Fähigkeit einiger Aufwuchsorganismen hin, langkettige Fettsäuren zu nutzen. Thomsen et al. (2002) charakterisierten diese Organismen näher. Jedoch konnte mittels FISH nur weniger als die Hälfte der Organismen mit spezifischen Oligonukleotidsonden identifiziert werden. Einige hybridisierten mit den Sonden ALF1b, BET42a sowie SRB385, die *Alphaproteobacteria*, *Betaproteobacteria* bzw. sulfatreduzierende Bakterien aus der Klasse der *Deltaproteobacteria* detektieren. HGC96a-positive Bakterien wurden nur auf TM7-negativen Filamenten nachgewiesen. Aufwuchsorganismen aus dem *Bacteroidetes*-Phylum wurden nur in einer der beiden untersuchten Kläranlagen gefunden.

Viele der untersuchten Typ 1851-Filamente, die mittels Hybridisierung mit der Sonde CHL1851 dem *Chloroflexi*-Phylum zugeordnet wurden, zeigten Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivität, jedoch keine Lipase-Aktivität. Wie bei Typ 0041/0675 erwies sich auch hier ein Teil der Aufwuchsorganismen als Lipase-positiv. Kohno et al. (2002) zeigten anhand von Reinkulturuntersuchungen mit Typ 1851-Isolaten, dass das Spektrum der genutzten Kohlenstoffquellen zwischen den Isolaten unterschiedlich war. Dennoch waren Zucker wie Glucose, Fructose, Mannose, Maltose, Raffinose, Arabinose, Xylan und Pyruvat im Allgemeinen gut abbaubar. Die beobachteten Exoenzymaktivitäten dieser Studie zeigen, dass dieser Organismus im Belebtschlamm auch ein hohes Aktivitätspotential für hochmolekulares Substrat besitzt. So wurde bereits von Eikelboom et al. (1998) vermutet, dass Typ 1851 mit *M. parvicella*, nocardioformen Actinomyceten und den Typen 0041/0675 und 0092 um die partikuläre CSB-Fraktion im Zulauf konkurriert.

Filamente des Typs 0092 sind ebenfalls in der Lage, hochmolekulare Substrate zu nutzen, wie die in situ Aktivitäten von Phosphatase-, Esterase und β -Glucuronidase zeigten. Dies bestätigten auch Untersuchungen von Horan et al. (1988). Die Autoren beschreiben Typ 0092 als aeroben Organismus, der Gelatine, DNS und Casein spalten kann. Er konnte des Weiteren aus Arginin Ammonium abspalten und war Phosphatase-positiv (Horan et al. 1988). Eikelboom

(1988) stellte fest, dass Stickstoff- und Schwefelquellen von Typ 0092 in oxidiert und reduzierter Form genutzt wurden, wodurch er in nitrifizierenden Anlagen gegenüber *M. parvicella* konkurrenzfähig ist.

Isosphaera spp., *Haliscomenobacter hydrossis*, Typ 021N, Typ 0961

Für diese fadenbildenden Organismen wurden in der Regel keine Enzymaktivitäten für Phosphatase, Esterase, β -Glucuronidase und Lipase beobachtet. Lediglich in Typ 0961-Filamenten wurden vereinzelt sehr geringe Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivitäten festgestellt. Wachstumsversuche mit *Haliscomenobacter hydrossis*-Reinkulturen ergaben, dass diese verschiedene Zucker wie Glucose, Lactose und Saccharose, aber auch hochmolekulare Substrate wie Stärke als Kohlenstoffquelle nutzen konnten (Mulder und Deinema 1992; Kämpfer et al. 1995). Die Ergebnisse der Enzymaktivitäts-Bestimmungen in der vorliegenden Arbeit weisen jedoch darauf hin, dass *H. hydrossis* in situ hochmolekulare Substrate, wie Ester, Lipide und Glucuronide, nicht bevorzugt. Untersuchungen an Reinkulturen von Typ 021N (Williams und Unz 1985a; Williams und Unz 1985b; Williams und Unz 1989) zeigten die Nutzung verschiedenster Substrate wie Mono- und Disaccharide (Glucose, Fructose, Maltose, Trehalose, etc.), Zuckeralkohole (Mannitol, Inositol, etc.), Aminosäuren (Glutamat, Alanin, etc.) und kurzkettige Fettsäuren (Acetat, Lactat, Propionat, etc.). Hochmolekulare Substrate wie Stärke und Tween 80 sowie die langkettigen Fettsäuren Oleat und Palmitat wurden dagegen von diesen Reinkulturen nicht genutzt. Auch Richard et al. (1985) stellten eine Präferenz ihrer Typ 021N-Isolate für einfache organische Säuren und Zucker fest, während Glycogen und Stärke nicht hydrolysiert wurden. Im MAR-Experiment konnte die Aufnahme von Acetat und Glucose durch Typ 021N-Filamente im Belebtschlamm verschiedener Anlagen in situ bestätigt werden (Andreasen und Nielsen 1997; Nielsen et al. 1998). In einigen, jedoch nicht allen Belebtschlämmen wurden auch Glycin, Leucin und Oleat aufgenommen. Die Ergebnisse zeigen, dass Typ 021N-Filamente zum Wachstum vor allem einfache Substrate nutzen, während hochmolekulare Substanzen nicht bzw. kaum verwertet werden. Es spiegelt sich auch im Fehlen der extrazellulären Enzymaktivitäten dieser Organismen wider, dass hochmolekulare Substrate wie Ester, Lipide und Glucuronide nicht hydrolysiert werden. Die geringen Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivitäten, die in situ bei Typ 0961 festgestellt wurden, weisen auf ein gewisses Potential zur Spaltung hochmolekularer Ester- und Glucuronid-Verbindungen hin. So zeigte bereits Trick (1982) an Reinkulturen, dass diese neben Acetat und Glycerin auch hochmolekulare Stärke, nicht jedoch Tween 80 als Kohlenstoffquelle nutzen können.

4 Fazit und Ausblick

Die Exoenzymaktivitäten von *Microthrix parvicella*, nocardioformen Actinomyceten, *Nostocoida limicola*-Organismen aus der Klasse der *Actinobacteria* sowie der Eikelboom Typen 0041/0675, 1851 und 0092 weisen auf das Potential dieser Organismen hin, hochmolekulare Substanzen zu hydrolysieren. Dies stimmt mit deren Auftreten bei Niedriglastbedingungen überein, die Organismen bevorzugen, die in der Lage sind, hochmolekulares und partikuläres Substrat zu nutzen. Damit unterscheiden sie sich von fadenbildenden Bakterien wie *Haliscomenobacter hydrossis*, Typ 021N oder Typ 0961, die keine oder kaum Exoenzymaktivität aufwiesen. Da diese Organismen bevorzugt unter Hochlastbedingungen vorkommen, wo hohe Konzentrationen an gelöstem Substrat vorliegen, kommt der Hydrolyse von hochmolekularen Substanzen dort weniger Bedeutung zu. Dennoch zeigte das regelmäßige Auftreten von *H.*

hydrossis im Niedriglastbereich, dass dieser Organismus auch unter den dort herrschenden Bedingungen konkurrenzfähig ist.

Hinsichtlich der Hydrolyse hochmolekularen Substrats unterscheiden sich *M. parvicella* und nocardioforme Actinomyceten von den übrigen „Niedriglast-Fadenbakterien“ *N. limicola*, Typ 0041/0675, Typ 1851 und Typ 0092 durch ihre Fähigkeit, lipophile Substanzen mittels Lipasen zu spalten. Damit haben sie beim Eintrag fettähnlicher Substanzen einen Vorteil gegenüber *N. limicola* und den Typen 0041/0675, 1851 und 0092. Allerdings ist für ein starkes Wachstum von *M. parvicella* bei hohen Konzentrationen an langkettigen Fettsäuren (LKFS) – aufgrund der bereits beschriebenen toxischen Effekte von LKFS auf *M. parvicella* bei einem LKFS:Biomasse-Verhältnis > 40 mg/g (Slijkhuis 1983b) – eine bestimmte Populationsgröße erforderlich, d.h. *M. parvicella* muss sich bereits etabliert haben (Lemmer et al. 2002). Hier könnte man sich ein Zusammenwirken von *M. parvicella* mit anderen fettabbauenden Belebtschlammorganismen, wie z.B. nocardioformen Actinomyceten, vorstellen, die hohe LKFS-Mengen durch Abbau soweit reduzieren, bis eine Konzentration erreicht ist, die unterhalb des für *M. parvicella* toxischen Grenzwerts liegt. Daraufhin kann das Wachstum von *M. parvicella* einsetzen. Mit zunehmender Biomasse werden dann auch höhere LKFS-Konzentrationen toleriert, die ein exzessives Wachstum von *M. parvicella* fördern können. Tatsächlich findet man *M. parvicella* auch häufig mit nocardioformen Actinomyceten vergesellschaftet, wie beispielsweise in KA-BT, wo es zu einer wechselweisen Dominanz beider Organismengruppen kam.

Während sich *M. parvicella* vorwiegend im Belebtschlamm vermehrt, wie sowohl die in der vorliegenden Arbeit ermittelten *in situ* Enzymaktivitäten als auch von Müller (2006) gemessene Stoffwechselaktivitäten zeigten, und anscheinend nur passiv aufgrund seiner hydrophoben Zellwandeigenschaften an die Oberfläche flотиert, finden nocardioforme Actinomyceten in der Schaumfraktion gute Wachstumsbedingungen. Daher kommt es dort zu einer Anreicherung enzymatisch aktiver Organismen. Nocardioforme Actinomyceten haben in der an die Oberfläche flötierten Schlammfraktion entscheidende Wachstumsvorteile gegenüber anderen Organismen. Zum einen besitzen sie aufgrund ihrer Pigmentierung eine hohe Resistenz gegenüber UV-Strahlung (Arrage et al. 1993; Warnecke et al. 2005). Des Weiteren sind sie durch die wachsartigen Mycolsäuren in ihrer Zellwand sehr gut an Trockenheit angepasst (Lemmer 1996). Einige nocardioforme Actinomyceten, wie beispielsweise verschiedene *Rhodococcus* und *Nocardia* spp., produzieren zellgebundene Trehaloselipide (Lang und Trovitzsch-Kienast 2002). Trehalose bietet ebenfalls einen Schutz vor Austrocknung (Crowe et al. 1984, zitiert nach McBride und Ensign 1987). Dies gibt ihnen die Möglichkeit, sich aktiv in der Schaumfraktion zu vermehren. Dementsprechend müssen sich die Bekämpfungsmaßnahmen im Falle von *M. parvicella* auf den Belebtschlamm, im Falle nocardioformer Actinomyceten auf die Schaumschicht richten. Als geeignete Maßnahmen gegen *M. parvicella* erwiesen sich beispielsweise die Zudosierung von Aluminiumsalzen oder eine Erhöhung des Sauerstoff-Gehalts auf 2 mg/l (Lemmer und Lind 2000). Nocardioforme Actinomyceten können durch regelmäßige Entfernung des Schaums mittels Schwimmschlammräumer bekämpft werden, wobei darauf zu achten ist, dass die flötierte Schlammfraktion nicht ins System zurückgeführt wird, um eine erneute Animpfung mit nocardioformen Actinomyceten zu vermeiden (Lemmer und Lind 2000). Für beide Organismengruppen gilt es, die Verfügbarkeit lipophiler Substanzen zu begrenzen. So kann z.B. der Eintrag an Fetten und Ölen mit dem Zulauf durch den Einsatz betrieblicher Fettabscheider reduziert werden.

Die genaue Rolle der Morphotypen *N. limicola*, 0041/0675, 1851 und 0092 bei der Schaumbildung ist momentan noch nicht genau geklärt. Da sie in den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kläranlagen nur selten in der Schaumfraktion angereichert waren, scheinen sie dort weder gute Wachstumsbedingungen vorzufinden, wie ihre geringen in situ Enzymaktivitäten im Schaum belegen, noch für die Stabilisierung der flotierten Schlammfraktion eine entscheidende Rolle zu spielen. In einer Studie an 40 kommunalen Kläranlagen mit Schaumproblemen dominierten sie nur in weniger als 11% der Anlagen (Müller et al. 2005). Die Substrat- und Milieubedingungen kommunaler Anlagen verleihen ihnen anscheinend meist keinen ausschlaggebenden Wachstumsvorteil gegenüber anderen Belebtschlammorganismen. So ist z.B. Typ 0041/0675 aufgrund seines vielseitigen Substratspektrums von hochmolekularen aber auch einfachen Kohlenhydraten in fast allen niedrigbelasteten kommunalen Anlagen in geringer bis mäßiger Häufigkeit zu finden, besitzt jedoch nur selten einen Selektionsvorteil zu einem dominanten Wachstum. Etwas anders sieht es in industriellen Anlagen aus, in denen v.a. die Morphotypen *N. limicola* und 0092 vielfach ein Problem darstellen. In Abhängigkeit der – häufig einseitigen – Abwasserzusammensetzung besitzen sie dort offenbar Konkurrenzvorteile gegenüber anderen Organismen, wie das massenhafte Auftreten von *N. limicola*-Organismen aus der Klasse der *Actinobacteria* bei Eintrag stark zuckerhaltigen Abwassers zeigte. Auch *N. limicola*-Filamente aus der Klasse der *Alphaproteobacteria* sind fast ausschließlich in industriellen Anlagen anzutreffen.

Gezielte Maßnahmen gegen *N. limicola* sowie die Typen 0041/0675, 1851 und 0092 liegen momentan noch nicht vor. Da Typ 0041/0675 und Typ 1851 aufgrund ihres Bakterienaufwuchses sowie Typ 0092 wegen der geringen Hydrophobie seiner Zelloberfläche die Schaumschicht weniger effektiv stabilisieren als die hydrophoben nocardioformen Actinomyceten und *M. parvicella*, sind deren Schäume jedoch leichter handhabbar und können oft niedergespritzt werden (Lemmer et al. 2005). Derzeit sind die Kenntnisse zur Physiologie der vier Organismengruppen noch begrenzt. Erschwert wird dies zusätzlich durch deren noch unvollständige Klassifikation. Eine Bewertung physiologischer Eigenschaften durch Vergleich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen ist aber nur sinnvoll, wenn die gleichen Organismen beschrieben werden. Ein wichtiges Ziel für die Zukunft ist daher die Verbesserung von Qualität und Verfügbarkeit spezifischer Oligonukleotidsonden zur Detektion und Charakterisierung dieser Organismen. Darauf aufbauend sollten weitere Experimente deren bevorzugte Substrat- und Milieubedingungen in situ bestimmen. Mit Hilfe dieser Erkenntnisse können dann entsprechende Gegenmaßnahmen eingeleitet werden. Dies ist insbesondere für industrielle Anlagen, die – wie oben erwähnt – häufig von *N. limicola*- oder Typ 0092-dominierten Schaumproblemen betroffen sind, von großer Bedeutung.

Ein weiteres Interesse sollte auch dem Substrat-Pool im Belebtschlamm gelten. Untersuchungen zur Zusammensetzung der EPS-Matrix von Schaum und Belebtschlamm ergaben in einigen Fällen einen hohen Restgehalt an organisch gebundenem Gesamtkohlenstoff (TOC) (Müller 2006) und weisen auf einen Substrat-Pool neben Proteinen, Kohlenhydraten und lipophilen Substanzen hin. Hierzu könnten Hormone und Medikamente gehören, die in Form von Glucuronid-Konjugaten mit dem Urin ins Abwasser gelangen. Die deutlichen β -Glucuronidase-Aktivitäten vieler fadenbildender Schaumbakterien könnten, zumindest teilweise, auf einer Spaltung dieser Glucuronide beruhen und so das Wachstum dieser Organismen fördern. Weiterhin könnte dieser Substrat-Pool auch Zellwandkomponenten beinhalten, die durch Zellyse während des Zerfalls der Zellen in Schlammfraktionen mit einem hohen

Schlammalter zur Verfügung stehen, sowie stark adsorbierende Xenobiotika. Eine Anreicherung solcher Substanzen in Schlammfraktionen wurde z.B. für DEEDMAC (Diethylesterdimethylammoniumchlorid) mit Konzentrationen von bis zu 50 mg/kg TR (Giolando et al. 1995) oder Phthalate mit bis zu 580 mg/kg TR (Staples et al. 1997) nachgewiesen. Die Nutzung dieser Substrat-Pools soll daher in späteren Untersuchungen genauer beleuchtet werden.

E Zusammenfassung

Die Bildung von stabilen viskosen Schäumen ist seit einigen Jahren ein häufig beobachtetes Betriebsproblem von Kläranlagen nach dem Belebungsverfahren. Von diesem Phänomen sind vor allem stickstoffeliminierende Anlagen mit Nitrifikation/Denitrifikation betroffen, die zur Gewährleistung der Nitrifikation sehr niedrigbelastet gefahren werden, aber auch Anlagen mit biologischer Phosphorelimination. Die niedrige Belastung nährstoffeliminierender Kläranlagen hat zur Folge, dass die Konzentration an gelösten organischen Substanzen in der Wasserphase sehr gering ist und die Belebtschlamm Bakterien auf partikuläres oder an Oberflächen adsorbiertes Substrat angewiesen sind. Daher spielt heutzutage die Hydrolyse von partikulärem Substrat eine wesentlich größere Rolle als früher. Enzymaktivitäten, die eine Hydrolyse hochmolekularer Verbindungen katalysieren, stellen einen Selektionsvorteil für Belebtschlamm Bakterien dar und sind Grundlage für eine erfolgreiche Konkurrenz.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden extrazelluläre Enzymaktivitäten in Kläranlagen mit Schaumproblemen bestimmt, wobei neben klassischen Untersuchungen zur Gesamtaktivität von Proteasen, Lipasen und β -Glucuronidasen ein Schwerpunkt auf der in situ Bestimmung zellgebundener Enzymaktivitäten fadenbildender Bakterien lag, die bei Schaumereignissen auftreten. Es wurden die in situ Aktivitäten von Phosphatasen, Esterasen, Lipasen und β -Glucuronidasen ermittelt. Des Weiteren sollten Untersuchungen an Reinkulturen weitere Erkenntnisse zur Physiologie einiger fadenbildender Organismen liefern.

In Belebtschlämmen und Schäumen aus den beiden Belebungsbecken der zweistufigen kommunalen Kläranlage KA-M sowie den einstufigen kommunalen Anlagen KA-GR und KA-BT wurden zunächst die Fadenbildner-Populationen mittels klassischer Mikroskopie und Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH) charakterisiert. *Microthrix parvicella* konnte mit beiden Methoden zuverlässig nachgewiesen werden. Für nocardioforme Actinomyceten sowie *Nostocoida limicola* war dagegen die Anwendung der FISH-Technik aufgrund der hohen phylogenetischen Variabilität notwendig. Typ 1851 sowie *Haliscomenobacter hydroxsis* wurden mit klassischer Mikroskopie zwar eindeutig identifiziert, allerdings wurde deren Häufigkeit mit dieser Methode teilweise unterschätzt. Für den Morphotyp 0041/0675 lieferte die FISH-Technik noch keine zufriedenstellenden Ergebnisse, da die einzige derzeit verfügbare Oligonukleotidsonde auch andere fadenbildende Bakterien detektiert und darüber hinaus auch nur einen Teil der Typ 0041/0675-Organismen erfasst. Typ 0092 kann momentan aufgrund des Fehlens geeigneter Sonden nur mit klassischer Mikroskopie nachgewiesen werden.

Für Protease wurden in allen drei Anlagen hohe Gesamtaktivitäten ermittelt. Ein Vergleich mit den zugehörigen Proteingehalten ergab zwar keinen direkten Zusammenhang mit den Protease-Aktivitäten, dennoch zeigten die Werte, dass ein hohes Potential zum Proteinabbau vorhanden ist. In den meisten Fällen lag die Protease-Aktivität im Belebtschlamm deutlich höher als im Schaum. Wahrscheinlich ist die Diffusion des Substrats im Schaum aufgrund der wesentlich höheren Biomasse dort erschwert. Die Lipase-Aktivitäten lagen im Belebtschlamm der ersten Stufe der zweistufigen Anlage KA-M über den gesamten Untersuchungszeitraum signifikant höher als im Belebtschlamm der zweiten Stufe. Im Actinomyceten-dominierten Schaum des zweiten Belebungsbeckens waren die Lipase-Aktivitäten im Vergleich zur Schlammfraktion stark erhöht. In der einstufigen Anlage KA-GR dominierte *Microthrix parvicella* sowohl im Belebtschlamm als auch im Schaum. Obwohl die Fädigkeit von *M. parvi-*

cella im Schaum fast immer höher lag, wurden in der Schaumfraktion nur gleich hohe oder sogar signifikant niedrigere Aktivitäten beobachtet als im Schlamm. β -Glucuronidase-Aktivitäten wurden in allen untersuchten Schlämmen und Schäumen gemessen. Auffallend waren die um ein Vielfaches höheren Aktivitäten des Belebtschlammes der ersten Stufe der KA-M im Vergleich zur zweiten Stufe. Vermutlich wird im ersten Belebungsbecken ein Großteil der Glucuronid-Konjugate an den Schlammflocken gespalten, sodass nur noch geringe Mengen in die zweite Stufe gelangen. Die gemessenen β -Glucuronidase-Aktivitäten weisen darauf hin, dass Glucuronid-Konjugate einen Substrat-Pool für Belebtschlammorganismen darstellen.

Mit Hilfe der in situ Enzymaktivitäts-Bestimmungen von Phosphatasen, Esterasen, Lipasen und β -Glucuronidasen wurde nachgewiesen, dass die in der Wasserphase des Belebtschlammes gelöste Menge an extrazellulären Enzymen gering ist und die Aktivität hauptsächlich in den Belebtschlammflocken konzentriert ist. Ein Vergleich von klassischer Gesamtaktivitäts-Bestimmung und in situ Technik zeigte, dass für eine quantitative Beurteilung der Enzymaktivität klassische Tests besser geeignet sind, da die visuelle Abschätzung der Aktivität, wie sie im in situ Test erfolgt, feine Aktivitätsunterschiede nicht erkennen lässt und außerdem subjektiv vom jeweiligen Betrachter abhängig ist. Dafür erlaubt sie die Zuordnung von Enzymaktivitäten zu bestimmten Organismen, was mit der klassischen Methode nicht möglich ist. Eine maximale Information erhält man also durch Kombination beider Methoden. Die Zuordnung der Aktivitäten zu Belebtschlamm-Organismen erfolgte durch Überlagerung gleicher Bildausschnitte der Epifluoreszenzmikroskopie mit Phasenkontrastmikroskopie, Gram- und Neisserfärbung sowie Fluoreszenz in situ Hybridisierung.

Microthrix parvicella wies in situ Aktivitäten für Phosphatase, Esterase, Lipase und β -Glucuronidase auf, wobei die Lipase-Aktivität am höchsten lag. Die in situ Aktivitäten aller vier Enzyme waren im Belebtschlamm im Vergleich zum Schaum deutlich erhöht. Damit erklären sich auch die höheren Gesamt-Lipase-Aktivitäten der Schlammfraktion trotz geringerer Fädigkeit von *M. parvicella*. Das lässt darauf schließen, dass das Wachstum von *M. parvicella* vorwiegend im Belebtschlamm stattfindet. Daher sollten sich Bekämpfungsmaßnahmen auf diese Schlammfraktion richten. Weitere physiologische Untersuchungen an *M. parvicella*-Reinkulturen zeigten, dass deren Wachstumsoptimum bei einem pH-Wert von 8 mit der maximalen Aktivität von Lipasen bei diesem pH-Wert zusammenhängt. Rhamnolipide beschleunigten z.T. das Wachstum von *M. parvicella* und konnten auch direkt als Substrat genutzt werden.

Beim Monitoring der Lipase-Aktivität von *M. parvicella* während des Einsatzes von $AlCl_3$ als Bekämpfungsmaßnahme fand die neue in situ Technik eine praktische Anwendung. In einer halbtechnischen Versuchsanlage wurde mit klassischen Tests ein starker Rückgang der Lipase-Aktivität nach der Dosierung von $AlCl_3$ festgestellt. Nach Beendigung der Dosierung stieg diese wieder kontinuierlich an. Der in situ Test bestätigte, dass die $AlCl_3$ -Zugabe die Lipase-Aktivität von *M. parvicella* beeinträchtigt hatte, da die Filamente deutlich weniger und schwächer fluoreszierende Granula enthielten. Es zeigte sich, dass die Wirkung von $AlCl_3$ auf seinen Einsatzzeitraum beschränkt ist, da die Lipase-Aktivität von *M. parvicella* nach Beendigung der Dosierung wieder anstieg.

Verschiedene Spezies nocardioformer Actinomyceten unterschieden sich anhand ihrer Aktivitätsmuster. Während bei *Dietzia* spp. in situ keine Enzymaktivitäten nachgewiesen wurden, zeigten *Rhodococcus* spp. deutliche Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-, sowie mäßige Lipase-Aktivitäten. Diese waren im Belebtschlamm und im Schaum ähnlich hoch. Da die Populationsdichte Enzym-aktiver Actinomyceten im Schaum deutlich höher lag, finden sie vermutlich in der Schaumschicht gute Wachstumsbedingungen und tragen so zur Schaumbildung auf der Wasseroberfläche bei. Daher sollten Gegenmaßnahmen dort ansetzen.

Die in situ Enzymaktivitäten von Bakterien des Morphotyps *Nostocoida limicola* waren nur niedrig, Lipase-Aktivität wurde nicht festgestellt. Aufgrund ihrer phylogenetischen Diversität sollte die Zuordnung der Enzymaktivität mit FISH kombiniert werden. Einige der Organismen des *N. limicola*-Morphotyps aus der Klasse der *Actinobacteria* zeigten geringe bis mäßige Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-Aktivität, während für *N. limicola*-Filamente aus der Klasse der *Alphaproteobacteria* sowie des *Chloroflexi*-Phylums keine Aktivität nachgewiesen wurde. Untersuchungen an *N. limicola*-Reinkulturen bestätigten die physiologischen Unterschiede verschiedener taxonomischer Gruppen. Im Gegensatz zu Isolaten aus dem *Chloroflexi*-Phylum konnten Reinkulturen, die den *Actinobacteria* angehören, eine Vielzahl hochmolekularer und einfacher Substrate in einem Minimalmedium nutzen. Letztere zeigten des Weiteren deutlich höhere Wachstumsgeschwindigkeiten und Zellerträge und bevorzugten zudem höhere Substratkonzentrationen.

Bakterien der Morphotypen 0041/0675, 1851 und 0092 erwiesen sich ebenfalls als Phosphatase-, Esterase- und β -Glucuronidase-positiv, aber Lipase-negativ. Damit weisen diese Fadenbildner einige Gemeinsamkeiten auf. Die Aktivitätsmuster stimmen mit deren Auftreten bei Niedriglastbedingungen überein, die Organismen bevorzugen, die hochmolekulares Substrat hydrolysieren können. Im Gegensatz zu *M. parvicella* und nocardioformen Actinomyceten sind sie jedoch anscheinend nicht in der Lage, Lipide mittels Lipasen zu spalten. Deshalb lassen sich diese Morphotypen auch nicht durch Vermeidung des Eintrags lipophiler Stoffe eindämmen.

Die genaue Rolle von *N. limicola* sowie der Typen 0041/0675, 1851 und 0092 bei der Schaumbildung bleibt noch unklar. Es zeigte sich jedoch, dass diese in der Schaumfraktion der untersuchten Anlagen weder zu einem exzessiven Wachstum fähig sind, noch entscheidend zur Stabilisierung der Schaumschicht beitragen. Da die meisten dieser Morphotypen nicht vollständig taxonomisch charakterisiert sind, kann das derzeit vorhandene Wissen über deren Physiologie noch nicht für gezielte Gegenmaßnahmen eingesetzt werden. Daher ist zunächst eine Weiterentwicklung spezifischer Oligonukleotidsonden zur genaueren taxonomischen Identifizierung erforderlich, die die Basis für zukünftige Untersuchungen der bevorzugten Substrat- und Milieubedingungen dieser Organismen bildet.

F Literaturverzeichnis

- Abalos, A., Pinazo, A., Infante, M.R., Casals, M., Garcia, F., Manresa, A. (2001). Physico-chemical and antimicrobial properties of new rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10 from soybean oil refinery wastes. *Langmuir* 17(5), 1367-1371.
- 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(8), 3262-3268.
- Amann, R.I., 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(6), 1919-1925.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol. Rev.* 59(1), 143-169.
- Amann, R., Lemmer, H. (1998). Grundlagen der in situ-Analyse von Struktur und Dynamik komplexer mikrobieller Lebensgemeinschaften mit rRNS-Sonden und ihre Bedeutung für die wasserwirtschaftliche Praxis. *Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flußbiologie* 52, 11-24.
- Amann, R., Lemmer, H., Wagner, M. (1998). Monitoring the community structure of wastewater treatment plants: a comparison of old and new techniques. *FEMS Microbiol. Ecol.* 25(3), 205-215.
- 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(9), 3662-3668.
- Andreasen, K., Nielsen, P.H. (1998). In situ characterization of substrate uptake by *Microthrix parvicella* using microautoradiography. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5), 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(5), 1559-1569.
- Appeldoorn, K.J., Kortstee, G.J.J., Zehnder, A.J.B. (1992). Biological phosphate removal by activated sludge under defined conditions. *Wat. Res.* 26(4), 453-460.
- Arrage, A.A., Phelps, T.J., Benoit, R.E., White, D.C. (1993). Survival of subsurface microorganisms exposed to UV radiation and hydrogen peroxide. *Appl. Environ. Microbiol.* 59(11), 3545-3550.
- Beer, M., Seviour, E.M., Kong, Y., Cunningham, M., Blackall, L.L., Seviour, R.J. (2002). Phylogeny of the filamentous bacterium Eikelboom Type 1851, and design and application of a 16S rRNA targeted oligonucleotide probe for its fluorescence in situ identification in activated sludge. *FEMS Microbiol. Lett.* 207(2), 179-183.
- Beimfohr, C., Krause, A., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1993). In situ identification of Lactococci, Enterococci and Streptococci. *System. Appl. Microbiol.* 16(3), 450-456.
- Belfroid, A.C., Van der Horst, A., Vethaak, A.D., Schafer, A.J., Rijs, G.B.J., Wegener, J., Cofino, W.P. (1999). Analysis and occurrence of estrogenic hormones and their glucuronides in surface water and waste water in The Netherlands. *Sci. Total Environ.* 225(1-2), 101-108.
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I., Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie van Leeuwenhoek* 85(1), 1-8.

- Blackall, L.L., Harbers, A.E., Greenfield, P.F., Hayward, A.C. (1991). Foaming in activated sludge plants: A survey in Queensland, Australia and an evaluation of some control strategies. *Wat. Res.* 25(3), 313-318.
- 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. *System. Appl. Microbiol.* 17(4), 513-518.
- Blackall, L.L., Seviour, E.M., Bradford, D., Rossetti, S., Tandoi, V., Seviour, R.J. (2000). '*Candidatus Nostocoida limicola*', a filamentous bacterium from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 703-709.
- Blackbeard, J.R., Ekama, G.A., Marais, G.V.R. (1986). A survey of filamentous bulking and foaming in activated sludge plants in South Africa. *JWPCF* 85(1), 90-3.
- Boczar, B.A., Begley, W.M., Larson, R.J. (1992). Characterization of enzyme activity in activated sludge using rapid analyses for specific hydrolases. *Wat. Environ. Res.* 64(6), 792-797.
- Boczar, B.A., Forney, L.J., Begley, W.M., Larson, R.J., Federle, T.W. (2001). Characterization and distribution of esterase activity in activated sludge. *Wat. Res.* 35(17), 4208-4216.
- Bornscheuer, U.T. (2002). Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26(1), 73-81.
- Bradford, D. (1997). Molecular biological studies of filamentous bacteria associated with activated sludge bulking and foaming. Dissertation, Abteilung Mikrobiologie, Universität Queensland.
- Brady, L., Brzozowski, A.M., Derewenda, Z.S., Dodson, E., Dodson, G., Tolley, S., Turkenburg, J.P., Christiansen, L., Høge-Jensen, B., Nørskov, L., Thim, L., Menge, U. (1990). A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343(6260), 767-770.
- Brock, F.M., Forsberg, C.W., Buchanan-Smith, J.G. (1982). Proteolytic activity of rumen microorganisms and effects of proteinase inhibitors. *Appl. Environ. Microbiol.* 44(3), 561-569.
- Brumback, B.G., Wade, C.D. (1996). Simultaneous rapid culture for four respiratory viruses in the same cell monolayer using a differential multicolored fluorescent confirmatory stain. *J. Clin. Microbiol.* 34(4), 798-801.
- Bura, R., Cheung, M., Liao, B., Finlayson, J., Lee, B.C., Droppo, I.G., Leppard, G.G., Liss, S.N. (1998). Composition of extracellular polymeric substances in the activated sludge floc matrix. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5), 325-333.
- Cadoret, A., Conrad, A., Block, J.C. (2002). Availability of low and high molecular weight substrates to extracellular enzymes in whole and dispersed activated sludges. *Enz. Microb. Technol.* 31, 179-186.
- Cao, X., Štrojsová, A., Znachor, P., Zapomelová, E., Liu, G., Vrba, J., Zhou, Y. (2005). Detection of extracellular phosphatases in natural spring phytoplankton of a shallow eutrophic lake (Donghu, China). *Eur. J. Phycol.* 40(3), 251-258.
- Carr, E.L., Eales, K.L., Seviour, R.J. (2005). Substrate uptake of *Gordonia amarae* in activated sludge foams by FISH-MAR. Proceedings of the 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference on Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment, 17-20 July 2005, Surfers Paradise, Gold Coast, Queensland, 125-131.
- Casey, T.G., Wentzel, M.C., Loewenthal, R.E., Ekama, G.A., Marais, G.V.R. (1992). A hypothesis for the cause of low F/M filament bulking in nutrient removal activated sludge systems. *Wat. Res.* 26(6), 867-869.

- Catoni, E. (1999). Overexpression and protein engineering of lipase A and B from *Geotrichum candidum* CMICC335426. Dissertation, Institut für Biochemie, Universität Stuttgart.
- Chandrasekaran, E.V., BeMiller, J.N. (1980). Constituent analysis of glycosaminoglycans. *Methods Carbohydr. Chem.* 8, 89-96.
- Charton, E., Macrae, A.R. (1992). Substrate specificities of lipases A and B from *Geotrichum candidum* CMICC 335426. *Biochim. Biophys. Acta* 1123(1), 59-64.
- Chen, L., Daniel, R.M., Coolbear, T. (2003). Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *Int. Dairy J.* 13(4), 255-275.
- Chróst, R.J. (1991). Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In: Chróst, R.J. (Ed.): *Microbial enzymes in aquatic environments*. Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg, pp. 29-59.
- Chudoba, J., Grau, P., Ottova, V. (1973a). Control of activated sludge filamentous bulking. II. Selection of microorganisms by means of a selector. *Wat. Res.* 7, 1389-1406.
- Chudoba, J., Ottova, V., Madera, V. (1973b). Control of activated sludge filamentous bulking. I. Effect of the hydraulic regime or degree of mixing in an aeration tank. *Wat. Res.* 7, 1163-1182.
- Confer, D.R., Logan, B.E. (1998). Location of protein and polysaccharide hydrolytic activity in suspended and biofilm wastewater cultures. *Wat. Res.* 32(1), 31-38.
- Conrad, A., Kontro, M., Keinänen, M., Cadoret, A., Faure, P., Mansury-Huault, L., Block, J.C. (2003). Fatty acids of lipid fractions in extracellular polymeric substances of activated sludge flocs. *Lipids* 38(10), 1093-1105.
- Cox, W.G., Singer, V.L. (1999). A high-resolution, fluorescence-based method for localization of endogenous alkaline phosphatase activity. *J. Histochem. Cytochem.* 47(11), 1443-1456.
- 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(3), 438-448.
- Davenport, R.J., Curtis, T.P., Goodfellow, M., Stainsby, F.M., Bingley, M. (2000). Quantitative use of fluorescent in situ hybridization to examine relationships between mycolic acid-containing actinomycetes and foaming in activated sludge plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(3), 1158-1166.
- de los Reyes, F.L., Ritter, W., Raskin, L. (1997). Group-specific small-subunit rRNA hybridization probes to characterize filamentous foaming in activated sludge systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(3), 1107-1117.
- de los Reyes, F.L., Rothauszky, D., Raskin, L. (2002). Microbial community structures in foaming and nonfoaming full-scale wastewater treatment plants. *Water Environ. Res.* 74(5), 437-449.
- Dignac, M.-F., Urbain, V., Rybacki, D., Bruchet, A., Snidaro, D., Scribe, P. (1998). Chemical description of extracellular polymers: implication on activated sludge floc structure. *Wat. Sci. Tech.* 38(8-9), 45-53.
- Dillner Westlund, A., Hagland, E., Rothman, M. (1996). Bulking and foaming caused by *Microthrix parvicella* at three large sewage treatment plants in the greater Stockholm area. *Wat. Sci. Tech.* 34(5-6), 281-287.
- Duchene, P. (1994). Biological foams: The cause-effect relationship, test results and combat strategy. *Wat. Sci. Tech.* 29(7), 239-247.
- Dueholm, T.E., Andreasen, K.H., Nielsen, P.H. (2001). Transformation of lipids in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 43(1), 165-172.

- Dueholm, T.E., Gessesse, A., Nielsen, P.H. (2005). Determination of lipase activity in activated sludge by methylumbelliferyl labelled substrates. *Wat. Res.*, submitted.
- Eales, K., Nielsen, J.L., Kragelund, C., Seviour, R., Nielsen, P.H. (2005). The in situ physiology of pine tree like organisms (PTLO) in activated sludge foams. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 33(3), 203-209.
- Eikelboom, D.H. (1975). Filamentous organisms observed in activated sludge. *Wat. Res.* 9, 365-388.
- Eikelboom, D.H., van Buijsen, H.J.J. (1983). Microscopic sludge investigation manual. TNO report A94a, 2nd ed.
- Eikelboom, D.H. (1988). Licht-Slibhandboek. Rapport Nr. R87/358. TNO Delft, Nederlande.
- Eikelboom, D.H. (1994). The *Microthrix parvicella* puzzle. *Wat. Sci. Tech.* 29(7), 271-279.
- Eikelboom, D.H. (2000). Prozessüberwachung von Belebungsanlagen durch mikroskopische Schlammuntersuchung. ATV-DVWK, Hennef (Hrsg.), GFA.
- Eikelboom, D.H., Andreadakis, A., Andreasen, K. (1998). Survey of filamentous populations in nutrient removal plants in four European countries. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5), 281-289.
- Eliosov, B., Argaman, Y. (1995). Hydrolysis of particulate organics in activated sludge systems. *Wat. Res.* 29(1), 155-163.
- Erhart, R. (1997). In situ Analyse mikrobieller Biozönosen 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(2), 310-318.
- Fojan, P., Jonson, P.H., Petersen, M.T.N., Petersen, S.B. (2000). What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie* 82(11), 1033-1041.
- Frølund, B., Griebe, T., Nielsen, P.H. (1995). Enzymatic activity in the activated-sludge floc matrix. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43(4), 755-761.
- Frølund, B., Palmgren, R., Keiding, K., Nielsen, P.H. (1996). Extraction of extracellular polymers from activated sludge using a cation exchange resin. *Wat. Res.* 30(8), 1749-1758.
- Giolando, S.T., Rapaport, R.A., Larson, R.J., Federle, T.W., Stalmans, M., Masscheleyn, P. (1995). Environmental fate and effects of DEEDMAC: A rapidly biodegradable cationic surfactant for use in fabric softeners. *Chemosphere* 30(6), 1067-1083.
- Goel, R., Mino, T., Satoh, H., Matsuo, T. (1998). Enzyme activities under anaerobic and aerobic conditions in activated sludge sequencing batch reactor. *Wat. Res.* 32(7), 2081-2088.
- Goodfellow, M., Davenport, R., Stainsby, F.M., Curtis, T.P. (1996). Actinomycete diversity associated with foaming in activated sludge plants. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 17(3-4), 268-280.
- Goodfellow, M., Stainsby, F.M., Davenport, R., Chun, J.S., Curtis, T. (1998). Activated sludge foaming: The true extent of actinomycete diversity. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5), 511-519.
- Goodwin, J.A.S., Forster, C.F. (1985). A further examination into the composition of activated sludge surfaces in relation to their settlement characteristics. *Wat. Res.* 19(4), 527-533.
- Guellil, A., Boualam, M., Quiquampoix, H., Ginestet, P., Audic, J.M., Block, J.C. (2001). Hydrolysis of the wastewater colloidal matter by the exoenzymatic activity of activated sludge flocs. *Wat. Sci. Tech.* 43(6), 33-40.

- Haugland, R.P., Zhang, Y.-Z., Yue, S.T., Terpetschnig, E., Olson, N.A., Naleway, J.J. (1994). Enzymatic analysis using substrates that yield fluorescent precipitates. US Patent 5316906.
- Haugland, R.P., Huang, Z., Larison, K.D., Zhang, Y.-Z. (1995). Enzymatic analysis using substrates that yield fluorescent precipitates. US Patent 5443986.
- Hoffmann, M., Decho, A.W. (1999). Extracellular enzymes within microbial biofilms and the role of the extracellular polymer matrix. In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (Eds): Microbial extracellular polymeric substances. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 217-230.
- Hollibaugh, J.T., Azam, F. (1983). Microbial degradation of dissolved proteins in seawater. *Limnol. Oceanogr.* 28(6), 1104-1116.
- Hoppe, H.-G. (1983). Significance of exoenzymatic activities in the ecology of brackish water: measurements by means of methylumbelliferyl-substrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 11, 299-308.
- 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(5), 449-457.
- Hugenholtz, 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(1), 411-419.
- Ito, S., Inoue, S. (1982). Sophorolipids from *Torulopsis bombicola*: possible relation to alkane uptake. *Appl. Environ. Microbiol.* 43(6), 1278-1283.
- Itoh, S., Honda, H., Tomita, F., Suzuki, T. (1971). Rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa* grown on n-paraffin (mixture of C₁₂, C₁₃ and C₁₄ fractions). *J. Antibiotics* 24(12), 855-859.
- Janeway, C.M.L., Xu, X., Murphy, J.E., Chaidaroglou, A., Kantrowitz, E.R. (1993). Magnesium in the active site of *Escherichia coli* alkaline phosphatase is important for both structural stabilization and catalysis. *Biochemistry* 32(6), 1601-1609.
- Jaeger, K.-E., Wohlfarth, S. (1993). Bakterielle Lipasen: Biochemie, Molekulargenetik und biotechnologische Bedeutung. *Bioengineering* 9(2), 39-46.
- Jaeger, K.-E., Ransac, S., Dijkstra, B.W., Colson, C., van Heuvel, M., Misset, O. (1994). Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 15(1), 29-63.
- Jaeger, K.-E., Dijkstra, B.W., Reetz, M.T. (1999). Bacterial biocatalysts: molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* 53(1), 315-351.
- Kämpfer, P., Weltin, D., Hoffmeister, D., Dott, W. (1995). Growth requirements of filamentous bacteria isolated from bulking and scumming sludge. *Wat. Res.* 29(6), 1585-1588.
- Kanagawa, T., Kamagata, Y., Aruga, S., Kohno, T., Horn, M., Wagner, M. (2000). Phylogenetic analysis of and oligonucleotide probe development for Eikelboom Type 021N filamentous bacteria isolated from bulking activated sludge. *Appl. Environ. Microbiol.* 66(11), 5043-5052.
- Käppeli, O., Finnerty, W.R. (1979). Partition of alkane by an extracellular vesicle derived from hexadecane-grown *Acinetobacter*. *J. Bacteriol.* 140(2), 707-712.
- Kohno, T., Sei, K., Mori, K. (2002). Characterization of type 1851 organism isolated from activated sludge samples. *Wat. Sci. Tech.* 46(1-2), 111-114.
- Kragelund, C., Nielsen, J.L., Thomsen, T.R., Nielsen, P.H. (2005). Ecophysiology of the filamentous *Alphaproteobacterium Meganema perideroedes* in activated sludge. *FEMS Microbiol. Ecol.* 54(1), 111-122.

- Krhutková, O., Denis, N., Wanner, J. (2005). Screening of filamentous microorganisms in activated sludge plants. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 33(3), 270-274.
- Kroiß, H., Fenz, R., Prendl, L. (1997). Behandlung von Industrieabwasser am Beispiel der Zuckerindustrie. *Wiener Mitt.* 141, 187-217.
- Kunst, S., Helmer, C., Knoop, S. (2000). Betriebsprobleme auf Kläranlagen durch Blähschlamm, Schwimmschlamm, Schaum. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Lang, S., Trowitzsch-Kienast, W. (2002). Biotenside. B.G. Teubner Verlag Stuttgart Leipzig Wiesbaden.
- Larison, K.D., BreMiller, R., Wells, K.S., Clements, I., Haugland, R.P. (1995). Use of a new fluorogenic phosphatase substrate in immunohistochemical applications. *J. Histochem. Cytochem.* 43(1), 77-83.
- Lau, A.O., Strom, P.F., Jenkins, D. (1984a). The competitive growth of floc-forming and filamentous bacteria - a model for activated sludge bulking. *JWPCF* 56(1), 52-61.
- Lau, A.O., Strom, P.F., Jenkins, D. (1984b). Growth kinetics of *Sphaerotilus natans* and a floc former in pure and dual continuous culture. *JWPCF* 56(1), 41-51.
- Lawrence, J.R., Wolfaardt, G.M., Korber, D.R. (1994). Determination of diffusion coefficients in biofilms by confocal laser microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 60(4), 1166-1173.
- Lebek, M., Rosenwinkel, K.-H. (2002). Ergebnisse von halb- und großtechnischen Versuchen zur *Microthrix parvicella*-Bekämpfung auf der Kläranlage Köln-Langel. *Microthrix parvicella*-Tagung, Institut für Siedlungswasserwirtschaft und Abfalltechnik (ISA), Universität Hannover.
- Lemmer, H., Kroppenstedt, R.M. (1984). Chemotaxonomy and physiology of some actinomycetes isolated from scumming activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* 5(1), 124-135.
- Lemmer, H. (1985). Mikrobiologische Untersuchungen zur Bildung von Schwimmschlamm auf Kläranlagen. Dissertation Technische Universität München.
- Lemmer, H., Roth, D., Schade, M. (1994). Population density and enzyme activities of heterotrophic bacteria in sewer biofilms and activated sludge. *Wat. Res.* 28(6), 1341-1346.
- Lemmer, H. (1996). Biologische Ursachen von Schaum und Schwimmschlamm in Belebungsanlagen sowie mögliche Gegenmaßnahmen. In: Lemmer, H., Griebe, T., Flemming, H.-C. (Eds): *Ökologie der Abwasserorganismen*. Springer Verlag Heidelberg, pp. 259 - 271.
- Lemmer, H., Eikelboom, D., Kappeler, J., Klein, B., Kunst, S., Matsché, N., Popp, W., Schön, G., Wagner, F., Wolfgramm, J., Zander-Hauck, S. (1998). Blähschlamm, Schwimmschlamm und Schaum in Belebungsanlagen - Ursachen und Bekämpfung. Arbeitsbericht der ATV AG 2.6.1 "Blähschlamm, Schwimmschlamm, biologische Zusatzstoffe". *Korr. Abw.* 45, 1959-1968.
- 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.
- Lemmer, H., Müller, E., Schade, M. (2002). Scum in nutrient removal plants: the role of carbon sources in "*Microthrix parvicella*" growth. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 30(4), 207-211.
- Lemmer, H., Lind, G., Müller, E., Schade, M. (2005). Non-famous scum bacteria: biological characterization and troubleshooting. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 33(3), 197-202.
- Levantesi, C., Beimfohr, C., Geurkink, B., Rossetti, S., Thelen, K., Krooneman, J., Snaidr, J., van der Waarde, J., Tandoi, V. (2004). Filamentous *Alphaproteobacteria* associated

- with bulking in industrial wastewater treatment plants. *System. Appl. Microbiol.* 27(6), 716-727.
- Levin, G.V., Shapiro, J. (1965). Metabolic uptake of phosphorus by wastewater organisms. *JWPCF* 37, 800-821.
- Lind, G., Lemmer, H. (1998). Biologische Charakterisierung von Schäumen auf Belebungsanlagen. Teil I: Bedeutung fädiger Belebtschlamm-Bakterien. *GWF-Wasser/Abwasser* 139(1), 1-6.
- Liu, J.-R., Seviour, R.J. (2001). Design and application of oligonucleotide probes for fluorescent *in situ* identification of the filamentous bacterial morphotype *Nostocoida limicola* in activated sludge. *Environ. Microbiol.* 3(9), 551-560.
- Madoni, P., Davoli, D., Gibin, G. (2000). Survey of filamentous microorganisms from bulking and foaming activated-sludge plants in Italy. *Wat. Res.* 34(6), 1767-1772.
- 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(4), 593-600.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Vancanneyt, M., Schleifer, K.-H. (1996). Application of a suite of 16S rRNA-specific oligonucleotide probes designed to investigate bacteria of the phylum cytophaga-flavobacter-bacteroides in the natural environment. *Microbiology* 142(5), 1097-1106.
- Marxsen, J., Witzel, K.-P. (1990). Measurements of exoenzymatic activity in streambed sediments using methylumbelliferyl-substrates. *Arch. Hydrobiol. Beih.* 34, 21-28.
- McBride, M.J., Ensign, J.C. (1987). Effects of intracellular trehalose content on *Streptomyces griseus* spores. *J. Bacteriol.* 169(11), 4995-5001.
- Miksch, K., Fingerhut, U. (1990). Bestimmung der Aktivität eines Belebtschlammes als Maß für die Eliminationsleistung von Kläranlagen. *Vom Wasser* 74, 261-269.
- Mulder, E.G., Deinema, M.H. (1992). The Genus *Haliscomenobacter*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds): *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg, pp. 3688-3690.
- Müller, E., Lind, G., Lemmer, H., Wilderer, P.A. (2005). Population structure and chemical EPS analyses of activated sludge and scum. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 33(3), 189-196.
- Müller, E. (2006). Bacteria and extracellular polymeric substances in activated sludge scum formation. Dissertation Technische Universität München.
- Nam, S.W., Chun, J., Kim, S., Kim, W., Zakrzewska-Czerwinska, J., Goodfellow, M. (2003). *Tsukamurella spumae* sp. nov., a novel actinomycete associated with foaming in activated sludge plants. *System. Appl. Microbiol.* 26, 367-375.
- Nedoma, J., Štrojsová, A., Vrba, J., Komarková, J., Simek, K. (2003). Extracellular phosphatase activity of natural plankton studied with ELF97 phosphate: fluorescence quantification and labelling kinetics. *Environ. Microbiol.* 5(6), 462-472.
- Nielsen, P.H., Jahn, A., Palmgren, R. (1997). Conceptual model for production and composition of exopolymers in biofilms. *Wat. Sci. Tech.* 36(1), 11-19.
- Nielsen, P.H., Andreasen, K., Wagner, M., Blackall, L.L., Lemmer, H., Seviour, R.J. (1998). Variability of Type 021N in activated sludge as determined by *in situ* substrate uptake pattern and *in situ* hybridization with fluorescent rRNA targeted probes. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5), 423-430.
- Nielsen, P.H., Jahn, A. (1999). Extraction of EPS. In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (Eds): *Microbial extracellular polymeric substances*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 49-72.

- Nielsen, P.H., Roslev, P., Dueholm, T.E., Nielsen, J.L. (2002). *Microthrix parvicella*, a specialized lipid consumer in anaerobic-aerobic activated sludge plants. *Wat. Sci. Tech.* 46(1-2), 73-80.
- Nielsen, P.H., Kragelund, C., Nielsen, J.L., Tiro, S., Lebek, M., Rosenwinkel, K.-H., Gessesse, A. (2005). Control of *Microthrix parvicella* in activated sludge plants by dosage of polyaluminium salts: possible mechanisms. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 33(3), 255-261.
- Nowak, G., Brown, G.D. (1990). Characteristics of *Nostocoida limicola* and its activity in activated sludge suspension. *Res. J. Wat. Pollut. Control. Fed* 62(2), 137-142.
- Nybroe, O., Jorgensen, P.E., Henze, M. (1992). Enzyme activities in waste water and activated sludge. *Wat. Res.* 26(5), 579-584.
- Oberbremer, A., Müller-Hurtig, R., Wagner, F. (1990). Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 485-489.
- Obst, U., Holzapfel-Pschorn, A., Weßler, A., Wiegand-Rosinus, M. (1995). *Enzymatische Tests für die Wasseranalytik*. R. Oldenbourg Verlag München Wien.
- Ollis, D.L., Cheah, E., Cygler, M., Dijkstra, B., Frolow, F., Franken, S.M., Harel, M., Remington, S.J., Silman, I., Schrag, J. (1992). The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* 5(3), 197-211.
- Palmgren, R., Nielsen, P.H. (1996). Accumulation of DNA in the exopolymeric matrix of activated sludge and bacterial cultures. *Wat. Sci. Tech.* 34(5-6), 233-240.
- Paragas, V.B., Zhang, Y.-Z., Haugland, R.P., Singer, V.L. (1997). The ELF-97 alkaline phosphatase substrate provides a bright, photostable, fluorescent signal amplification method for FISH. *J. Histochem. Cytochem.* 45(3), 345-358.
- Paragas, V.B., Kramer, J.A., Fox, C., Haugland, R.P., Singer, V.L. (2002). The ELF-97 phosphatase substrate provides a sensitive, photostable method for labelling cytological targets. *J. Microsc.* 206(2), 106-119.
- Paris, S. (2004). *Bekämpfung von Schwimmschlamm, verursacht durch Microthrix parvicella*. Dissertation Technische Universität München.
- Pecorino, L.T., Brockes, J.P., Entwistle, A. (1996). Semi-automated positional analysis using laser scanning microscopy of cells transfected in a regenerating newt limb. *J. Histochem. Cytochem.* 44(6), 559-569.
- Phillips, C.R., Poon, Y.C. (1988). *Immobilization of cells*. Biotechnology Monographs, Vol. 5. Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York.
- Pitt, P., Jenkins, D. (1990). Causes and control of *Nocardia* in activated sludge. *Res. JWPCF* 62(2), 143-150.
- Prendl, L. (1997). Ein Beitrag zu Verständnis und Anwendung aerober Selektoren für die Blähschlammvermeidung. *Wiener Mitt.* 139.
- Pujol, R., Duchene, P., Schetrite, S., Canler, J.P. (1991). Biological foams in activated sludge plants: Characterization and situation. *Wat. Res.* 25(11), 1399-1404.
- Quéméneur, M., Marty, Y. (1994). Fatty acids and sterols in domestic wastewaters. *Wat. Res.* 28(5), 1217-1226.
- Raunkjaer, K., Hvitved-Jacobsen, T., Nielsen, P.H. (1994). Measurement of pools of protein, carbohydrate and lipid in domestic wastewater. *Wat. Res.* 28(2), 251-262.
- 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), 1-7.
- Richard, M.G., Shimizu, G.P., Jenkins, D. (1985). The growth physiology of the filamentous organism type 021N and its significance to activated sludge bulking. *JWPCF* 57(12), 1152-1162.

- Richards, S.R., Hastwell, C., Davies, M. (1984). The comparative examination of 14 activated-sludge plants using enzymatic techniques. *Wat. Pollut. Control* 83, 300-313.
- Ried, W. (1952). Formazane und Tetrazoliumsalze, ihre Synthesen und ihre Bedeutung als Reduktionsindikatoren und Vitalfarbstoffe. *Angew. Chem.* 64(14), 391-396.
- Roels, T., Dauwe, F., Van Damme, S., De Wilde, K., Roelandt, F. (2002). The influence of PAX-14 on activated sludge systems and in particular on *Microthrix parvicella*. *Wat. Sci. Tech.* 46(1-2), 487-490.
- Rogalska, E., Cudrey, C., Ferrato, F., Verger, R. (1993). Stereoselective hydrolysis of triglycerides by animal and microbial lipases. *Chirality* 5(1), 24-30.
- Roller, C., Wagner, M., Amann, R., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1994). In situ probing of Gram-positive bacteria with high DNA G+C content using 23S rRNA-targeted oligonucleotides. *Microbiology* 140(10), 2849-2858.
- 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(4), 405-410.
- Sarda, L., Desnuelle, P. (1958). Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *Biochim. Biophys. Acta* 30(3), 513-521.
- Sarfert, F., Eikelboom, D., Klein, B., Kowalsky, D., Lemmer, H., Matsché, N., Mudrack, K., Popp, W., Reinnarth, G., Wagner, F. (1988). Verhinderung und Bekämpfung von Blähschlamm und Schwimmschlamm. Arbeitsbericht der ATV-Arbeitsgruppe 2.6.1 "Blähschlamm-Bildung und -bekämpfung", *Korr. Abw.* 35, 152-164.
- Schade, M., Lemmer, H. (2002). Charakterisierung von Fadenbakterien zur Bekämpfung von Schaum in Belebungsbecken. Bayerisches Landesamt für Wasserwirtschaft, Materialien Nr. 104.
- Schade, M., Beimfohr, C., Lemmer, H. (2002). Phylogenetic and physiological characterization of a "*Nostocoida limicola*"-like organism isolated from activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 46(1-2), 91-97.
- Schade, M., Lemmer, H. (2005). Lipase activities in activated sludge and scum - comparison of new and conventional techniques. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 33(3), 210-215.
- Schmid, R.D., Verger, R. (1998). Lipasen: Grenzflächen-Enzyme mit attraktiven Anwendungen. *Angew. Chem.* 110(12), 1694-1720.
- Schuppler, M., Mertens, F., Schön, G., Göbel, U.B. (1995). Molecular characterization of nocardioform actinomycetes in activated sludge by 16S rRNA analysis. *Microbiology* 141(2), 513-521.
- Schuppler, M., Wagner, M., Schön, G., Göbel, U.B. (1998). In situ identification of nocardioform actinomycetes in activated sludge using fluorescent rRNA-targeted oligonucleotide probes. *Microbiology* 144(1), 249-259.
- Seviour, E.M., Williams, C.J., Seviour, R.J., Soddell, J.A., Lindrea, K.C. (1990). A survey of filamentous bacterial populations from foaming activated sludge plants in Eastern States of Australia. *Wat. Res.* 24, 493-498.
- Seviour, E.M., Eales, K., Izzard, L., Beer, M., Carr, E.L., Seviour, R.J. (2005). The in situ physiology of '*Nostocoida limicola*' II, a filamentous bacterial morphotype in bulking activated sludge, using fluorescence in situ hybridization (FISH) and microautoradiography (MAR). Proceedings of the 4th IWA Activated Sludge Population Dynamics Specialist Conference on Microbial Population Dynamics in Biological Wastewater Treatment, 17-20 July 2005, Surfers Paradise, Gold Coast, Queensland, 141-147.
- Singer, V.L., Paragas, V.B., Larison, K.D., Wells, K.S., Fox, C.J., Haugland, R.P. (1994). Fluorescence-based signal amplification technology. *Am. Biotechnol. Lab.* 12(11), 55-58.

- Slijkhuis, H. (1983a). *Microthrix parvicella*, a filamentous bacterium isolated from activated sludge: cultivation in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 46(4), 832-839.
- Slijkhuis, H. (1983b). The physiology of the filamentous bacterium *Microthrix parvicella*. Dissertation Landbouwhogeschool, Wageningen, Nederlande.
- Smit, J. (1934). Über die Ursachen des Aufblähens von Belebtschlamm. *Arch. f. Microbiol.* 5, 550-560.
- 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(7), 2884-2896.
- Snaidr, J., Beimfohr, C., Levantesi, C., Rossetti, S., van der Waarde, J., Geurkink, B., Eikelboom, D., Lemaitre, M., Tandoi, V. (2002). Phylogenetic analysis and in situ identification of *Nostocoida limicola*-like filamentous bacteria in activated sludge from industrial wastewater treatment plants. *Wat. Sci. Tech.* 46(1-2), 99-104.
- Soddell, J.A., Seviour, R.J. (1990). Microbiology of foaming in activated sludge plants. *J. Appl. Bact.* 69(2), 145-176.
- Soddell, J.A., Seviour, R.J., Blackall, L.L., Hugenholtz, P. (1998). New foam-forming nocardioforms found in activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5), 495-502.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov.. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47(2), 479-491.
- Stainsby, F.M., Soddell, J., Seviour, R., Upton, J., Goodfellow, M. (2002). Dispelling the "*Nocardia amarae*" myth: a phylogenetic and phenotypic study of mycolic acid-containing actinomycetes isolated from activated sludge foam. *Wat. Sci. Tech.* 46(1-2), 81-90.
- Staley, J.T., Fuerst, J.A., Giovannoni, S., Schlesner, H. (1992). The order *Planctomycetales* and the Genera *Planctomyces*, *Pirellula*, *Gemmata*, and *Isosphaera*. In: Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.-H. (Eds): *The Prokaryotes*. Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg, pp. 3710-3731.
- Staples, C.A., Peterson, D.R., Parkerton, T.F., Adams, W.J. (1997). The environmental fate of phthalate esters: A literature review. *Chemosphere* 35(4), 667-749.
- Stöcklein, W., Sztajer, H., Menge, U., Schmid, R.D. (1993). Purification and properties of a lipase from *Penicillium expansum*. *Biochim. Biophys. Acta* 1168(2), 181-189.
- Štrojsová, A., Vrba, J., Nedoma, J., Komárková, J., Znachor, P. (2003). Seasonal study of extracellular phosphatase expression in the phytoplankton of a eutrophic reservoir. *Eur. J. Phycol.* 38(4), 295-306.
- Štrojsová, A., Vrba, J. (2005). Direct detection of digestive enzymes in planktonic rotifers using enzyme-labelled fluorescence (ELF). *Mar. Freshw. Res.* 56(2), 189-195.
- Štrojsová, A., Vrba, J., Nedoma, J., Šimek, K. (2005). Extracellular phosphatase activity of freshwater phytoplankton exposed to different in situ phosphorus concentrations. *Mar. Freshw. Res.* 56(4), 417-424.
- Strunk, O., Ludwig, W. (1997). ARB software package. <http://www.biol.chemie.tu-muenchen.de/pub/ARB>.
- Tanaka, H., Matsumura, M., Veliky, I.A. (1984). Diffusion characteristics of substrates in Calcium alginate gel beads. *Biotech. Bioeng.* 26(1), 53-58.
- Tandoi, V., Rossetti, S., Blackall, L.L., Majone, M. (1998). Some physiological properties of an Italian isolate of "*Microthrix parvicella*". *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5), 1-8.
- Ternes, T.A. (1998). Occurrence of drugs in German sewage treatment plants and rivers. *Wat. Res.* 32(11), 3245-3260.

- Ternes, T.A., Stumpf, M., Mueller, J., Haberer, K., Wilken, R.-D., Servos, M. (1999a). Behavior and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - I. Investigations in Germany, Canada and Brazil. *Sci. Total Environ.* 225(1-2), 81-90.
- Ternes, T.A., Kreckel, P., Mueller, J. (1999b). Behaviour and occurrence of estrogens in municipal sewage treatment plants - II. Aerobic batch experiments with activated sludge. *Sci. Total Environ.* 225(1-2), 91-99.
- Teuber, M., Brodisch, K.E.U. (1977). Enzymatic activities of activated sludge. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 4, 185-194.
- Thomsen, T.R., Kjellerup, B.V., Nielsen, J.L., Hugenholtz, P., Nielsen, P.H. (2002). In situ studies of the phylogeny and physiology of filamentous bacteria with attached growth. *Environ. Microbiol.* 4(7), 383-391.
- Trick, I. (1982). Untersuchungen an fadenförmigen Bakterien aus Blähschlamm. Dissertation Universität Hohenheim.
- Ubukata, Y. (1998). Kinetics and fundamental mechanisms of protein removal by activated sludge: hydrolysis of peptone to amino acids is the rate-determining step. *Wat. Sci. Tech.* 38(8-9), 121-128.
- Urbain, V., Block, J.C., Manem, J. (1993). Bioflocculation in activated sludge, an analytic approach. *Wat. Res.* 27(5), 829-838.
- van Niekerk, A.M., Jenkins, D., Richard, M.G. (1987). The competitive growth of *Zoogloea ramigera* and Type 021N in activated sludge and pure culture - A model for low F/M bulking. *JWPCF* 59, 262-273.
- van Ommen Kloeke, F., Geesey, G.G. (1999). Localization and identification of populations of phosphatase-active bacterial cells associated with activated sludge flocs. *Microb. Ecol.* 38(3), 210-214.
- van Veen, W.L. (1973). Bacteriology of activated sludge, in particular the filamentous bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 39(2), 189-205.
- Verger, R. (1997). 'Interfacial activation' of lipases: facts and artifacts. *Trends Biotechnol.* 15(1), 32-38.
- Vernet, T., Ziomek, E., Recktenwald, A., Schrag, J.D., de Montigny, C., Tessier, D.C., Thomas, D.Y., Cygler, M. (1993). Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast. Probing of the enzyme active site by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 268(35), 26212-26219.
- Wagner, M., Amann, R., Kämpfer, P., Assmus, B., Hartmann, A., Hutzler, P., Springer, N., Schleifer, K.-H. (1994a). Identification and *in situ* detection of gram-negative filamentous bacteria in activated sludge. *Syst. Appl. Microbiol.* 17(3), 405-417.
- Wagner, M., Erhart, R., Manz, W., Amann, R., Lemmer, H., Wedi, D., Schleifer, K.-H. (1994b). 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(3), 792-800.
- Wagner, A.M., Cloete, E.T. (2002). 16S rRNA sequence analysis of bacteria present in foaming activated sludge. *System. Appl. Microbiol.* 25, 434-439.
- Wanner, J., Ruzicková, I., Jetmarová, P., Krhutková, O., Paraniaková, J. (1998). A national survey of activated sludge separation problems in the Czech Republic: Filaments, floc characteristics and activated sludge metabolic properties. *Wat. Sci. Tech.* 37(4-5), 271-279.
- Warnecke, F., Sommaruga, R., Sekar, R., Hofer, J.S., Pernthaler, J. (2005). Abundances, identity, and growth state of Actinobacteria in mountain lakes of different UV transparency. *Appl. Environ. Microbiol.* 71(9), 5551-5559.

-
- Wetzel, R.G. (1991). Extracellular enzymatic interactions: storage, redistribution, and inter-specific communication. In: Chróst, R.J. (Ed.): Microbial enzymes in aquatic environments. Springer-Verlag, New York Berlin Heidelberg, pp. 6-28.
- Wilen, B.-M., Jin, B., Lant, P. (2003). The influence of key chemical constituents in activated sludge on surface and flocculating properties. *Wat. Res.* 37(9), 2127-2139.
- Williams, T.M., Unz, R.F. (1985a). Isolation and characterization of filamentous bacteria present in bulking activated sludge. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22, 273-282.
- Williams, T.M., Unz, R.F. (1985b). Filamentous sulfur bacteria of activated sludge: characterization of *Thiothrix*, *Beggiatoa*, and Eikelboom type 021N strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 49(4), 887-898.
- Williams, T.M., Unz, R.F. (1989). The nutrition of *Thiothrix*, type 021N, *Beggiatoa* and *Leucothrix* strains. *Wat. Res.* 23(1), 15-22.
- Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (1999). What are bacterial extracellular polymeric substances? In: Wingender, J., Neu, T.R., Flemming, H.-C. (Eds): Microbial extracellular polymeric substances. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, pp. 1-19.
- Zhang, Y., Miller, R.M. (1992). Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* 58(10), 3276-3282.

G Anhang**1 rRNS-gerichtete Oligonukleotidsonden**

Oligonukleotid-sonde	rRNA Position	Sequenz (5'-3')	Referenz
EUB338	16S rRNS 338-355	GCTGCCTCCCGTAGGAGT	Amann et al. 1990
EUB338-II	16S rRNS 338-355	GCAGCCACCCGTAGGTGT	Daims et al. 1999
EUB338-III	16S rRNS 338-355	GCTGCCACCCGTAGGTGT	Daims et al. 1999
HGC1156	16S rRNS 1156-1173	CGAGTTGACCCCGGCAGT	Erhart 1997
HGC96a	23S rRNS 1901-1918	TATAGTTACCACCGCCGT	Roller et al. 1994
MPA60	16S rRNS 60-77	GGATGGCCGCGTTCGACT	Erhart et al. 1997
MPA223	16S rRNS 223-240	GCCGCGAGACCCTCCTAG	Erhart et al. 1997
MPA645	16S rRNS 645-661	CCGACTCTAGTCAGAGC	Erhart et al. 1997
Myc657	16S rRNS 657-672	AGTCTCCCCTGYAGTA	Davenport et al. 2000
DIE 993	16S rRNA 993-1010	CCGTCGTCCTGTATATGT	Müller 2006
RHOa429	16S rRNS 429-446	CGGAGCTGAAAGGAGTTT	Müller 2006
RHO b183	16S rRNA 183-200	ACCACGAAACATGCATCC	Müller 2006
R.ery619	16S rRNS 619-636	CCTGCAAGCCAGCAGTTG	Müller 2006)
NLIMI 91	16S rRNS 91-108	CGCCACTATCTTCTCAGT	Liu und Seviour 2001
NLII65	16S rRNS 65-83	CAAGCTCCTCGTCACCGTT	Bradford 1997
NLIMII 175	16S rRNS 175-192	GGCTCCGTCTCGTATCCG	Liu und Seviour 2001
AHW183	16S rRNS 183-200	CCGACACTACCCACTCGT	Schade et al. 2002
Noli-644	16S rRNS 644-660	TCCGGTCTCCAGCCACA	Snaidr et al. 2002
PPx3-1428	16S rRNS 1428-1447	TGGCCCACCGGCTTCGGG	Levantesi et al. 2004
MC2-649	16S rRNS 649-667	CTCTCCCGGACTCGAGCC	Snaidr et al. 2002
			Levantesi et al. 2004
NLIMIII 301	16S rRNS 301-318	CCCAGTGTGCCGGGCCAC	Liu und Seviour 2001
TM7905	16S rRNS 905-926	CCGTCAATTCCTTTATGTTTTA	Hugenholtz et al. 2001
TM7305	16S rRNS 305-322	GTCCCAGTCTGGCTGATC	Hugenholtz et al. 2001
CHL 1851	16S rRNS 592-612	AATTCACGAACCTCTGCCA	Beer et al. 2002
0092-997	16S rRNS 997-1018	ATTTCTAAATCTGTCGAATCCC	Bradford 1997
CF319a	16S rRNS 319-336	TGGTCCGTGTCTCAGTAC	Manz et al. 1996
ACA23a	16S rRNS 652-669	ATCCTCTCCATACTCTA	Wagner et al. 1994b
HHY	16S rRNS 655-672	GCCTACCTCAACCTGATT	Wagner et al. 1994a
TNI	16S rRNS 652-669	CTCCTCTCCACATTCTA	Wagner et al. 1994a
21N	16S rRNS 652-669	TCCCTCTCCCAAATTCTA	Wagner et al. 1994a
G123T	16S rRNS 697-714	CCTTCCGATCTCTATGCA	Kanagawa et al. 2000
SNA	16S rRNS 656-673	CATCCCCCTCTACCGTAC	Wagner et al. 1994a

2 Abkürzungen

A	Adenin
aqua dest.	destilliertes Wasser
BB1	Belebungsbecken 1
BB2	Belebungsbecken 2
BSB ₅	Biochemischer Sauerstoffbedarf (innerhalb von 5 Tagen)
B _{TS}	Schlammbelastung
C	Cytosin
CSB	Chemischer Sauerstoffbedarf
Cy3	Indocarbocyanin
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenyl-indol-dihydrochlorid
DEEDMAC	Diethylesterdimethylammoniumchlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Denitrifikation
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EBPR	enhanced biological phosphorus removal
EC	Enzym-Klassifizierungsnummer
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELF	enzyme labeled fluorescence
EPS	extrazelluläre polymere Substanzen
EW	Einwohnerwerte
FI	Fädigkeitsindex
FLUOS	5(6)-Carboxyfluorescein-N-hydroxysuccinimidester
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
G	Guanin
GALO	<i>Gordonia amarae</i> -Like Organisms
GC/MS	Gaschromatografie/Massenspektrometrie
ISV	Schlammvolumenindex
KA	Kläranlage
KM	Klassische Mikroskopie
LKFS	langkettige Fettsäuren
MAR	Mikroautoradiografie
MUF	Methylumbelliferyl
MUFon	Methylumbelliferon
N	Nitrifikation
NC-IUBMB	Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology
rDNS	ribosomale Desoxyribonukleinsäure

rRNS	ribosomale Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
oTR	organischer Trockenrückstand
PAX	Polyaluminiumchlorid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PHA	Polyhydroxyalkanoat
Phako	Phasenkontrast
PTLO	Pine Tree-Like Organisms
SDS	Natriumdodecylsulfat
T	Thymin
TOC	total organic carbon (organisch gebundener Gesamtkohlenstoff)
TR	Trockenrückstand
TS	Trockensubstanz
Trp	Tryptophan
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tris/HCl	Tris(hydroxymethyl)aminomethanhydrochlorid
UpM	Umdrehungen pro Minute

H Publikationsliste

- Lemmer, H., Roth, D., **Schade, M.** (1994). Population density and enzyme activities of heterotrophic bacteria in sewer biofilms and activated sludge. *Wat. Res.* 28, 1341-1346.
- Lemmer, H., Lind, G., **Schade, M.** (1994). Bewertung biologischer Parameter zur Beurteilung der Leistungsfähigkeit von Belebtschlammökosystemen. *Korr. Abw.* 41, 1580-1584.
- Lemmer, H., Lind, G., **Schade, M.**, Ziegelmayer, B. (1998). Biologische Charakterisierung von Schäumen in Belebungsanlagen. II. Bedeutung nicht-fädiger Belebtschlamm Bakterien. *GWF Wasser-Abwasser* 139 (2) 80-84.
- Lemmer, H., Lind, G., Metzner, G., Nitschke, L., **Schade, M.** (1998). Vitamin addition in biological wastewater treatment. *Wat. Sci. Tech.* 37 (4-5), 395-398.
- Lemmer, H., Lind, G., **Schade, M.**, Ziegelmayer, B. (1998). Autecology of scum producing bacteria. *Wat. Sci. Tech.* 37 (4-5), 527-530.
- Lemmer, H., Lind, G., Müller, E., **Schade, M.**, Ziegelmayer, B. (2000). Scum in activated sludge plants: Impact of non-filamentous and filamentous bacteria. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 28 (1), 34-40.
- Lemmer, H., Müller, E., **Schade, M.** (2002). Scum in nutrient removal plants: the role of carbon sources in "Microthrix parvicella" growth. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 30 (4), 207-211.
- Lemmer, H., **Schade, M.** (2003). Charakterisierung von Fadenbakterien zur Schaumbekämpfung in Belebungsanlagen. *Korr. Abw.* 50 (9), 1152-1156.
- Lemmer, H., Lind, G., Müller, E., **Schade, M.** (2005). Non-famous scum bacteria: biological characterization and troubleshooting. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 33 (3), 197-202.
- Lind, G., **Schade, M.**, Metzner, G., Lemmer, H. (1994). Vitamineinsatz bei der biologischen Abwasserreinigung. I. Bedürftigkeit der heterotrophen Saprophytenflora kommunaler und industrieller Belebtschlämme für Vitamine des B-Komplexes sowie deren Einfluß auf Enzymaktivitäten und Abbauverhalten. *GWF Wasser-Abwasser* 135, 595-600.
- Müller, E., **Schade, M.**, Lemmer, H.: Filamentous scum bacteria in activated sludge plants: detection and identification quality by conventional sludge microscopy vs. fluorescence in situ hybridisation. *Water Environ. Research*, im Druck.
- Popp, W., Fenn, B., Roth, D., **Schade, M.** (1996). Microbiological investigations in wastewater disinfection by UV irradiation. *Forum Städte-Hygiene* 47, 250-257.
- Schade, M.**, Lemmer, H. (1994). Counting bacteria of selected metabolic groups in activated sludge. An assessment of methods. *Wat. Sci. Tech.* 29, 75-79.
- Schade, M.**, Lemmer, H. (2001). Schaumbildung in Kläranlagen: Haben moderne Tenside mittelbar Einfluss? *Münchener Beiträge zur Abwasser-, Fischerei- und Flussbiologie*, 54, 337-360.
- Schade, M.**, Beimfohr, C., Lemmer, H. (2002). Phylogenetic and physiological characterization of a "*Nostocoida limicola*"-like organism isolated from activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* 46 (1-2), 91-97.
- Schade, M.**, Lemmer, H. (2005). Schaumbekämpfung in Belebungsanlagen: Monitoring der Lipase-Aktivität zur Erfolgskontrolle. *Korr. Abw.* 52 (5), 572-578.

Schade, M., Lemmer, H. (2005). Lipase activities in activated sludge and scum – comparison of new and conventional techniques. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.*, 33 (3), 210-215.

Schade; M., Lemmer, H. (2006). In situ enzyme activities of filamentous scum bacteria in municipal activated sludge wastewater treatment plants. *Acta Hydrochim. Hydrobiol.* 34, 480-490.