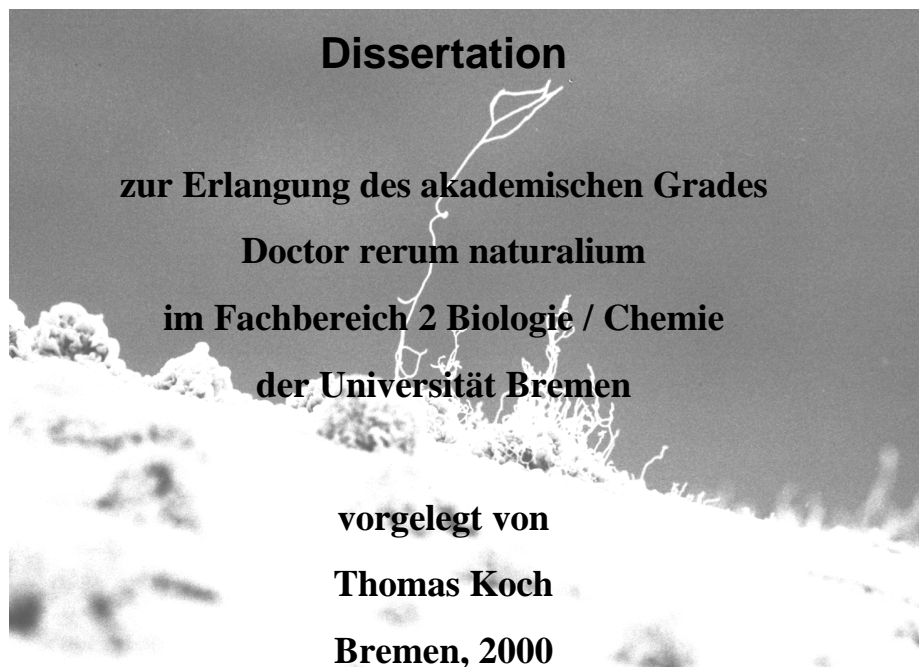


Bakterielle Besiedlungsmuster unter Huminstoff-Einfluss in Grundwasser- Simulationsfiltern



1. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Nehrkorn
2. Gutachter: Dr. Rainer Söller

**Bakterielle Besiedlungsmuster unter Huminstoff-Einfluss in
Grundwasser-Simulationsfiltern**

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor rerum naturalium
im Fachbereich 2 Biologie / Chemie der Universität Bremen

vorgelegt von Thomas Koch

Mündliche Prüfung am 22. 6. 2000, Universität Bremen, UFT Raum 1790

1. Gutachter: Prof. Dr. Alexander Nehrkorn
2. Gutachter: Dr. Rainer Söller
1. Prüfer: Prof. Dr. K. Schauz
2. Prüfer: PD Dr. R. Holländer

I. Inhaltsverzeichnis	
II Abkürzungsverzeichnis	
III Verzeichnis der Abbildungen	
IV Verzeichnis der Tabellen	

I. Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Huminstoffe	1
1.2 Grundwasser	4
1.3 Grundwasserbesiedlung	5
1.4 Fragestellung	6
2. Material und Methoden	8
2.1 Versuchsaufbau	8
2.2 Physikalisch/chemische Untersuchungen	10
2.2.1 pH-Wert	10
2.2.2 Leitfähigkeit	10
2.2.3 DOC-Messung	11
2.2.4 LC-DOC-Messung	11
2.2.5 BDOC-Bestimmung	11
2.2.6 Säurehydrolyse der Huminstoffe	12
2.2.7 Pyrolyse-FIMS der Huminstoffe	12
2.3 Mikrobiologische Untersuchungen	12
2.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE)	13
2.3.2 Gesamtzellzahl-Bestimmung mit Acridinorange	13
2.3.3 MPN-Bestimmung	14
2.3.4 Isolierung der Reinkulturen, Stammhaltung	14
2.3.5 Kolonie- und zellmorphologische Bestimmung	15
2.3.6 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Isolate	15
2.3.7 Clusteranalyse	15
2.4. Chemotaxonomische Charakterisierung	16
2.4.1 Extraktion der Membranlipide	16
2.4.2 Gaschromatographie	18

2.5 Molekularbiologische Methoden	18
2.5.1 16S rDNA-PCR	19
2.5.2 DGGE der PCR-Produkte	20
2.5.3 Sequenzanalyse der PCR-Produkte	20
2.6. Rasterelektronenmikroskopie	21
2.6.1 Präparationsmethoden	21
2.6.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	21
3. Ergebnisse	22
3.1 Messwerte des Grundwassers	22
3.2 Physikalisch/chemische Untersuchungen	23
3.2.1 pH-Wert	23
3.2.2 Leitfähigkeit	23
3.2.3 DOC-Messung	24
3.2.4 LC-DOC-Messung	25
3.2.5 BDOC-Bestimmung	26
3.2.6 Säurehydrolyse der Huminstoffe	27
3.2.7 Pyrolyse-FIMS der Huminstoffe	28
3.3 Mikrobiologische Untersuchungen	31
3.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE)	31
3.3.2 Gesamtzellzahl-Bestimmung mit Acridinorange	32
3.3.3 MPN-Bestimmung	33
3.3.4 Isolierung der Reinkulturen, Stammhaltung	34
3.3.5 Kolonie- und zellmorphologische Bestimmung	34
3.3.6 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Isolate	35
3.3.7 Clusteranalyse	39
3.4 Chemotaxonomische Charakterisierung	44
3.4.1 Extraktion der Membranlipide	44
3.4.2 Gaschromatographie	45

3.5 Molekularbiologische Methoden	48
3.5.1 16S rDNA-PCR	48
3.5.2 DGGE der PCR-Produkte	48
3.5.3 Sequenzanalyse der PCR-Produkte	49
3.6. Rasterelektronenmikroskopie	50
3.6.1 Präparationsmethoden	50
3.6.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen	50
4. Diskussion	54
4.1 Methodendiskussion	54
4.1.1 Physikalisch/chemische Untersuchung	54
4.1.2 Mikrobiologische Untersuchungen	55
4.1.3 Chemotaxonomische Charakterisierung	58
4.1.4. Molekularbiologische Methoden	59
4.1.5 Rasterelektronenmikroskopie	60
4.2 Ergebnisdiskussion	60
4.2.1 Physikalisch/chemische Untersuchung	60
4.2.1.1 pH-Wert	60
4.2.1.2 Leitfähigkeit	61
4.2.1.3 DOC-Messung	61
4.2.1.4 LC-DOC-Messung	62
4.2.1.5 BDOC-Bestimmung	65
4.2.1.6 Säurehydrolyse der Huminstoffe	65
4.2.1.7 Pyrolyse-FIMS der Huminstoffe	67
4.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen	68
4.2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE)	68
4.2.2.2 Gesamtzellzahl-Bestimmung mit Acridinorange	69
4.2.2.3 Kolonie- und zellmorphologische Bestimmung	70
4.2.2.4 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Isolate	71
4.2.2.5 Clusteranalyse	75

4.2.3 Chemotaxonomische Charakterisierung.....	77
4.2.4. Molekularbiologische Methoden.....	78
4.2.4.1 DGGE der PCR-Produkte.....	78
4.2.4.2 Sequenzanalyse der PCR-Produkte.....	79
4.2.5 Rasterelektronenmikroskopie.....	82
5. Zusammenfassung.....	83
6. Literaturverzeichnis.....	86
7. Anhang.....	94

II Abkürzungsverzeichnis

∅	Durchmesser bzw. Mittelwert
°C	Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µS	Mikrosiemens
A/T	Adenin / Thymin
AO	Acridinorange
AODC	Acridinorange direct counts
AS	Aminosäuren
AS-C	Aminosäuren-Kohlenstoff
BDOC	Biologisch verfügbarer gelöster organischer Kohlenstoff
BP	Band Pass
bp	Basen Paare
BRD	Bundesrepublik Deutschland
cDOC	Chromatographierbarer gelöster organischer Kohlenstoff
CLSM	Confocal Laser Scanning Microscopy
cm	Zentimeter
d	Tag
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DGGE	Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese
DIN	Deutsche Industrie Norm
DOC	Gelöster organischer Kohlenstoff
DVC	Direct viable counts
FA	Fulvinsäuren
FAME	Fettsäuremethylester
FT	Farbteiler
g	Gramm bzw. Erdbeschleunigung
GC	Gaschromatograph
G/C	Guanin / Cytosin
GW	Grundwasser
GZZ	Gesamtzellzahl
h	Stunde
HA	Huminsäuren
HIC	Hydrophobic Interaction Chromatography
HOC	Hydrophober organischer Kohlenstoff
HS	Huminstoffe
IC	Ion Interaction Chromatographie
KBE	Koloniebildende Einheiten
kg	Kilogramm
KH	Kohlenhydrate
KH-C	Kohlenhydrat-Kohlenstoff
kPa	Kilopascal
kV	Kilovolt
l	Liter
LC-DOC	Flüssigchromatographie-organischer-Kohlenstoff-Detektion
LF	Leitfähigkeit
log	Dekadischer Logarithmus

m/z	Masse / Ladungszahl
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Millimeter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mmol	Millimolar
MO	Mikroorganismen
Mon.	Monat
MPN	Most Probable Number
MW	Molekulargewicht
n.d.	nicht detektiert
nm	Nanometer
PC	Personalcomputer
PCR	Polymerase Chain Reaction
Py-FIMS	Pyrolyse-Feldionisation Massenspektrometrie
rDNA	Ribosomale DNA
RDP	Ribosomal Database Project
rRNA	Ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SEC	Size-Exclusion Chromatography
sec	Sekunde
SH	Säurehydrolyse
SP	Sperrfilter
t	Messzeitpunkt
TGGE	Temperatur Gradienten Gelelektrophorese
TII	Total Ionen Intensität
T _m	Schmelzpunkt
TOC	Gesamter organischer Kohlenstoff
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V	Volt
VBNC	Viable but non culturable
VM	Verdampfbare Masse
W	Watt

Bezeichnungen der Proben:

OP:	Original Grundwasser
HAA:	Reaktor H, Aufwuchs, 6 Monate Inkubation
HLA:	Reaktor H, aquatische Phase, 6 Monate Inkubation
KAA:	Reaktor K, Aufwuchs, 6 Monate Inkubation
KLA:	Reaktor K, aquatische Phase, 6 Monate Inkubation
HAB:	Reaktor H, Aufwuchs, 12 Monate Inkubation
HLB:	Reaktor H, aquatische Phase, 12 Monate Inkubation
KAB:	Reaktor K, Aufwuchs, 12 Monate Inkubation
KLB:	Reaktor K, aquatische Phase, 12 Monate Inkubation
HAC:	Reaktor H, Aufwuchs, 18 Monate Inkubation
HLC:	Reaktor H, aquatische Phase, 18 Monate Inkubation
KAC:	Reaktor K, Aufwuchs, 18 Monate Inkubation
KLC:	Reaktor K, aquatische Phase, 18 Monate Inkubation

III Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 1.1:	Modell der makromolekularen Struktur einer Huminstoff-Matrix aquatischen Ursprungs (aus Norwood, 1988).....	3
Abb. 2.1:	Aufbau der Vorversuchsanlage.....	8
Abb. 2.1.b:	Aufbau des Rührkesselfermenters.....	10
Abb.3.2.1:	Verlauf des pH-Wertes in der wässrigen Phase der Reaktoren während der Inkubationszeit. KL = Reaktor K, aquatische Phase, HL = Reaktor H, aquatische Phase.....	23
Abb. 3.2.2:	Verlauf der Leitfähigkeit (LF) in der wässrigen Phase der Reaktoren während der Inkubationszeit. KL = Reaktor K, aquatische Phase, HL = Reaktor H, aquatische Phase.....	24
Abb. 3.2.3:	Verlauf des DOC der wässrigen Phase in den Reaktoren während der Inkubationszeit. KL = Reaktor K, aquatische Phase, HL = Reaktor H, aquatische Phase.....	24
Abb. 3.2.5:	Prozentuale Änderungen (d) des DOC und der Gesamtzellzahlen in den BDOC Untersuchungen nach 14 Tagen Inkubation. Die Angaben in mg/l geben die Startkonzentration an HS in den Ansätzen wider.....	27
Abb. 3.2.6:	Relative Aminosäuren- und Kohlenhydrat-Kohlenstoffanteile (AS-C bzw. KH-C) der aquatischen Phase aus Reaktor H, dargestellt in % DOC, sowie der zeitliche Verlauf des DOC im Reaktor H.....	28
Abb. 3.2.7:	Py-FIMS Chromatogramme und Thermogramme der Proben aus Reaktor H. Von oben nach unten: 0, 6, 18, 24 Monate Inkubation.....	29
Abb. 3.3.1:	Verlauf der Lebendzellzahlen (Koloniebildende Einheiten KBE) der aquatischen Phase /ml und des Aufwuchses /cm ² im Verlauf der Inkubation. KA = Reaktor K, Aufwuchs, HA = Reaktor H, Aufwuchs, KL = Reaktor K, aquatische Phase, HL = Reaktor H, aquatische Phase.	31
Abb. 3.3.2:	Logarithmische Darstellung der Gesamtzellzahl (GZZ) der aquatischen Phase in den Reaktoren, im Verlauf der Inkubation. KL = Reaktor K, aquatische Phase, HL = Reaktor H, aquatische Phase.....	32
Abb. 3.3.6a:	Verwertungsspektrum der Gemeinschaften HL.....	36
Abb. 3.3.6b:	Verwertungsspektrum der Gemeinschaften HA.....	36
Abb. 3.3.6c:	Verwertungsspektrum der Gemeinschaften KL.....	36
Abb. 3.3.6d:	Verwertungsspektrum der Gemeinschaften KA.....	36
Abb.3.3.6e:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate OP. Mittelwert: 35,9.....	37
Abb.3.3.6f:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate HLA. Mittelwert: 18,9.....	37
Abb.3.3.6g:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate HLB. Mittelwert: 18,7.....	37
Abb.3.3.6h:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate HLC. Mittelwert: 25,4.....	37
Abb.3.3.6i:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate HAA. Mittelwert: 17,6.....	37
Abb.3.3.6j:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate HAB. Mittelwert: 18,8.....	37
Abb.3.3.6k:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate HAC. Mittelwert: 18,5.....	37
Abb.3.3.6l:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate KLA. Mittelwert: 28,4.....	37
Abb.3.3.6m:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate KLB. Mittelwert: 23,9.....	38
Abb.3.3.6n:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate KLC. Mittelwert: 21,3.....	38
Abb.3.3.6o:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate KAA. Mittelwert: 23,2.....	38
Abb.3.3.6p:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate KAB. Mittelwert: 21,8.....	38
Abb.3.3.6q:	<i>In vitro</i> Aktivitäten der Isolate KAC. Mittelwert: 17,2.....	38

Abb. 3.3.7a:	Diversitätsverlauf, dargestellt in relativen Einheiten, errechnet aus Clustergröße, -anzahl und Stammanzahl. HL = aquatische Gemeinsch. Reaktor H, HA = Aufwuchs Reaktor H, KL = aquatische Gemeinsch. Reaktor K, KA = Aufwuchs Reaktor K.	39
Abb. 3.3.7b:	Dendrogramm der Gemeinschaft HAA, Cluster sind gelb unterlegt.	41
Abb. 3.3.7c:	Dendrogramm der Gemeinschaft KAA, Cluster sind gelb unterlegt.	42
Abb. 3.3.7d:	Dendrogramm des Standortes HAA, die Gattungszuordnungen beruhen auf den Daten 3.3.5 und 3.3.6.	43
Abb. 3.3.7e:	Dendrogramm des Standortes KAA, die Gattungszuordnungen beruhen auf den Daten 3.3.5 und 3.3.6.	44
Abb. 3.4.2a:	Verteilung der Fettsäureklassen der Isolate HAA.	46
Abb. 3.4.2b:	Verteilung der Fettsäureklassen der Isolate KAA.	46
Abb. 3.4.2c:	Dendrogramme der Gemeinschaften HAA und KAA, berechnet aus der Verteilung der detektierten Fettsäuren. Farblich dargestellt die Zuordnung der Isolate zu den, aus den Daten 3.3.5 und 3.3.6 ermittelten Gattungen.	47
Abb. 3.5.1:	Agarosegel der PCR-Amplifikate der Stämme HAA 54, 55, 56, 59, 60. Bandennr. 1: neg. Kontrolle; 2: pos. Kontrolle, 3-5: HAA 54; 6: 100bp-Leiter; 7-9: HAA 55; 10-12: HAA 65; 13: 100bp-Leiter; 14-16: HAA 59; 17-19: HAA 60.	48
Abb. 3.5.2a:	DGGE Auftrennung der PCR-Fragmente HAA. Bandenbez.: Stammnr. HAA = a:4; b:6; c:11; d:15; e:16; f:18; g:19; h:23; i:24; j:28; k:34; l:38; m:43; n:47; o:48; p:56; q:59; r:60.	48
Abb. 3.5.2b:	DGGE Auftrennung der Gesamtaufschlüsse nach 24 Monaten Inkubation. Bandennr. 1+14 : HAA16; 2-4 : HA ; 5-7 : HL ; 8-10 : KA ; 11-13 : KL . Die Pfeile weisen auf die dominanten Banden.	49
Abb. 3.6.2a:	Stäbchenbakterien auf Biofilm aufliegend, Reaktor K, 3 Monate Inkubation. Fixierung mit Glutardialdehyd / Ruthenium-Rot, Entwässerung mit Ethanolreihe, Lufttrocknung aus 100% EtOH. Vergrößerung 9.900fach.	51
Abb. 3.6.2b:	Biofilmoberfläche Reaktor H, 3 Monate Inkubation, es sind keine deutlichen bakteriellen Strukturen zu erkennen. Fixierung mit Glutardialdehyd / Ruthenium-Rot, Entwässerung mit Ethanolreihe, Lufttrocknung aus 100% EtOH. Vergrößerung 2.430fach.	51
Abb. 3.6.2c:	Aus dem Biofilm herausragendes Actinomycetenmycel, Reaktor H, 6 Monate Inkubation. Keine Fixierung, Gefriertrocknung, Vergrößerung 2.000fach.	52
Abb. 3.6.2d:	Kettenbildende stäbchenförmige Bakterien auf der Glaskugeloberfläche, Reaktor H, 9 Monate Inkubation. Fixierung mit Glutardialdehyd / Ruthenium-Rot, Entwässerung mit Ethanolreihe, Lufttrocknung aus 100% EtOH. Vergrößerung 1.580fach.	52
Abb. 3.6.2e:	Kettenbildende stäbchenförmige Bakterien auf dem Biofilm aufliegend, spiralig gewundene Organismen vermutlich der Gattung <i>Seliberia</i> , Reaktor K, 12 Monate Inkubation. Keine Fixierung, Gefriertrocknung. Vergrößerung 5.000fach.	53
Abb. 3.6.2f:	Spiralig gewundenes Bakterium, vermutlich der Gattung <i>Seliberia</i> , Reaktor H, 12 Monate Inkubation. Fixierung mit Glutardialdehyd / Ruthenium-Rot, Entwässerung mit Ethanolreihe, Lufttrocknung aus 100% EtOH. Vergrößerung 27.800fach.	53
Abb. 4.2.1.4:	Zeitlicher Verlauf der Aminosäure- bzw. Proteinanteile am DOC von Reaktor H, gemessen mit Säurehydrolyse (SH), Pyrolyse-FIMS (MS) und LC-DOC.	64

Abb. A 4.2.2.5a: Dendrogramm der Gattung <i>Bacillus</i> aus dem GW und KAA. Als Datengrundlage wurden die kolonie- und zellmorphologischen Eigenschaften benutzt.	110
Abb. A 4.2.2.5b: Dendrogramm der Gattung <i>Bacillus</i> aus dem GW und KAA. Als Datengrundlage wurden die physiologischen Leistungen herangezogen.	110
Abb. A 4.2.3: Verteilung der Fettsäureklassen in den Isolaten der Gattung <i>Bacillus</i>	111

IV Verzeichnis der Tabellen

Tab. 1.1.a:	Elementverteilung in HS, ermittelt in einem Labor-Ringversuch, mit drei HS unterschiedlichen Ursprungs (nach Huffmann und Stuber, 1985).	2
Tab. 1.1.b:	Vorkommen und Herkunft funktioneller Gruppen bei Huminstoffen (verändert nach Ziechmann, 1980).	2
Tab. 2.5.1:	Sequenzen der verwendeten Primer und GC-Klammer, sowie ihre Position im Genom der 16S rRNA von <i>E. coli</i> (Brosius et al., 1981).	20
Tab. 3.1:	Physikalisch/chemische und mikrobiologische Daten des Grundwassers aus Brunnen 14 des Wasserwerks Bremen Blumenthal, Probenahme 5.12.1995.	22
Tab. 3.2.4:	Verteilung der einzelnen, mit Hilfe der LC-DOC-Analytik detektierbaren, Fraktionen in den Reaktorlösungen resp. dem Grundwasser und HS DFG 1/2.	25
Tab 3.2.7:	Anteil verflüchtigtes Material (VM) und Änderung der Substanzklassen 1-10 in % Total Ionen Intensität (TII). In Klammern prozentuale Änderung zu t = 0 Mon. = 100 % in der Py-FIMS.	30
Tab. 3.3.3:	Log der Zellzahlen der physiologischen Gruppen.	33
Tab. 4.2.1.4:	Verteilung der mittels LC-DOC-Messungen bestimmten Fraktionen im Rührkesselfermenter.	64
Tab. A 2.3.5:	Zell- und kolonimorphologische Eigenschaften die bei den Isolaten überprüft wurden. Jedes Kriterium wurde entweder als vorhanden oder nicht vorhanden gewertet.	94
Tab. A 2.5.1:	Zusammensetzung der PCR-Lsg.	97
Tab. A 3.1:	Datenblatt des verwendeten Grundwassers, die Analysen wurden von den Stadtwerken Bremen durchgeführt.	98
Tab. A 3.2.6:	Anteil der einzelnen, mit Säurehydrolyse detektierbaren, Kohlenhydrate und Aminosäuren in den Reaktorlösungen, in $\mu\text{g C} / \text{mg DOC}$. Angaben für t in Monaten.	99
Tab. A 3.3.5:	Zellmorphologische Eigenschaften der Isolate, Angaben in %, n entspricht 100%.	100
Tab. A 3.3.6:	Prozentuale Anteile der Substratverwertung der isolierten Gemeinschaften, Angaben in %.	101
Tab. A 3.3.7:	Clusterverteilung der Isolate, Ähnlichkeitsquotient für die Bildung eines Clusters $\geq 90\%$, für FAME HAA und KAA $\geq 85\%$	106
Tab. A 3.4.2:	Verteilung der einzelnen Fettsäuren der Isolate HAA.	107
Tab. A 3.4.2:	Verteilung der einzelnen Fettsäuren der Isolate KAA.	108
Tab. A 4.2.2:	Substratverwertungsspektrum der isolierten Bacillen.	109

1. Einleitung

Das Wissen über das Verhalten von Huminstoffen (HS) im Grundwasser (GW) und ihre Wechselwirkungen mit den dort lebenden Mikroorganismen (MO) ist wenig erforscht. Da ca. 70% der Trinkwasserversorgung der BRD aus natürlichen Grundwasservorkommen gedeckt werden, kommt den ökologischen Verhältnissen im Grundwasser eine große Bedeutung zu.

Mikrobiologische Untersuchungen des GW und der darin enthaltenen HS sind besonders problematisch. Eine repräsentative, unbeeinflusste Probenahme von Grundwasser, Sedimenten und den dort lebenden MO ist äußerst schwierig. Jeder Eingriff in Form einer Probenahme führt zu Störungen in dem empfindlichen Gleichgewicht des Biotops GW. Daraus ergibt sich das Risiko der Kontaminationsgefahr und ein Verlust der Reproduzierbarkeit (Nehrkorn, 1986). Außerdem entziehen sich HS aufgrund ihrer hohen Komplexität und Molekülgröße (MW zwischen 1.000-50.000, Thurmman, 1985; Ziechmann, 1980) einer genauen chemischen Analyse, wodurch sich exakt definierbare Aussagen über ihren Einfluss auf ihre Umgebung nahezu ausschließt. Die gewonnenen Aussagen stellen immer nur kleinen Ausschnitt aus den tatsächlich vorherrschenden Zuständen dar.

1.1 Huminstoffe

Eine allgemein gültige Strukturformel liegt für HS nicht vor, sie sind rein operationell definiert und unterscheiden sich u.a. durch ihr Löslichkeitsverhalten, ihr Molekulargewicht und ihren Polymerisationsgrad (Aiken, 1985; Hack und Selenka, 1989).

Die Isolierung und Anreicherung der HS aus wässrigen Proben erfolgt über Methoden wie Gefriertrocknung, Ultrafiltration oder verschiedene Sorptionsverfahren. Am weitesten verbreitet ist das absorptionschromatographische Verfahren in Anlehnung an die Methode von Mantoura und Riley (1975). Es zeichnet sich durch eine gute Handhabbarkeit und hohe Spezifität aus und ermöglicht die Gewinnung von HS auch im präparativen Maßstab (Aiken, 1988). Hierbei wird die zu untersuchende Wasserprobe zur Protonierung der organischen Säuregruppen auf einen pH-Wert von 2,0 - 2,2 angesäuert und die nun unpolaren Moleküle in einer Chromatographiesäule an die Polystyrolmatrix eines Amberlite XAD-Adsorberharzes gebunden. Zur Entfernung von Salzen wird die XAD-Matrix mit 0,01 M HCl gespült und anschließend die gebundenen organischen Substanzen mit 0,2 M NaOH eluiert. Das Eluat wird zur weiteren Entsalzung über einen Kationentauscher geleitet und das Volumen im Vakuum bei max. 35°C auf 1/10 eingengt und abschließend lyophilisiert. Der Extrakt wird unter einer

Inertgas-Atmosphäre gelagert. Eine weitere Fraktionierung der extrahierten HS kann über das Löslichkeitsverhalten der einzelnen Verbindungsklassen Humine, Huminsäuren und Fulvinsäuren in Basen und Säuren erfolgen. Humine sind sowohl in Basen als auch Säuren unlöslich und verbleiben in wässrigen Lösungen als Rückstand. Huminsäuren sind in Basen

Tab. 1.1a: Elementverteilung in HS, ermittelt in einem Labor-Ringversuch, mit drei HS unterschiedlichen Ursprungs (nach Huffmann und Stuber, 1985).

Kohlenstoff	20 - 70%
Wasserstoff	2 - 8%
Sauerstoff	20 - 40%
Stickstoff	0,1 - 5%
Schwefel	0,1 - 5%
Aschegehalt	0,1 - 60%
Chlor	0,005 - 5%
Phosphat	0,005 - 2%

löslich und in Säuren unlöslich, die niedermolekularen Fulvinsäuren sind sowohl säure- als auch basenlöslich.

Eine genaue Beschreibung der chemischen Struktur der HS kann nicht geliefert werden. Es lassen sich aber Aussagen über den Gehalt der atomaren Hauptbestandteile Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff und Stickstoff treffen, sowie bestimmte funktionelle Gruppen nachweisen (s. Tab. 1.1a und b).

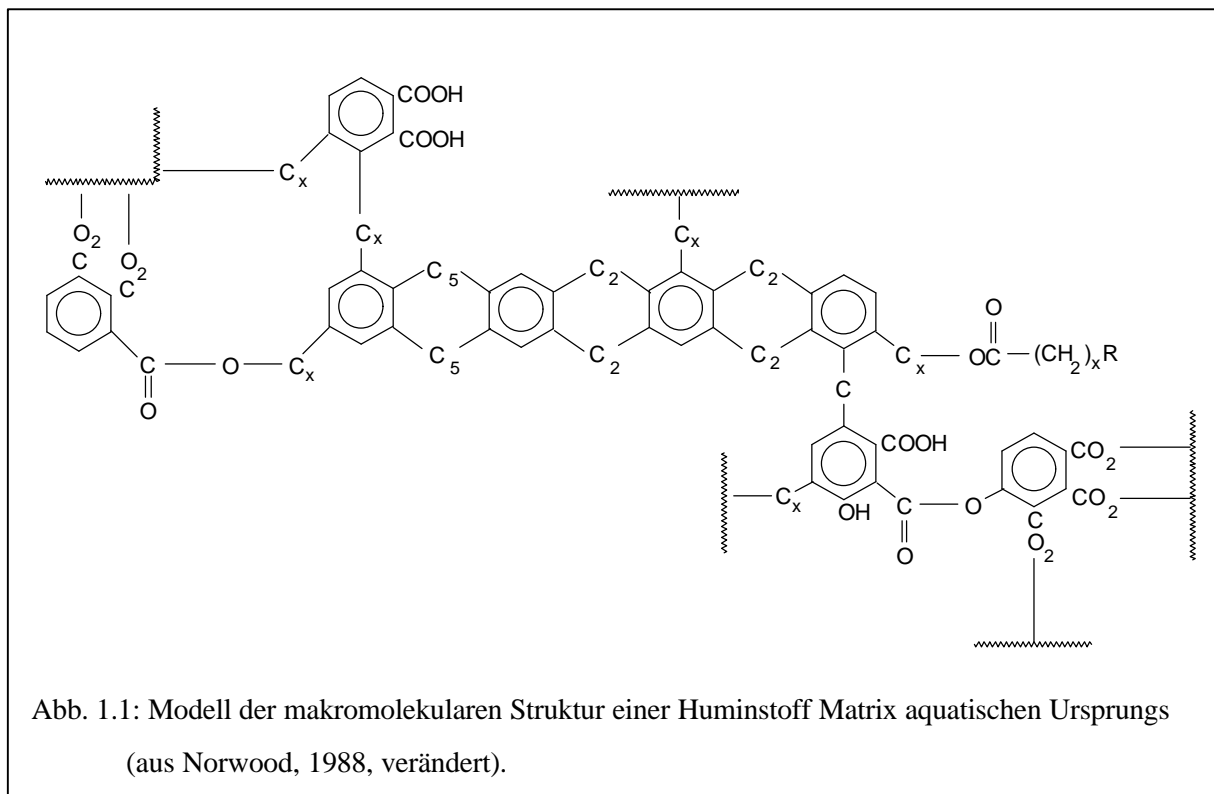
Wie aus Tab.1.1.a ersichtlich unterliegt die atomare Zusammensetzung der HS einer starken Abhängigkeit ihres Ursprungs,

Huffmann und Stuber (1985) verwendeten drei HS unterschiedlicher Herkunft, zwei Proben wurden aus Flüssen isoliert, die dritte aus Boden. Die dargestellten signifikanten Unterschiede schließen eine allgemeingültige Formel aus, sodass chemisch-analytisch erhobene Daten immer

Tab. 1.1b: Vorkommen und Herkunft funktioneller Gruppen bei Huminstoffen (verändert nach Ziechmann, 1980).

Funktionelle Gruppe	Herkunft
Hydroxy-Gruppe in Phenolen und Alkoholen	Phenole, Ligninfragmente, Wurzelauausscheidungen, Alkohole, Seitenkette des Coniferylalkohols
Carboxylgruppe	Niedermolekulare- und Aminosäuren
Carbonylgruppe	Oxidationsprodukt der Phenole
Etherbrücke	Kohlenhydrate, Lignine
Methoxylgruppe	Lignine
Aminogruppe	Aminosäuren, biogene Amine
Heterocyclischer Stickstoff	Heterocyclen, z.B. Melanine

nur auf die untersuchte Substanz zu beziehen sind. Die Grundmatrix der HS setzt sich nach den bestehenden Erkenntnissen aus aromatischen und aliphatischen Strukturen zusammen, an der weitere organische Molekülgruppen gebunden und / oder assoziiert vorliegen (s. Abb. 1.1). Die genaue Zusammensetzung einzelner HS-Moleküle ist dabei abhängig von der Genese und dem Umfeld des Moleküls. Als Ausgangssubstanzen der HS-Genese spielen abgestorbenes, vorwiegend pflanzliches Material und die darin enthaltenen Lignine, scheinbar eine wichtige Rolle. Biologische und chemische Umsetzungen wie z.B. enzymatische Reaktionen, (Poly-) Kondensationen, Radikalbildung, Bindungen mit weiteren organischen Molekülen wie Kohlenhydraten, Proteinen, Harzen und Sorption an die Boden-matrix sind nach den bestehenden Theorien an der Bildung der HS maßgeblich beteiligt (Thurman, 1985; Hedges, 1988; Ziechmann, 1980). Das Alter von HS liegt nach Thurman (1985) zwischen 50 und 5.000 Jahren.



HS gelten als mikrobiell schwer verwertbar. Die geringe Zugänglichkeit ihrer reaktiven Gruppen führt zu Schwierigkeiten bei der bakteriellen Nutzung von HS als Kohlenstoff- und Energiequelle. Die Größe der HS-Moleküle verhindert eine Aufnahme in die Zelle, sodass enzymatische Abbaureaktionen außerhalb des geschlossenen zellulären Milieus stattfinden müssen. Eine vollständige Mineralisierung von HS durch MO ist, bedingt durch ihren Aufbau und ihre Molekülgröße, unwahrscheinlich. Da die Genese von HS zur Zeit nicht befriedigend geklärt werden kann und ihre kontinuierlichen Änderungen im wässrigen Milieu mit hoher

Wahrscheinlichkeit von MO beeinflusst wird, spricht man besser von einer mikrobiellen Transformation der HS, statt von Abbau im herkömmlichen Sinne. Die komplexe Struktur und ihre hohe chemische und funktionelle Vielfalt verleiht den HS im GW eine besondere ökologische Bedeutung. Sie können das Wachstum der GW-MO durch Abgabe assoziierter Substanzen, wie z.B. Kohlenhydraten, Peptiden und Spurenelementen fördern, und auch selber als C-, N- und Energiequelle dienen (Otremba, 1992; Plenz, 1994; Tuschewitzki et al., 1992; Visser, 1985a+b). Wachstumshemmend können sich HS durch ihr hohes Komplexierungsverhalten und ihre Oberflächeneffekte auswirken. Durch ihre hohe Anzahl an Bindungsstellen haben HS die Eigenschaft, ihrer Umgebung Spurenelemente und organische Moleküle zu entziehen und treten so in direkte "Nahrungskonkurrenz" zu den GW-MO (Abbt-Braun, 1987; Frimmel, 1983; Müller-Wegener, 1985; Ziechmann, 1980). Ihre Funktion als Transportvektoren für Pestizide und weitere Xenobiotika konnte durch Preuß (1991) und Stevenson (1985) nachgewiesen werden. Durch ihre Fähigkeit Schwermetallionen und organische Xenobiotika irreversibel zu binden, kommt den HS eine detoxifizierende Wirkung im Boden und im Wasser zu. Ungeklärt ist in diesem Fall bisher, inwieweit sich Alterungsprozesse und Transformationen an den HS auf eine erneute Freisetzung dieser Schadstoffe auswirken (Kästner et al., 1993; Müller-Wegener, 1985).

1.2 Grundwasser

Grundwasser wird nach DIN 4049 als „Unterirdisches Wasser, das die Hohlräume der Erdrinde zusammenhängend ausfüllt und dessen Bewegung ausschließlich oder nahezu ausschließlich von der Schwerkraft und den durch die Bewegung selbst ausgelösten Reibungskräften bestimmt wird“ definiert. Matthes (1994) gibt eine umfangreichere Beschreibung: „Grundwasser erfüllt als frei bewegliches Wasser zusammenhängend Hohlräume im Untergrund. Es tritt nach mehr oder weniger langem unterirdischem Fließweg in Quellen zutage oder speist unmittelbar in oberirdische Gewässer (Wasserläufe, Seen und Meere) ein. Es erneuert sich durch Versickern von Niederschlagswasser oder - bei entsprechendem Gefälle - von Wasser oberirdischer Gewässer. Bei der Versickerung von Niederschlagswasser verbleibt das Wasser eine gewisse Zeit in der Wasser-ungesättigten Zone über der Grundwasseroberfläche und weist dann als Sickerwasser z.T. charakteristische Eigenschaften auf. An Meeresküsten stellt sich ein dynamisches Gleichgewicht ein zwischen spezifisch leichterem süßem Grundwasser, das zum Meer abströmt, und spezifisch schwererem Meerwasser, das das Süßwasser unterschichtend landwärts in den Untergrund eindringt und so zu Grundwasser wird.“

GW stellt einen besonderen Lebensraum dar. Durch die fehlende photosynthetische Primärproduktion sind die dort lebenden MO auf die Nährstoffversorgung durch das einsickernde Niederschlagswasser bzw. der Infiltration durch stehende und fließende Gewässer angewiesen. Während dieser Untergrundpassage erfolgt eine starke Veränderung in der physikalischen, chemischen und biologischen Zusammensetzung des Wassers. Sorptionsprozesse an die Bodenmatrix und mikrobielle Abbauvorgänge führen zu einer drastischen Abnahme des DOC (gelöster organischer Kohlenstoff). Dieser liegt je nach Beschaffenheit des GW-Leiters zwischen 0,5 und 10 mg/l, HS stellen mit einem Anteil bis zu 90% am DOC die größte C-Quelle im GW dar. Die aus Grundwässern isolierten HS zeichnen sich im Vergleich zu HS aus Oberflächenwässern durch einen höheren Wasserstoff- und einen geringeren Sauerstoffgehalt aus. Der höhere Wasserstoffanteil beruht auf einer Zunahme aliphatischer Strukturen, während die Abnahme des Sauerstoffgehaltes, bei gleichbleibendem Anteil an Carboxylgruppen, auf eine Abnahme von Carbonyl- und Hydroxylgruppen hin deutet (Gliesche, 1995; Thurmann, 1985; Ziechmann, 1980).

1.3 Grundwasserbesiedlung

Das Vorkommen einer autochthonen MO-Besiedlung des GW ist erst seit den Untersuchungen von Wolters und Schwartz (1956) bekannt und genauer erforscht. Bis dahin galt GW im allgemeinen als frei von einer natürlich vorkommenden bakteriellen Besiedlung. In der folgenden Zeit rückten das GW und die dieses Biotop besiedelnden MO immer mehr in den Mittelpunkt vieler Untersuchungen. Anfänglich unter hygienischen Aspekten, später auch um eine allgemeine Beschreibung des Standortes GW liefern zu können. Ein Überblick der daran beteiligten Arbeitsgruppen und Forscher geben Hirsch (1992) und Matthess (1994).

Die im GW lebenden MO müssen an die extremen Bedingungen des Standortes, d.h. Oligotrophie (geringe Gehalte von Kohlenstoff und Stickstoff, Phosphat), niedrige Temperaturen und geringer bis fehlender Sauerstoffgehalt angepasst sein. Die metabolische Aktivität der MO ist demzufolge *in situ* sehr niedrig, ebenso die Wachstumsraten. Neben der Fähigkeit mit geringen Nährstoffgehalten wachsen zu können betreiben die MO im GW weitere Überlebensstrategien. Unter den beschriebenen Bedingungen kann es zur Bildung von morphologischen Veränderungen, wie z.B. der Ausbildung von Hungerformen, Änderung des Oberflächen / Volumenverhältnisses, Sporenbildung, Wechsel zwischen angehefteten Zellen und Schwärmerstadien und ein Übergang in VBNC (Viable but non culturable) -Stadien kommen (Kjelleberg, 1993; Gliesche, 1996; Chapelle, 1993).

In vielen Untersuchungen zur Besiedlung des GW wurde eine hohe bakterielle Diversität festgestellt, einen umfassenden Überblick geben Hirsch et al. (1992), sie listen über 100 aus GW isolierte und identifizierte Mikroorganismenarten und -gruppen auf. Weiterhin identifizierten sie in Sediment- und GW-Proben zweier Brunnen 80 verschiedene bakterielle Morphotypen.

1.4 Fragestellung

Die vorliegende Arbeit ist ein Teil des DFG-Projektes „ROSIG“ (Refraktäre organische Säuren in Gewässern) und wurde über einen Zeitraum von vier Jahren von der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziert. Im Rahmen dieses Projektes sollte die vorliegende Arbeit einen Beitrag zum Verständnis der Einflüsse von Huminstoffen auf die mikrobielle Besiedlung im Grundwasser, sowie deren Wechselwirkungen liefern.

Huminstoffe stellen in Grundwasserbiotopen den größten Anteil an gelöstem organischen Kohlenstoff, und damit die größte Kohlenstoff- und Energiequelle für die dort siedelnden Mikroorganismen dar. Dies führt zwangsläufig zu Wechselwirkungen zwischen den Huminstoffen und den Mikroorganismen. Um diese Wechselwirkungen näher charakterisieren zu können, wurde in der vorliegenden Untersuchung ein Reaktorsystem entwickelt, mit welchem Langzeit-batch-Versuche durchgeführt werden sollten. Das Ziel der vorliegenden Arbeit ergibt sich aus den folgenden Fragestellungen:

- Wie verändert sich die mikrobielle Besiedlungs- und Diversitätsstruktur unter dem Einfluss der zugesetzten Huminstoffe?
- Wie wirken sich die Huminstoffe auf die Physiologie der Mikroorganismen aus?
- Sind die Mikroorganismen in der Lage, die Huminstoffe als (alleinige) Kohlenstoff- und Energiequelle zu nutzen?
- Wie weit führt diese Nutzung zu Änderungen in dem chemischen Aufbau der Huminstoffe?

Zur Klärung dieser Fragestellungen wurden unterschiedliche Untersuchungsmethoden herangezogen. Hierzu wurden zur Bestimmung der mikrobiellen Besiedlungs- und Diversitätsstruktur in dem Versuchsaufbau neben klassischen mikrobiologischen Methoden zur Morphologie und Physiologie der MO, weiterhin ein Verfahren zur chemotaxonomischen Charakterisierung und ein molekularbiologisches Verfahren angewandt. Der Hauptteil der Untersuchungen lag hierbei in der Beschreibung der physiologischen Leistungen der isolierten Reinkulturen und der MO-Gemeinschaften. Da die komplexe Struktur der HS nicht mit einer Standardmethode aufgeklärt werden kann, kamen auch hier, mit der Säurehydrolyse, LC-DOC

und der Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie, drei unterschiedliche Methoden zur Anwendung.

Eine Darstellung der Aufwuchsbesiedlung in dem Versuchsaufbau erfolgte über die Rasterelektronenmikroskopie.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Um Langzeitversuche im Labor durchzuführen, die eine Annäherung an die natürlichen Verhältnisse eines Grundwasserbiotops ermöglichen, wurde das im folgenden beschriebene Festbett-Reaktorsystem entwickelt. Die Reaktoren bestanden aus jeweils einer Glassäule mit einem Durchmesser von 10 cm und einer Höhe von 65 cm. Als inerte Oberfläche zur mikrobiellen Besiedlung wurden die Reaktoren mit je 4 kg gewaschenen und autoklavierten Glaskugeln (Durchmesser = 6 mm) befüllt. Die Glaskugeln hatten in den Reaktoren eine



Abb. 2.1a: Aufbau der Vorversuchsanlage.

Füllhöhe von ca. 45 cm. Die Reaktoren wurden mit 3,4 l Grundwasser (Wasserwerk Bremen Blumenthal, Brunnen 14) aufgefüllt. Der Flüssigkeitsstand lag ca. 10 cm über der Oberfläche der Glaskugeln. (Abb. 2.1a) Die Umwälzung des Wassers erfolgte über eine Peristaltikpumpe mit einem Durchsatz von 2 l/d. Zwei Reaktoren wurden in Betrieb genommen, einer wurde zusätzlich mit HS (DFG 1/2 syn. BOC 1-2) in der Konzentration von 100 mg/l beaufschlagt, der zweite Reaktor diente als Kontrolle. Eine Beschreibung der verwendeten HS findet sich bei Hack (1988) und Matthess (1992).

Die Beprobung der Reaktoren verlief monatlich und halbjährlich nach folgendem Schema:

Monatlich:

- Gesamtzellzahl-Bestimmung der aquatischen Phase
- Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE) des Aufwuchses und der aquatischen Phase
- Leitfähigkeitsmessung der aquatischen Phase
- pH-Wert Bestimmung
- DOC-Messung

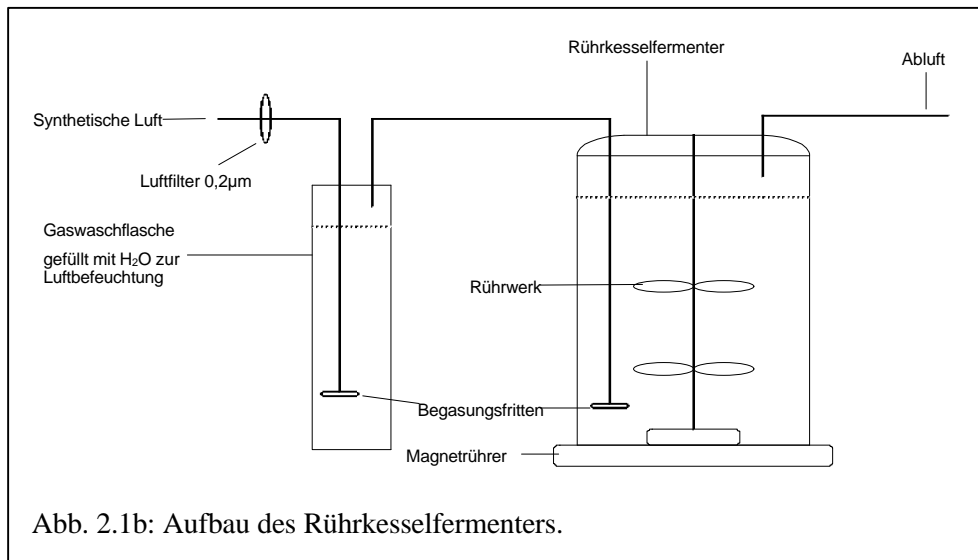
Halbjährlich:

- Isolierung von 240 Reinkulturen von den KBE-Platten
 - Zell- und koloniemorphologische Bestimmung
 - Biochemische Charakterisierung
 - Chemotaxonomische Charakterisierung ausgewählter Standorte
 - 16S rDNA-PCR und DGGE Auftrennung ausgewählter Standorte
 - Sequenzanalyse ausgewählter 16S-rDNA-Amplifikate
- Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Glaskugeln
- Elution der HS aus der aquatischen Phase
 - Säurehydrolyse
 - Py-FIMS
 - LC-DOC-Messung

Die Reaktoren und Probenahmetermine werden im weiteren Text nach folgendem Schema bezeichnet:

- | | |
|------------------------|-----------|
| - Originalgrundwasser: | OP |
| - Reaktor mit HS: | H |
| - Kontrollreaktor: | K |
| - Aquatische Phase: | L |
| - Aufwuchs: | A |
| - Probenahmetermine | |
| 6 / 12 / 18 Monate: | A / B / C |

Die Konstruktion eines Rührkesselfermenters (Abb. 2.1b) ermöglichte zusätzliche Untersuchungen. Der gesamte Aufbau war gasdicht konstruiert, die Sauerstoffversorgung erfolgte über die Begasung mit 0,2 µm filtrierter, synthetischer Luft. Die Inkubationszeiten in diesem Ansatz betragen 10 Wochen, die Begasung war auf die minimal mögliche Gasmenge gestellt, der Ansatz während der gesamten Zeit gerührt und auf ca. 12°C gekühlt.



2.2 Physikalisch/chemische Untersuchungen

Die Erfassung mikrobiell bedingter Milieuänderungen innerhalb der Reaktoren erfolgte durch die Messung der Summenparameter Leitfähigkeit, pH-Wert, DOC und BDOC. Die zu erwartenden Veränderungen an den eingesetzten Huminstoffen durch eine mikrobielle Transformation sollte mit Hilfe nachfolgend aufgeführter Messmethoden ermittelt werden. Hierzu konnten, innerhalb des DFG Schwerpunktes die Methoden Säurehydrolyse, LC-DOC-Messung und Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie genutzt werden.

2.2.1 pH-Wert

Die pH-Wert-Messung erfolgte während der monatliche Probenahme in den gezogenen Proben. Zur pH-Wert-Bestimmung diente ein stationäres Gerät der Fa. Metronohm (Herisau, CH).

2.2.2 Leitfähigkeit

Parallel zur pH-Wert-Messung wurde während der monatlichen Probenahme die Leitfähigkeit der Probenflüssigkeit mittels eines Handgerätes der Fa. WTW (Weilheim, BRD) ermittelt.

2.2.3 DOC-Messung

Die Bestimmung des DOC-Gehaltes gibt als Summenparameter den gelösten Kohlenstoffgehaltes der Reaktorlösungen wider. Hierzu wurden 10 ml des Reaktormediums zur Entfernung zellulärer Bestandteile über einen Einwegmembranfilter (0,2 µm) filtriert und mit konz. HCl auf einen pH von 2 - 3 eingestellt. Die Messung erfolgte in Doppelansätzen in einem DOC-Analyser der Fa. Maihak (Typ Tocor 2 MST 2, Gasanalysator Defor; Hamburg, BRD) in Doppelansätzen ermittelt.

2.2.4 LC-DOC-Messung

Die Messungen zum LC-DOC des DOC-Gehaltes aus Reaktor H führte das Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe durch. Eine genaue Beschreibung der Methode ist in Huber und Frimmel (1996) aufgeführt. Dieses Verfahren stellt eine aussagekräftige Methode dar, um Veränderungen am DOC aquatischer Systeme zu beschreiben (Hesse und Frimmel, 1999). Die Methode setzt sich aus einer Kombination verschiedener Trennverfahren zusammen: SEC (Size-Exclusion Chromatography), HIC (Hydrophobic Interaction Chromatography) und IC (Ion Interaction Chromatographie), denen sich eine DOC-Detektion anschließt. Die LC-DOC-Messung ermöglicht eine Charakterisierung der chromatographierbaren organischen Wasserinhaltsstoffe in 6 Fraktionen:

- Fraktion 1: Huminstoffe
- Fraktion 2: "Building Blocks"
- Fraktion 3: Niedermolekulare Säuren
- Fraktion 4: Amphiphile Substanzen
- Fraktion 5: Polysaccharide
- Fraktion 6: Anorganische Kolloide

2.2.5 BDOC-Bestimmung

Aufgrund ihrer komplexen Struktur gelten Huminstoffe als mikrobiell schwer verwertbare Substanzen. Mittels der BDOC- (Biodegradable dissolved organic carbon) Bestimmung sollten die verwendeten HS auf ihre mikrobielle Verwertbarkeit überprüft werden. In Anlehnung an Servais et al. (1989) wurden in zwei Parallelen HS Lösungen in den Konzentrationen 10 mg/l, 50 mg/l, 100 mg/l und 500 mg/l in Schüttelkolben vorgelegt. Als Inokulum diente eine aufkonzentrierte Bakteriensuspension aus dem Reaktor H, mit einer Zellzahl von log 8,33 pro Ansatz. Nach 14-tägiger Inkubation bei RT im Dunkeln erfolgte erneut die Bestimmung der

Zellzahlen und des DOC in den Lösungen. Die Differenz der DOC-Werte Start / Ende gibt das Maß der biologischen Verwertbarkeit der organischen Inhaltsstoffe wider.

2.2.6 Säurehydrolyse der Huminstoffe

Mit Hilfe der Säurehydrolyse (SH) sollten die chemischen Veränderungen an den HS während des Versuchszeitraumes dargestellt werden. Die SH ermöglicht eine Aussage über den Anteil der an den HS assoziierten und in ihnen gebundenen Aminosäuren (AS) und Kohlenhydraten (KH). Die Methode ermöglicht die Detektion von 17 AS und 11 KH (s. Tab. A 3.2.6, Anhang), sowie die Ermittlung des Stickstoff- und Kohlenstoffgehaltes der detektierten Substanzen an dem Gesamtkohlenstoffgehalt der HS. Die Messungen wurden von Dr. Jutta Jahnel am Engler-Bunte-Institut, Bereich Wasserchemie, Universität Karlsruhe vorgenommen. Eine ausführliche Darstellung der Methode findet sich bei Jahnel et al. (1993).

2.2.7 Pyrolyse-FIMS der Huminstoffe

Eine eventuelle mikrobielle Transformationen der HS wurde mittels Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometer (Py-FIMS) von Prof. H.-R. Schulten (Institut Fresenius, Taunusstein) analysiert. Die Py-FIMS liefert neben dem Massenspektrum und Thermogramm den Nachweis von 10 verschiedenen Substanzklassen (s. Tab. A 3.2.7b, Anhang), die während der Pyrolyse aus der untersuchten Substanz freigesetzt werden. Eine genaue Beschreibung der Methode und des Analysenverlaufs findet sich bei Schulten (1999).

2.3 Mikrobiologische Untersuchungen

Die mikrobiellen Diversitäts- und Besiedlungsmuster innerhalb der Reaktoren stellten den Hauptteil dieser Untersuchung dar. Mit den unterschiedlichen angewandten Methoden sollten sowohl quantitative als auch qualitative Aussagen zu folgenden Fragestellungen gefunden werden: Welchen Verlauf zeigt die Biomassenentwicklung während der Inkubation, zu welchen stoffwechselphysiologischen Eigenschaften sind die Gemeinschaften bzw. isolierte Reinkulturen in der Lage, welchen Einfluss haben die HS auf die MO und auf welche Veränderungen in der mikrobiellen Besiedlung kann man aus den Daten schließen? Die Biomassen-Entwicklung wurde mit den Lebendzellzahl- und Gesamtzellzahl-Bestimmungen im monatlichen Rhythmus ermittelt, physiologische Eigenschaften der Gemeinschaften und Isolate wurden halbjährlich erhoben.

2.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE)

Durch die Ermittlung der koloniebildenden Einheiten (KBE) ließen sich die Lebendzellzahlen der aquatischen Phase und des Aufwuchses der Glaskugeln erfassen. Nach Anlegen von Verdünnungsreihen von 10^0 bis 10^{-6} in drei Parallelen aus den Reaktorlösungen, wurden 0,1 ml dieser Bakteriensuspension auf P-Agar nach Nehr Korn (1968; s. A. 2.3.1, Anhang) ausplattiert und bei RT inkubiert. Zur Bestimmung der KBE des Aufwuchses wurden 20 Glaskugeln den Reaktoren steril entnommen, in Schüttelkolben mit 20 ml sterilem Leitungswasser und 5 g Quarzsand gegeben und 30 min bei 180 U/min geschüttelt. Aus dieser Suspension wurden wie oben beschrieben Verdünnungsreihen angelegt und ausplattiert. Die Auswertung erfolgte in beiden Fällen nach 14 Tagen, die KBE der Reaktorlösung bezieht sich auf ml, die des Aufwuchses auf cm^2 .

2.3.2 Gesamtzellzahl-Bestimmung mit Acridinorange

Neben den Lebendzellzahlen wurden monatlich die Gesamtzellzahlen der aquatischen Phase, nach Färbung der Zellen mit Acridinorange (AO), in Anlehnung an Hobbie et al. (1977), bestimmt. Von jeder Probenahme wurden vier Verdünnungsstufen in 2 Parallelen angesetzt. Da sich in den Reaktoren unterschiedlich hohe Zellzahlen entwickelten, mussten die Proben des Reaktors H in den Verdünnungen 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 angesetzt werden, die Proben des Reaktors K wurden 1:2, 1:5, 1:10 und 1:20 verdünnt. Zur Färbung wurden 3 ml jeder Probe mit 3 ml Acridinorange Lösung (1:10.000 in 6,6 mM Phosphatpuffer, pH 6,7, sterilfiltriert) vermischt und 3 min inkubiert. Anschließend erfolgte eine Filtration der Proben über ein schwarzes Nucleopore-Filter (Polycarbonatfilter, 0,2 μm , $\varnothing = 25$ mm; Sartorius, Göttingen, BRD). Nach Lufttrocknung wurde 1/4 des Filters ausgeschnitten, mit Cargille Öl (Typ A; Polyscience, USA) auf einen Objekträger gegeben und ein Deckglas luftblasenfrei aufgelegt. Von jedem Präparat erfolgte im Epifluoreszenzmikroskop (Zeiss, Typ Standard 14 mit Fluoreszenz-Auflichtkondensator IV FI; Oberkochen, BRD) die Auszählung von 10 Gesichtsfelder unter Zuhilfenahme eines Okularrasters unter folgenden Einstellungen:

Vergrößerung:	1.000-fach
Erregerfilter:	BP 455 – 490 nm
Farbteiler:	FT 510 nm
Sperrfilter:	P 520 – 560 nm

Die Zellzahlen der einzelnen Gesichtsfelder wurden gemittelt, und aus mindestens 3 Verdünnungsstufen die Gesamtzellzahl errechnet.

2.3.3 MPN-Bestimmung

Die Verteilung verschiedener stoffwechselphysiologischer Gruppen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaften sollte durch die Bestimmung der most probable number (MPN) Methode untersucht werden. Durch den Einsatz physiologisch selektiver Medien kommt es hierbei nur zu einer Vermehrung spezieller, an dieses Nahrungsangebot angepasster Bakterienarten. Das Vorhandensein folgender physiologischer Gruppen in den Gemeinschaften wurde halbjährlich überprüft: Denitrifizierer (DEN), Denitrifizierer Kontrolle (DEN-K), Nitrifizierer 1. Stufe (NH₄-OX), Nitrifizierer 2. Stufe (NO₂-OX), Sulfatreduzierer (SO₄-RED), Schwefeloxidierer (S-OX), Manganreduzierer (Mn-RED), Manganoxidierer (Mn-OX), Eisenreduzierer (Fe-RED) und Eisenoxidierer (Fe-OX). Die benötigten Medien und Verfahrensweisen sind bei Preuß (1991) beschrieben. Die Ansätze erfolgten in 4 Parallelen in 24er Mikrotiterplatten mit jeweils 1,8 ml Medium und 0,2 ml der Verdünnungen 10⁰ bis 10⁻⁵. Die Auswertung erfolgte nach 20, 50 bzw. 100 Tagen Inkubation bei RT im Dunkeln durch Zugabe der entsprechenden Nachweisreagenzien und Ablesung der Trübung.

2.3.4 Isolierung der Reinkulturen, Stammhaltung

Die Isolierung von Reinkulturen erfolgte im Abstand von sechs Monaten von den oben beschriebenen KBE-Platten. Bei der Probenahme wurde von jedem Standort (Reaktor mit und ohne HS, Glaskugeln und aquatische Phase) jeweils eine Agarplatte mit einer Koloniezahl von ca. 60 - 80 Einzelkolonien herangezogen, und 60 (80 aus dem Grundwasser) der Kolonien durch Vereinzeln auf P-Agar weiter isoliert. Die Überprüfung der Kulturen auf Reinheit erfolgte ab der zweiten Passage durch Gramfärbung, mikroskopische Betrachtung der Isolate und Auswertung der Koloniemorphologie. Jeweils 45 Reinkulturen (Grundwasser: 63) pro Standort und Probenahme wurden in den nachfolgend aufgeführten Untersuchungen weiter überprüft. Die Stammhaltung der Reinkulturen erfolgte durch Übertragung der Isolate in das MicroBankTM System (PRO-LAB Diagnostics, Neston, UK) und der Lagerung bei -20°C. Die für die chemotaxonomische Diversitätsbestimmung notwendigen größeren Biomassen pro Stamm wurden durch Anzucht der Isolate in flüssigem P-Medium (100 ml in Schüttelkolben) erzielt. In Abhängigkeit vom Wachstum der einzelnen Kulturen erfolgte die Ernte der Zellen nach 3 bis 7 Tagen durch Zentrifugation des gesamte Ansatzes. Die Zellmasse wurde mit 0,9% NaCl-Lsg. gewaschen, in ausgewogene 2 ml Eppendorf-Cups überführt, lyophilisiert und nach Gewichtsbestimmung des Lyophilisats eingefroren.

2.3.5 Kolonie- und zellmorphologische Bestimmung

Die Zell- und Koloniemorphologie der Reinkulturen ließen sich an Hand von 77 Eigenschaften nach 10- bis 14-tägigem Wachstum der Reinkulturen auf P-Agar bestimmen. Eine genaue Auflistung der untersuchten Eigenschaften findet sich in Tab. A 2.3.5 (Anhang).

2.3.6 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Isolate

Zur Charakterisierung der physiologischen Eigenschaften der Isolate wurde das Wachstum auf verschiedenen C-Quellen als alleiniger Kohlenstoff- und Energiequelle bestimmt. Die verwendeten Medien und Verfahrensweisen sind an die Bedingungen der GW-Bakterien angepasst und bei Kölbel-Boelke (1987) und Preuß (1991) aufgeführt. Überprüft wurden 76 Stoffwechseleigenschaften, darunter das Wachstum auf verschiedenen C-Quellen, enzymatische Reaktionen und das Wachstum unter veränderten physikalischen und chemischen Bedingungen (s. A 2.3.6a, Anhang). Aus den ermittelten Wachstumsaktivitäten konnten die *in vitro* Aktivitäten der einzelnen Probenahmen berechnet und miteinander verglichen werden (s. A 2.3.6b, Anhang). Neben den bei Kölbel-Boelke (1987) und Preuß (1991) beschriebenen Wachstumsmedien wurde das Wachstum auf den hier eingesetzten HS (100 mg/l) mit und ohne Cosubstrat (Acetat, Pyruvat, Malonat, Succinat und Formiat) untersucht. Die Durchführung der physiologischen Tests erfolgte in 96er Mikrotiterplatten (Dott und Thofern, 1980). Die Inkubationszeiten betragen aufgrund des langsamen Wachstums der Kulturen bis zu 4 Wochen.

2.3.7 Clusteranalyse

Die Berechnung des Ähnlichkeitsmaßes der Daten aus Punkt 2.3.5, 2.3.6 und 2.4 erfolgte über den simple-matching Koeffizienten (Sneas und Sokall, 1973). Mit Hilfe des complete Linkage Verfahrens wurden die Stämme zu Clustern höchster Ähnlichkeit zusammengefasst. Die Berechnungen erfolgten durch das von Krambeck und Witzel (1983) entwickelten Clusterprogramms am PC. Die Zuordnung der Stämme in ein Cluster erfolgte bei einer Ähnlichkeit von $\geq 90\%$ (Daten 2.3.5, 2.3.6) bzw. $\geq 85\%$ (Daten 2.4). Die Dendrogramme ließen sich über den UPGMA-Algorithmus, unter Zuhilfenahme des PC-Programms PAUP (V. 4.01b), berechnen.

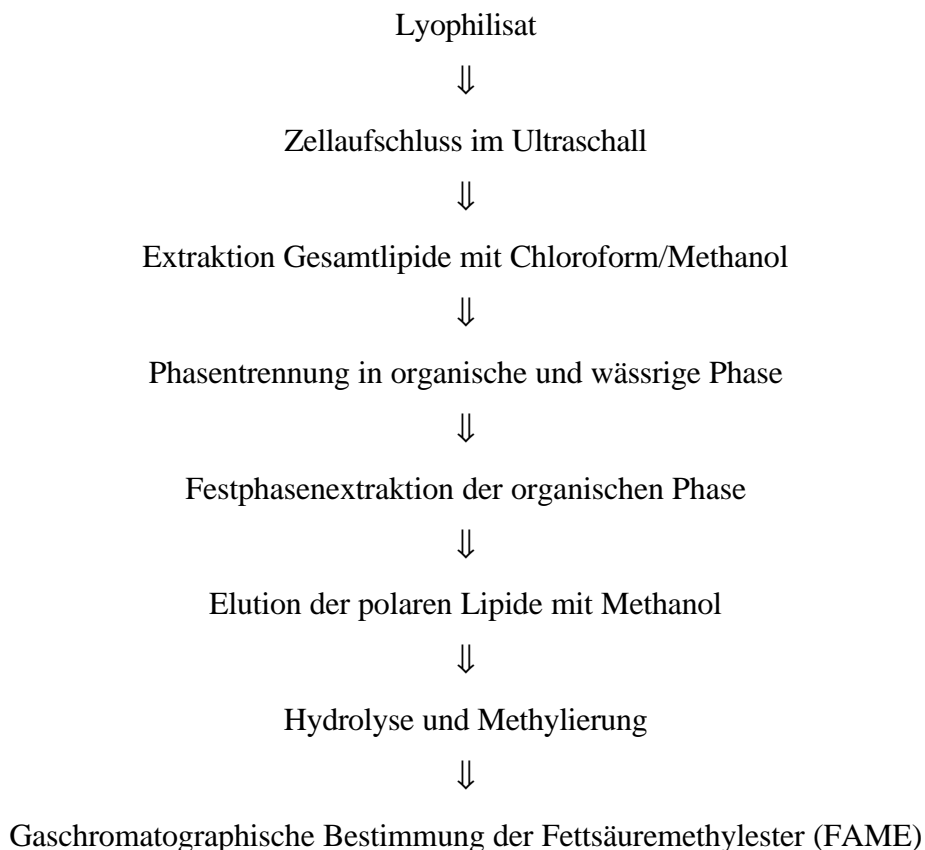
2.4 Chemotaxonomische Charakterisierung

Eine weitere Möglichkeit der Diversitätsbeschreibung der isolierten Bakterien stellt die chemotaxonomische Charakterisierung über die Analyse von Fettsäuremustern membran-gebundener Phospholipide dar (Bobbie und White, 1980; Fredrickson et al., 1986; Koopmann, 1996; Smith et al., 1986). Die Methode gilt als empfindlich und gut reproduzierbar zur Analyse von bakteriellen Besiedlungsstrukturen (Haack et al., 1994; Koopmann, 1996; White, 1986).

2.4.1 Extraktion der Membranlipide

Die Extraktion der Lipide erfolgte in veränderter Form in Anlehnung an die Methode von Bligh und Dyer (1959) modifiziert von Koopmann (1996).

Ablaufschema der Extraktion:



Extraktion der Gesamtlipide:

Die Extraktion der Gesamtlipide erfolgte durch Einwiegen von 5 mg Lyophilisat der entsprechenden Reinkultur in Reagenzröhrchen und dem Lösen in 3 ml Phosphatpuffer (50 mmol, pH 7,4). Der Zellaufschluss erfolgte durch Beschallung der Suspension im Ultraschallhomogenisator (Fa. Branson, USA; 30 sec bei Intensität 3 pulsed). Anschließend wurde

die Lösung mit 4,5 ml eines Methanol-Chloroform Gemisches versetzt, 1 min auf dem Whirl-Mix geschüttelt und 2 h bei Raumtemperatur (RT) im Dunkeln stengelassen. Zur besseren Phasentrennung wurden nochmals je 1,5 ml Chloroform und Millipore-Wasser zugegeben, die Lösung erneut 1 min auf dem Whirl-Mix geschüttelt und über Nacht bei RT stengelassen. Eine vollständige Phasentrennung der Lösung konnte nach Zentrifugation für 10 min bei 250 g erreicht werden, anschließend wurde die obere wässrige Phase abgezogen und verworfen. Nach Filtration der organischen Phase über einen Whatman 2V-Filter erfolgte im Rotationsverdampfer bei 50°C und 40 kPa eine Einengung der Probe auf ein kleines Restvolumen. Unter Stickstoffstrom wurde die verbleibende organische Phase bei 35°C bis zur Trockene eingedampft und der Rückstand in 2 ml Chloroform zur Auftrennung des Gesamtlipidextrakts wiederaufgenommen.

Für die Festphasenextraktion wurden in Silica Gel Säulen (Bakerbond, USA) verwendet. Diese mussten vor der Probenaufgabe mit zwei Säulenvolumina Chloroform konditioniert werden. Anschließend erfolgte der Auftrag und die Absorption des vollständigen Gesamtlipidextraktes auf die Säule. Bei einem Druck von 60 kPa konnten die absorbierten Lipide mit unterschiedlich polaren Lösungsmitteln eluiert werden. Neutrale Lipide desorbierten mit 3 ml Chloroform, Glycolipide mit 3 ml Aceton von der Säule, das entsprechende Eluat wurde verworfen. Die Elution der Phospholipide erfolgte mit zweimal 3 ml Methanol, das Methanoleluat wurde gesammelt, bei 50°C und 40 kPa im Rotationsverdampfer bis auf einen geringen Rest eingengt und im Anschluss unter Stickstoffstrom bei 35°C vollständig eingedampft. Der Rückstand wurde in 250 µl n-Hexan resuspendiert und mit 20 µl Nonadecanoat (C19:0; 0,02% in n-Hexan) als internem Standard versetzt. Die Hydrolyse und Methylierung der Probe erfolgte durch Zugabe von 1 ml methanolischer Schwefelsäure (3% konz. H₂SO₄ in Methanol) und Inkubation der mit Stickstoff überschichteten Probe für 1 h bei 100°C im Wasserbad. Nach Abkühlung wurde der Extrakt mit 4 ml Millipore Wasser und 3 ml eines n-Hexan-Chloroform-Gemisches ausgeschüttelt und die organische Phase in einen Spitzkolben pipettiert. Die verbleibende Phase wurde nochmals mit 3 ml n-Hexan-Chloroform-Gemisch, und abschliessend mit 3 ml n-Hexan, ausgeschüttelt. Die gesammelten Überstände wurden im Rotationsverdampfer bei 35°C und 35 kPa eingengt und unter Stickstoffstrom bis fast zur vollständigen Trockene eingedampft. Nach Resuspension des Rückstandes in 100 µl n-Hexan konnte die Lösung unter Stickstoff in GC-Probencups gegeben werden.

2.4.2 Gaschromatographie

Die Auftrennung der erhaltenen Fettsäuremethylester erfolgte gaschromatographisch nach folgenden Bedingungen:

Gaschromatograph:	Chrompack CP 9001 mit Autosampler CP 9010 (BRD)
Säule:	FFAP, 30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Fa. J&W Scientific (USA)
Injektortemperatur:	280°C
FI-Detektortemperatur:	280°C
Injektionsvolumen:	1 µl
Splitverhältnis:	1 : 15
Temperaturprogramm:	100°C Starttemperatur, Heizrate = 4°C / min, Endtemperatur = 220°C, 5 min konstant
Trägergasdruck (He):	100 kPa
Druck synth. Luft:	150 kPa
Druck Wasserstoff:	300 kPa

Die Identifizierung der detektierten Peaks erfolgte über den Abgleich der Retentionszeiten des internen (C19:0) und externer Standards (C11:0 - C24:0), die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit Hilfe des PC-Programms Maestro (V 1.0) der Fa. Chrompack. Zur Reinigung und Entfettung aller Glasgeräte kam Decon 90 (Decon Laboratories Ltd. UK) zur Anwendung, die eingesetzten Chemikalien hatten GC, bzw. HPLC Qualität.

2.5 Molekularbiologische Methoden

Unter den verschiedenen molekularbiologischen Methoden, welche sich zur Beschreibung bakterieller Diversität heranziehen lassen (Fluoreszenz *in situ* Hybridisation (FISH), Dot Blot, Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis (ARDRA), Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD), Spacer Polymorphismen, Restriktions Fragment Längen Polymorphismen (RFLP)), wurde in der vorliegenden Arbeit die Auftrennung von 16S rDNA-Amplifikaten in der denaturierenden Gradienten Gelelektrophorese (DGGE), sowie für einige ausgewählte Isolate die Sequenzanalyse dieser PCR-Produkte, herangezogen. Das Trennprinzip der DGGE basiert auf der unterschiedlichen, von der Nucleotid-Zusammensetzung der PCR-Produkte abhängigen Aufschmelzung in einem Acrylamidgel welches über einen Harnstoff / Formamid-Gradienten verfügt. Generell gilt, dass Amplifikate mit einem hohen G/C-Gehalt im Gel weiter wandern, als solche mit einem hohen A/T-Anteil. Die molekularbiologische Diversitätsbestimmung erfolgte an den isolierten Reinkulturen der Standorte HAA und KAA durch

Amplifikation des unten beschriebenen 550 bp-Amplifikats der 16S rDNA und anschließender Auftrennung der Amplifikate in der DGGE.

2.5.1 16S rDNA-PCR

Als Primer für die 16S rDNA wurden die für Eubakterien spezifischen Primer GM5F und 907R herangezogen. Der Primer GM5F erhielt zusätzlich für die DGGE am 5'-Ende eine GC-Klammer (Muyzer et al., 1995). Die Position der Primer in der 16S rRNA von *Escherichia coli* liegt bei 341 - 357 (GM5F) und 907 - 927 (907R) (Brosius et al., 1981), hieraus ergibt sich eine Fragmentlänge des Amplifikats von 550 bp (s. Tab. 2.5.1). Eine touch down PCR wurde in Anlehnung an Muyzer et al. (1995) durchgeführt um eine höhere Spezifität während der Amplifikation zu erreichen. Hierbei findet das Annealing der Primer ca. 5°C über der errechneten Schmelztemperatur (T_m) der Primer (nach Muyzer et al. (1995) 60°C für 907R und GM5F ohne GC-Klammer) statt. In den nachfolgenden Zyklen wird die Annealingtemperatur in jedem zweiten Schritt um 1°C gesenkt, bis auf einen Wert von 5°C unter der berechneten T_m . Zur Präparation PCR tauglicher DNA wurden die, auf den Micro-Bank-System Kugeln immobilisierten Stämme, in 2 ml P-Medium aufgetaut und zur Zellvermehrung 48 h inkubiert. Nach Zentrifugation in der Eppendorf Zentrifuge (2 min, 5.000 U/min) erfolgte eine Resuspension von 2 µl des Pellets in einem weiteren Cup in 20 µl PCR-Wasser. Der Aufschluss der Zellen erfolgte durch zweiminütiges Aufkochen in einer Mikrowelle bei 500 W Leistung (Wintzingerode et al., 1997). 1 µl des Aufschlusses wurde in die vorbereitete PCR Lösung (48 µl, s. Tab. A 2.5.1, Anhang) pipettiert und mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Von jedem Stamm wurden drei Parallelansätze durchgeführt. Die Zugabe der Polymerase (1 µl; Gene Craft, BRD) erfolgte nach dem Hot-Start im Thermocycler (Hybaid Omnigene Temperatur Cycler, Hybaid Ltd. UK). Die PCR-Produkte wurden nach der Amplifikation durch elektrophoretische Auftrennung eines Aliquots in einem 1,5% Agarosegel mit anschließender Ethidiumbromid Färbung auf Reinheit kontrolliert (Sambrook et al., 1989). Zusätzlich erfolgte, nach 24 Monaten Inkubation, eine Überprüfung der genetischen Diversität von Gesamtproben der aquatischen Phase und des Aufwuches beider Reaktoren nach Amplifikation in der PCR mittels Auftrennung in der DGGE.

Tab. 2.5.1: Sequenzen der verwendeten Primer und GC-Klammer, sowie ihre Position* im Genom der 16S rRNA von *E. coli* (Brosius et al., 1981).

Primer	Position*	Sequenz
GM5F	341-357	5'-CCT ACG GGA GGC AGC AG-3'
907R	907-927	5'-CCG TCA ATT CCT TTG AGT TT-3'
GC-Klammer		5'-CGCCCGCCGCGCCCGCGCCCGTCCCGCCGCCCCCGCCG-3'

2.5.2 DGGE der PCR-Produkte

Die Auftrennung der Amplifikate in der DGGE (D Gene™ System, BioRad, Germany) erfolgte in einem 6% Acrylamid Gel, das über einen Harnstoff-Formamidgradienten zwischen 20% und 70% verfügte (Muyzer et al., 1995). Entsprechend der Intensität der PCR-Banden im Agarosegel (2.5.1) wurden 5 - 20 µl der Amplifikate 1:4 mit Beladungspuffer versetzt und in die Taschen des DGGE-Gels gefüllt. Die Lauftemperatur betrug 60°C, die Laufzeit 20 - 24 h bei einer Spannung von 100 V. Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel in einem Ethidiumbromid-Bad für 30 min gefärbt und überschüssiges Ethidiumbromid durch 10-minütiges Spülen in einem Wasserbad entfernt. Die Auswertung erfolgte auf einem UV-Leuchttisch, zur Dokumentation wurden die Gele photographiert. Um einen Vergleich zwischen den einzelnen Gelläufen zu ermöglichen, diente in allen Läufen das entsprechende PCR-Produkt des Stammes HAA 16 als interner Standard.

2.5.3 Sequenzanalyse der PCR-Produkte

Die Sequenzanalyse ausgewählter 16S-rDNA-PCR-Produkte wurde von der Fa. GAG, UFT Bremen ausgeführt. Hierzu wurden die vereinigten PCR-Ansätze einer Probe mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (Fa. Qiagen, Hilden, BRD) aufgereinigt. Die Bestimmung des DNA Gehaltes der Proben erfolgte in einem 2%igem Agarosegel durch Vergleich mit einer DNA-MASS Ladder (Gibco, UK). Ein Abgleich mit den in der Datenbank des Ribosomal-Database-Project (RDP) (Maidak et al., 1997, 1999) vorliegenden Sequenzen schloß sich nach Editierung und Alignment der analysierten Sequenzen an. Anhand der Ähnlichkeiten der PCR-Produkte zu den RDP-Daten konnten die Isolate den jeweils nächst verwandten MO zugeordnet werden.

2.6. Rasterelektronenmikroskopie

Die Rasterelektronenmikroskopie (REM) sollte einen Einblick in das Biofilm-Milieu der Reaktoren geben und eine quantitative Betrachtung der bakteriellen Verteilung auf den Glaskugeln ermöglichen. Durch die erreichbaren Vergrößerungen (hier bis zu 30.000-fach), die deutlich über der Auflösungsgrenze der Lichtmikroskopie liegen, stellt die Rasterelektronenmikroskopie eine sinnvolle Methode zur genaueren Abbildung des Biofilms und der MO dar. Es sollte mit dieser Methode überprüft werden, ob und inwieweit sich der Biofilm auf den Glaskugeln unter dem Einfluss von HS, von dem des Kontrollreaktors, unterscheidet.

2.6.1 Präparationsmethoden

Für die Aufarbeitung der Glaskugeln kamen die standardisierten Fixierungs- und Dehydrierungsverfahren Rutheniumrot/Glutardialdehyd, Gefriertrocknung und Lufttrocknung zur Anwendung (Garland et al., 1979; Robinson et al., 1985). Die Proben wurden nach der Fixierung und Färbung auf einen Aluminium Probenhalter aufgebracht und zur Lagerung in einem Sputtergerät (Fa. Emitech, Typ K250) mit einer ca. 15 nm dicken Goldschicht überzogen.

2.6.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Die REM-Aufnahmen fanden unter der Betreuung von Dr. H. May an einem Canscam Typ CS 44 im Fachbereich 5 (Geologie) der Universität Bremen statt. Bei einem Strahlstrom von 20 mA wurden Werte zwischen 12 kV und 16 kV als Beschleunigungsspannung angelegt, der Arbeitsabstand betrug max. 8 mm.

3. Ergebnisse

3.1 Messwerte des Grundwassers

In Tabelle 3.1 sind die Messwerte des verwendeten Grundwassers dargestellt, die direkt in der Grundwasserprobe gemessen wurden und nicht zwingend denen des Zeitpunktes $t = 0$ (24 h nach dem Ansetzen der Reaktoren ermittelt) innerhalb der Reaktoren entsprechen. Weitere Messparameter des Grundwassers sind dem im Anhang (Tab. A 3.1) aufgeführten Datenblatt der Stadtwerke Bremen zu entnehmen.

Tab. 3.1: Physikalisch/chemische und mikrobiologische Daten des Grundwassers aus Brunnen 14 des Wasserwerks Bremen Blumenthal, Probenahme 5.12.1995.

Parameter	Messwert
pH-Wert	6,1
Leitfähigkeit in $\mu\text{S}/\text{cm}$	355
Sauerstoffgehalt bei 6°C GW-Temperatur	97%
DOC in mg/l	9,2
TOC in mg/l (vor bzw. nach Filtration über XAD 2)	8,7 / 7,2
HS-Anteil am DOC	20,8%
Log KBE /ml	2,31
Log Gesamtzellzahl /ml	5,54
Log Denitrifizierer /ml	0,81
Log Nitrifizierer 1. Stufe /ml	2,30
Log Nitrifizierer 2. Stufe /ml	0,0
Log Schwefel-Oxidierer /ml	2,54
Log Sulfat-Reduzierer /ml	0,74
Log Eisen-Oxidierer /ml	0,48
Log Eisen-Reduzierer /ml	0,0
Log Mangan-Oxidierer /ml	1,24
Log Mangan-Reduzierer /ml	0,65

3.2 Physikalisch/chemische Untersuchungen

3.2.1 pH-Wert

Nach Anfangswerten von 6,1 (KL) und 9,2 (HL) stabilisierte sich der pH-Wert innerhalb von drei Monaten in beiden Reaktoren auf Werte von 7,7 (KL) und 8,3 (HL) (Abb. 3.2.1). Im weiteren Verlauf der Inkubation zeigte sich ein leichter Anstieg, mit geringen Schwankungen auf die Werte von 8,3 (KL) und 8,6 (HL) nach 20 Monaten. Es war kein bedeutender Unterschied zwischen beiden Ansätzen zu verzeichnen.

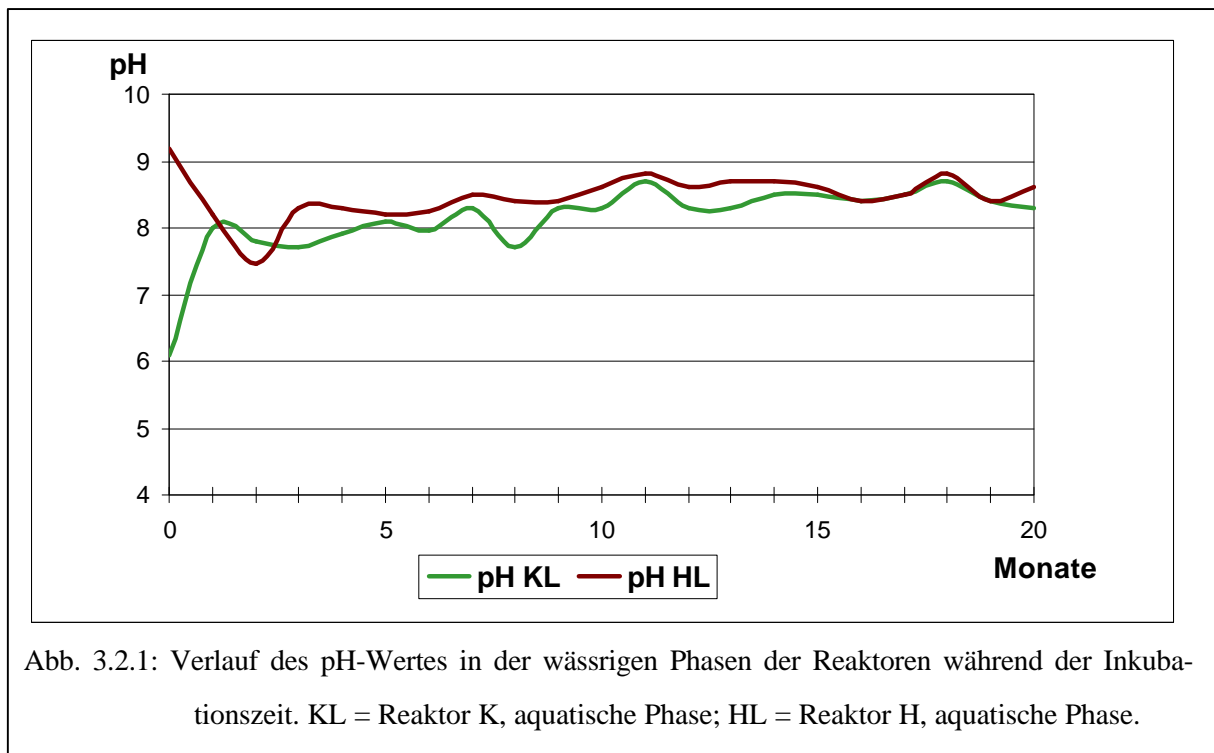
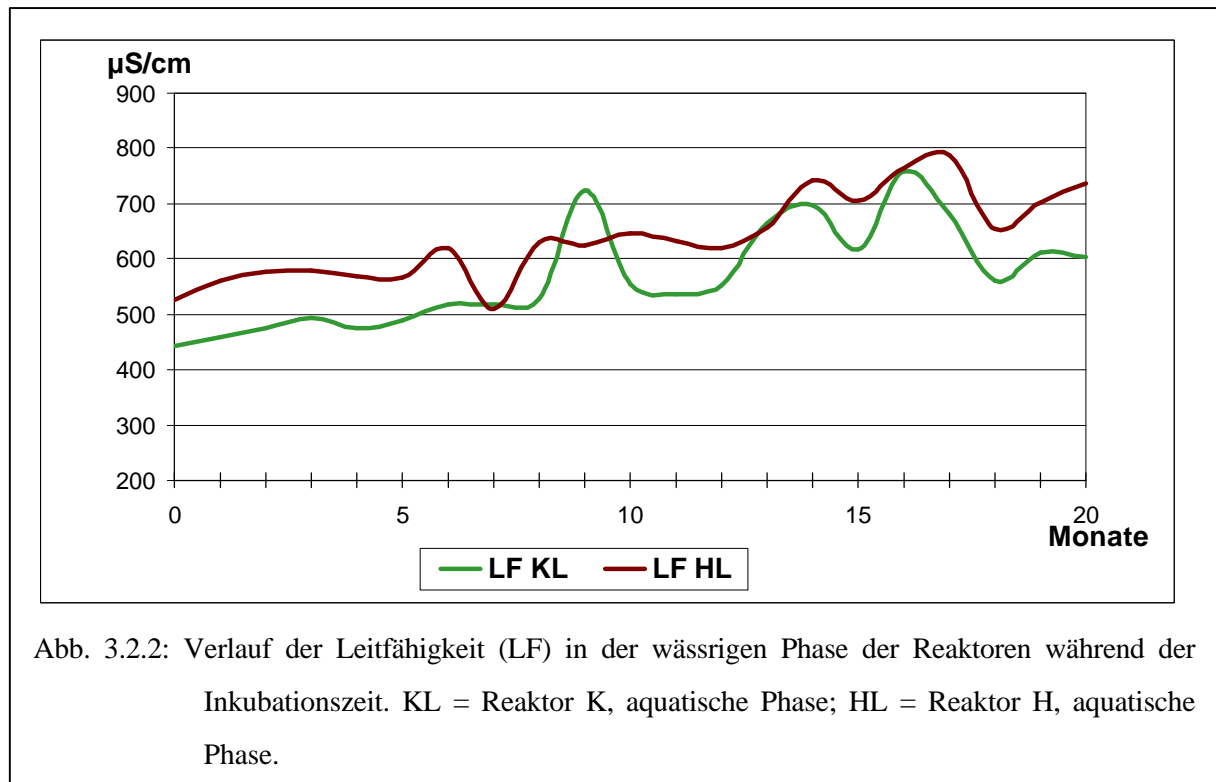


Abb. 3.2.1: Verlauf des pH-Wertes in der wässrigen Phasen der Reaktoren während der Inkubationszeit. KL = Reaktor K, aquatische Phase; HL = Reaktor H, aquatische Phase.

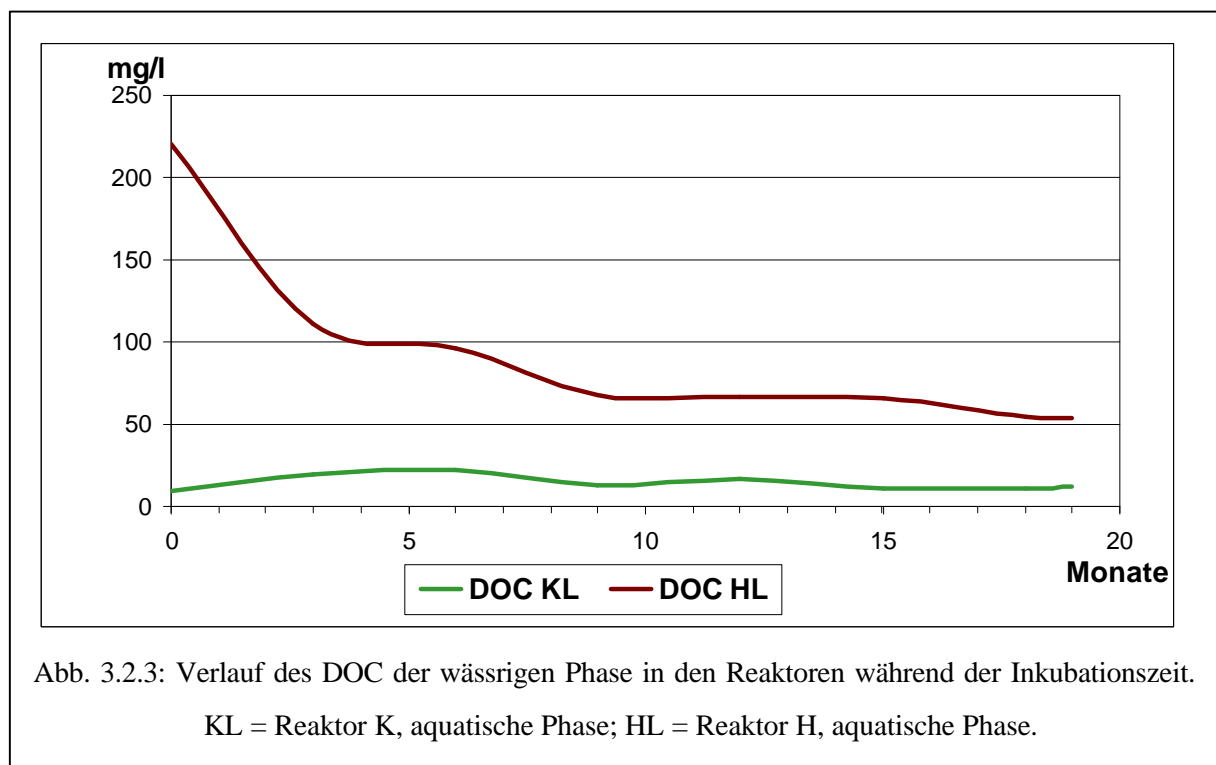
3.2.2 Leitfähigkeit

Die Leitfähigkeit der Reaktorlösungen (Abb. 3.2.2) blieb während der ersten fünf Monate Inkubation mit Werten zwischen 443 $\mu\text{S}/\text{cm}$ - 490 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (KL) und 526 $\mu\text{S}/\text{cm}$ - 580 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (HL) auf einem relativ konstanten Niveau. Im weiteren Verlauf war ein Anstieg der Leitfähigkeit auf die Endwerte von 604 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (KL) und 737 $\mu\text{S}/\text{cm}$ (HL) zu verzeichnen. Die hierbei auftretenden Schwankungen waren in dem Kontrollreaktor stärker ausgeprägt als in Reaktor H. Die Leitfähigkeitswerte in Reaktor H lagen, bis auf zwei Ausnahmen (7 und 9 Mon. Inkubation), über denen des Kontrollreaktors.



3.2.3 DOC Messung

Der DOC-Gehalt (Abb. 3.2.3) im Reaktor H halbierte sich während der ersten drei Monate von seinem Ausgangswert 220 mg/l auf 111 mg/l. Der weitere Abfall des Kohlenstoffgehaltes der



Lösung verlief in den folgenden sechs Monaten weniger stark, sodass nach neun Monaten Inkubation ein Wert von 67 mg/l erreicht war. In den folgenden sechs Monaten verblieb der DOC auf diesem Niveau und sank ab dem Inkubationsmonat 15 bis zum Ende der Messzeit noch einmal leicht ab, auf Werte zwischen 53 mg/l und 55 mg/l. In dem Kontrollreaktor verdoppelte sich der DOC-Gehalt innerhalb der ersten drei Monate von seinem Startwert 9,1 mg/l auf 19,5 mg/l und erreichte nach 6 Monaten Inkubation sein Maximum von 21,9 mg/l. Im Verlauf der weiteren Inkubation sank der Wert wieder ab und blieb nach 15 Monaten in einem Bereich zwischen 10,9 und 11,9 mg/l stabil.

3.2.4 LC-DOC-Messung

Der niedrige DOC-Gehalt des Reaktors K und das beschränkte Probenahmevolumen ermöglichte zur LC-DOC-Messung nur eine Probe zum Zeitpunkt $t = 0$. Die Proben zum Zeitpunkt $t = 0$ wurden aus beiden Reaktoren 24 h nach dem Ansetzen entnommen, und entsprechen somit dem Grundwasser bzw. dem HS DFG 1/2 (s. Tab. 3.2.4).

Tab. 3.2.4: Verteilung der einzelnen, mit Hilfe der LC-DOC Analytik detektierbaren, Fraktionen in den Reaktorlösungen resp. dem Grundwasser und HS DFG 1/2.

Anteil in % DOC	Reaktor K: 0 Monate	Reaktor H: 0 Monate	Reaktor H: 6 Monate	Reaktor H: 12 Monate	Reaktor H: 18 Monate	Reaktor H: 24 Monate	
HS-Peak (F.1)	34	74	71	79	58	66	Hydrophil ↓ Hydrophob
Build. Blocks (F.2)	3	3	4	4	5	6	
Salzpeak (F.3)	11	13	13	9	6	12	
Proteine, AS (F.4)	9	7	8	7	15	5	
cDOC	58	97	96	99	84	89	
HOC	42	3	4	1	16	11	

F. = Fraktion; Fraktion 5 und 6: n.d.; cDOC: chromatographierbarer, hydrophiler Anteil. HOC: nicht chromatographierbarer, hydrophober Anteil. AS: Aminosäuren.

Die Zusammensetzung des DOC des GW bzw. Reaktor K ($t = 0$) war durch einen hohen Anteil (42%) an nicht chromatographierbaren Substanzen gekennzeichnet, der HS-Anteil lag mit 34% auf einem relativ niedrigen Niveau. Für die weiteren Fraktionen ließen sich Werte von 3% (Building Blocks, F.2), 11% (Salzpeak, F.3) und 9% (Proteine und Aminosäuren, F.3) ermitteln. In den Proben $t = 0$, $t = 6$ und 12 Monate des Reaktor H zeigten die Fraktionen F.1 bis F.4 keine relevanten Veränderungen in ihrer Verteilung, die Schwankungsbreite liegt im

Bereich des Messfehlers (Dr. Jahnel, persönliche Mitteilung). Der chromatographierbare Anteil am DOC lag mit Werten zwischen 97% und 99% sehr hoch, der Anteil der HS-Fraktion bewegte sich in einem Bereich von 71% (6 Monate) - 79% (12 Monate). Signifikante Veränderungen der DOC Anteile zeigten sich in den Proben $t = 18$ und $t = 24$ Monate. Der chromatographierbare Anteil sank nach 18 Monaten Inkubation auf sein Minimum von 84% und stieg in den folgenden 6 Monaten wieder auf einen Wert von 89% an. Auch der HS Peak zeigte in der Probe $t = 18$ Mon. seinen Minimalwert von 58%. Bis zum Ende der Inkubation erreichte der HS Anteil wieder einen Wert von 66%. Die Fraktion 3 (Salzpeak) blieb in den ersten 6 Monaten stabil auf ihrem Ausgangswert von 13%, verringerte sich nach 12 Monaten auf 9% und erreichte nach weiteren 6 Monaten ihr Minimum von 6%. Zum Zeitpunkt $t = 24$ Mon. erhöhte sich der Anteil der Fraktion 3 wieder auf 12%. Mit 15% Anteil wurde in der Probe $t = 18$ Mon. die Fraktion 4 (Proteine, Aminosäuren) deutlich höher detektiert als in den anderen Proben des Reaktor H. Der Anteil der Building Blocks (HS Grundeinheiten, wie z.B. hochsubstituierte aromatische Säuren) am DOC zeigte über den gesamten Messzeitraum einen kontinuierlichen Anstieg von 3% ($t = 0$) auf 6% ($t = 24$). Die Fraktionen 5 (Polysaccharide) und 6 (anorganische Kolloide) konnten in allen untersuchten Lösungen nicht als Bestandteil des DOC detektiert werden.

3.2.5 BDOC Bestimmung

In Abb. 3.2.5 sind die prozentualen Veränderungen des DOC und des log der Gesamtzellzahl der BDOC Untersuchungen dargestellt. In den Ansätzen mit einer HS Konzentration von 50 mg/l, 100 mg/l und 500 mg/l konnte über den Versuchszeitraum von 14 Tagen eine Abnahme des DOC um etwa 10% des Ausgangswertes ermittelt werden. Zu einer Zunahme des DOC von durchschnittlich 8% kam es in den Ansätzen mit einer HS Konzentration von 10 mg/l. Die Gesamtzellzahlen zeigten in den Ansätzen 10, 50, und 100 mg/l im Mittelwert der Parallelen eine Zunahme zwischen 66,5% und 77,0%. In den Ansätzen mit einer HS-Konzentration von 500 mg/l konnte mit einer Zunahme der Gesamtzellzahlen von 38,5% ein deutlich geringerer Anstieg ermittelt werden.

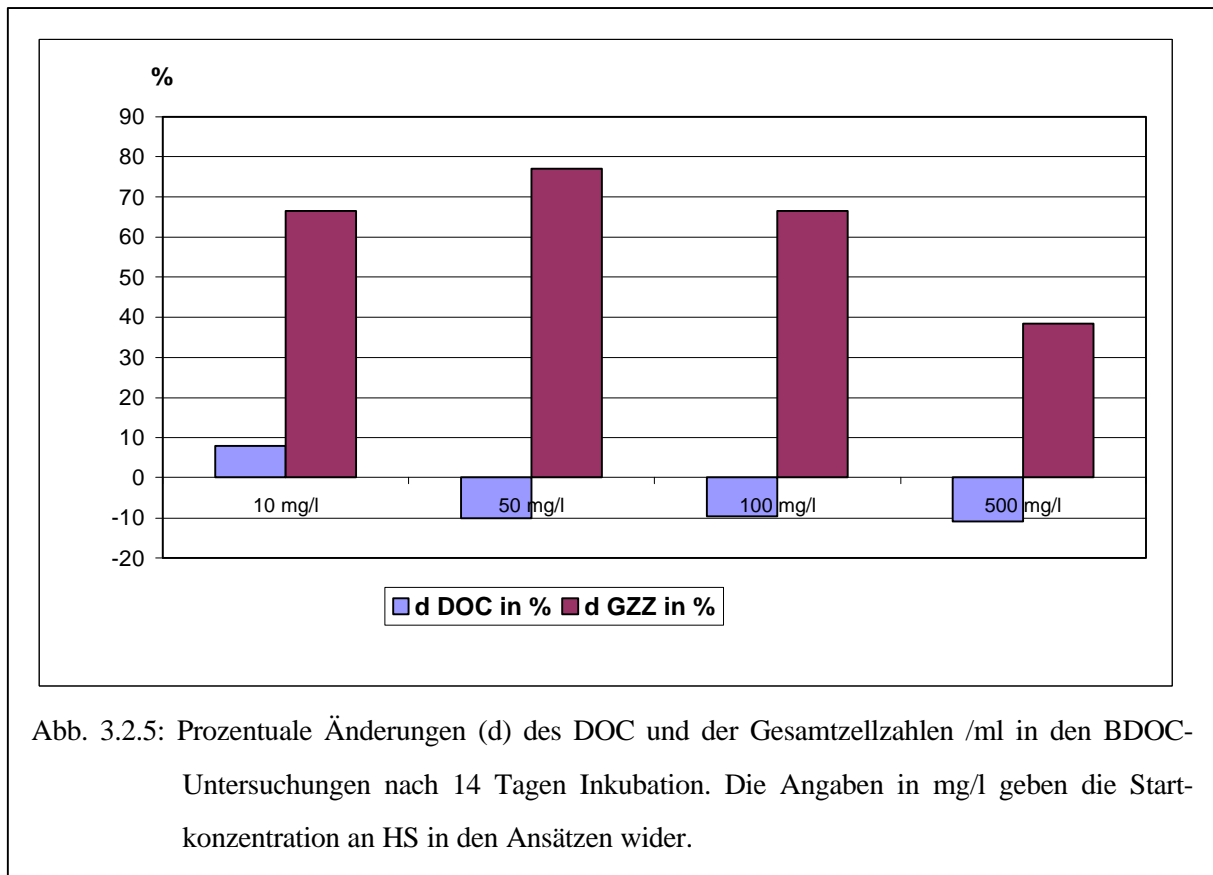


Abb. 3.2.5: Prozentuale Änderungen (d) des DOC und der Gesamtzellzahlen /ml in den BDOC-Untersuchungen nach 14 Tagen Inkubation. Die Angaben in mg/l geben die Startkonzentration an HS in den Ansätzen wider.

3.2.6 Säurehydrolyse der Huminstoffe

Mit Hilfe der Säurehydrolyse wurden die Kohlenhydrat- und Aminosäuren-Kohlenstoffanteile (KH-C bzw. AS-C) als relative Werte in $\mu\text{g}/\text{mg}$ DOC ermittelt. In Abb. 3.2.6 ist der zeitliche Verlauf als Summe der Einzelwerte aus Reaktor H zusammen mit dem DOC aufgetragen, Tab. A 3.2.6 im Anhang gibt die Daten für die einzelnen detektierbaren KH und AS beider Reaktoren wieder. Wie bereits unter Punkt 3.2.4 aufgeführt, war aufgrund des geringen DOC Gehaltes in Reaktor K hier nur eine einmalige Beprobung zum Zeitpunkt $t = 0$ möglich. Der KH-C Anteil des GW/Reaktor K setzt sich lediglich aus den beiden Monosacchariden Fucose und Glucose zusammen, in der Summe beträgt der KH-C 0,24% des DOC. Der DOC des GW war weiterhin durch einen hohen Anteil an Aminosäuren gekennzeichnet, der AS-C beträgt in der Summe 4,21% des DOC. Die Anteile der einzelnen detektierbaren AS lagen zwischen Werten von 0,0% (Methionin) und 0,48% (Leucin), ohne eindeutige Tendenz. Im Reaktor H konnte im zeitlichen Verlauf eine Zunahme der relativen KH-C Anteile nachgewiesen werden. Zwar fiel der Summenwert innerhalb der ersten 6 Monate leicht von 0,19% auf 0,14%, im weiteren Inkubationsverlauf erhöhte er sich jedoch exponentiell, und erreichte nach 24 Monaten Inkubation einen Endwert von 1,24%. Eine eindeutige Tendenz in der Zunahme von

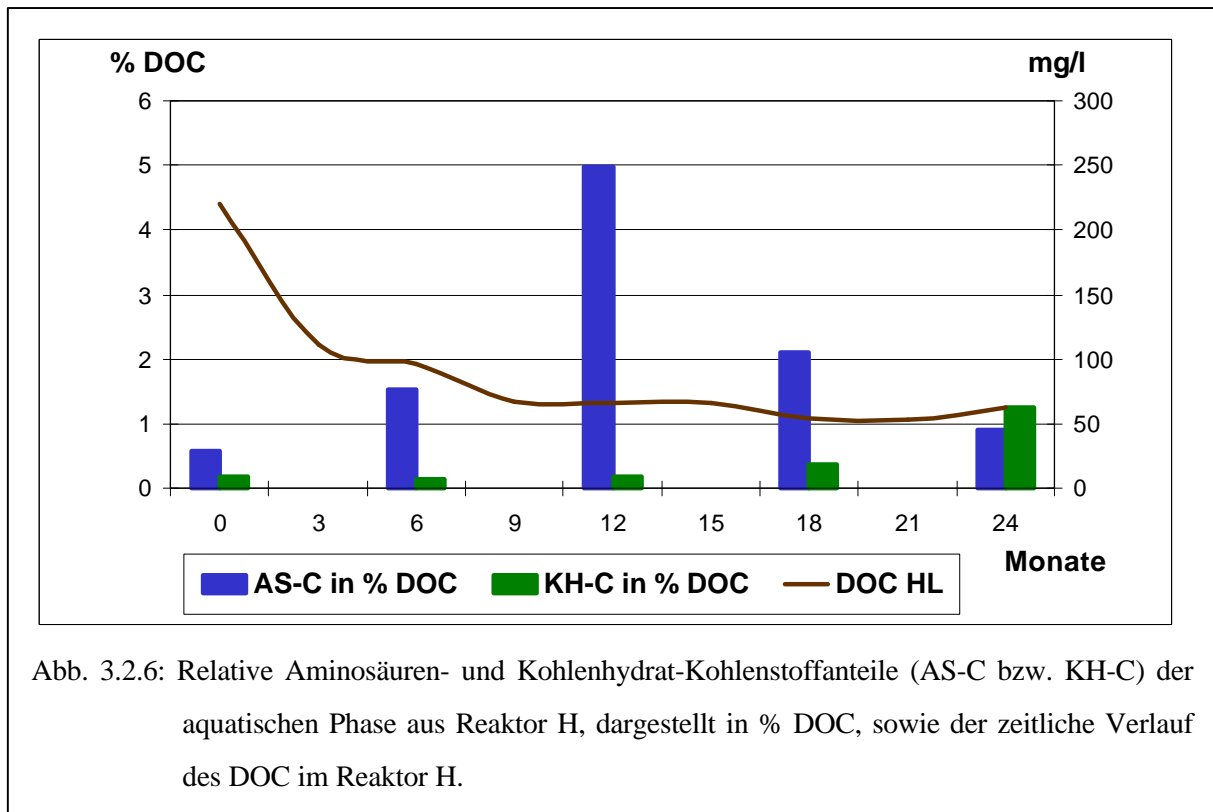


Abb. 3.2.6: Relative Aminosäuren- und Kohlenhydrat-Kohlenstoffanteile (AS-C bzw. KH-C) der aquatischen Phase aus Reaktor H, dargestellt in % DOC, sowie der zeitliche Verlauf des DOC im Reaktor H.

Einzelsubstanzen konnte für Galactose; Fructose, Ribose und Mannose/Xylose während der letzten 12 Monate Inkubation gezeigt werden. Eine Zunahme bakterienbürtiger KH (Fucose und Rhamnose) konnte nicht verzeichnet werden. Für alle weiteren KH war keine eindeutige Tendenz in Zu- oder Abnahme zu verzeichnen (s. Tab. A 3.2.6, Anhang). Die Verteilung des AS-C zeigte sowohl in der Summe, als auch für nahezu alle Einzelsubstanzen (Ausnahmen: Prolin und Methionin) den gleichen, glockenförmigen Verlauf. Bis zum Zeitpunkt $t = 12$ Monate stiegen die Werte stark an, in der Summe von 0,59% ($t = 0$) auf 4,97% ($t = 12$ Monate). Die Abnahme des AS-C/DOC verlief in einer etwas leichteren Form; nach 24 Monaten Inkubation wurde der Endwert von 0,91% ermittelt.

3.2.7 Pyrolyse-FIMS der Huminstoffe

Durch die Koppelung verschiedener Detektionsmethoden ermöglicht es die Pyrolyse-Feldionisations-Massenspektrometrie (Py-FIMS) unterschiedliche Aussagen zu den untersuchten Substanzen zu treffen. Die Massenspektren zeigen die Molekülgröße der in der Pyrolyse entstandenen Substanzen an, die Thermogramme geben Auskunft über die Temperaturbereiche, in denen die Substanzen verdampfen und es lassen sich anhand des Totalionenstroms Substanzklassen identifizieren. Die Daten beziehen sich nur auf Reaktor H, aufgrund zu geringer Probenmengen konnte eine Py-FIMS der Probe $t = 12$ Monate nicht durchgeführt werden.

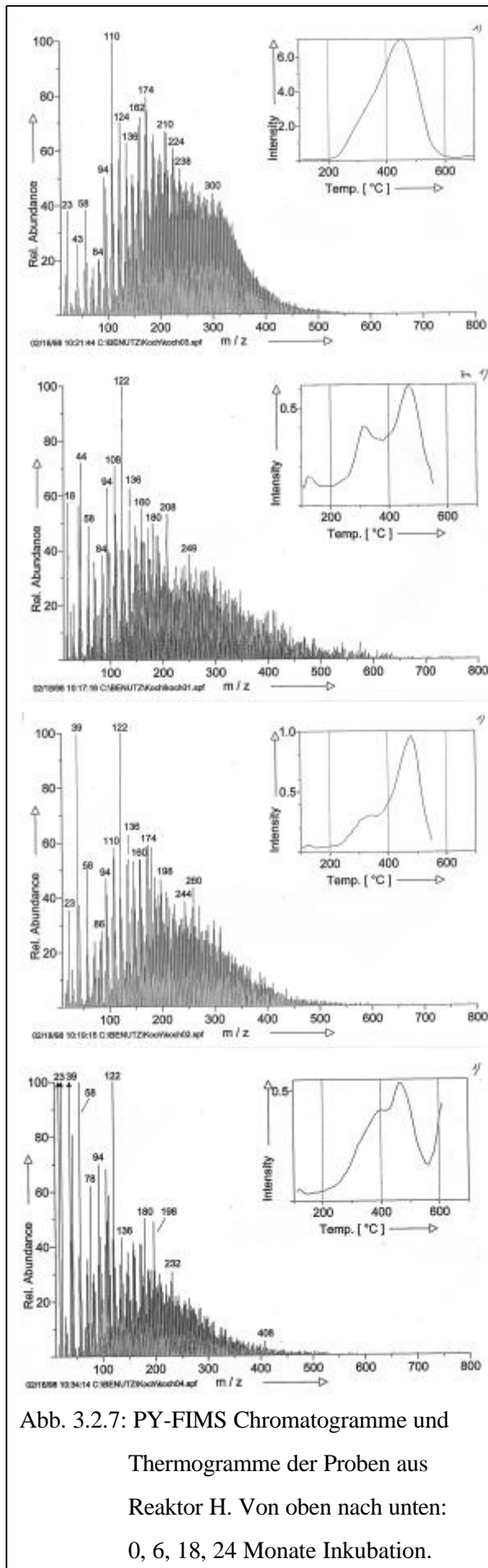


Abb. 3.2.7: PY-FIMS Chromatogramme und Thermogramme der Proben aus Reaktor H. Von oben nach unten: 0, 6, 18, 24 Monate Inkubation.

Ein Vergleich der MS Spektren (Abb. 3.2.7) zeigt im zeitlichen Verlauf eine deutliche Verschiebung der Pyrolysate zu Substanzen mit einer geringeren Massenzahl. Der Hauptanteil der Pyrolysate lag bei der Probe $t = 0$ Monate in einem Massenbereich zwischen 120 m/z und 350 m/z. Bereits die Probe $t = 6$ Monate war durch eine verringerte Intensität in diesem Bereich und eine Verschiebung in Richtung niedermolekularer Teile charakterisiert. Es fand sich weiterhin ein schwaches Tailing in Richtung hochmolekularer Substanzen > 400 m/z. Das Massenspektrum $t = 18$ Mon. zeichnete sich durch eine weitere Abflachung der Intensitäten und einen Hauptteil der Substanzen im Massenbereich zwischen 100 m/z und 320 m/z aus. Die Pyrolysebruchstücke der Probe $t = 24$ Monate lagen bei nochmals deutlich verringerten Intensitäten in einem Bereich zwischen 40 m/z und 300 m/z.

Den Thermogrammen aller vier Proben gemeinsam war die maximale Intensität der Verflüchtigung in einem Temperaturbereich zwischen 460°C und 480°C, wobei die Probe $t = 0$ Mon. die höchste Intensität und mit 60,6% auch den höchsten Anteil an verflüchtigtem Material (VM) aufwies. Die VM Anteile der anderen Proben lagen zwischen 28,2% und 25,0% (s. Tab. 3.2.7).

Betrachtet man die prozentualen Änderungen der detektierbaren Substanz-

klassen für alle Probenahmen ($t = 0 = 100\%$), so zeigten sich mit zunehmender Inkubationszeit klare Veränderungen in der Zusammensetzung des DOC. Es kam zu einer konstanten und deutlichen Abnahme lipophiler Substanzen wie z.B. Lipide, Lignin-Dimere und Fettsäuren. Die anfängliche Verringerung der Kohlenhydrate und Phenyl-Lignin-Monomere kehrte sich nach 24 Monaten Inkubation in eine Zunahme um. Der umgekehrte Trend, mit einer Zunahme zum Zeitpunkt $t = 6$ Monate und einer Abnahme bei $t = 24$ Monate, konnte für die höhermolekularen Sterole und Suberin nachgewiesen werden. Durchgehend höhere Anteile, verglichen mit dem Startwert, wurden für die hydrophileren Substanzgruppen wie den N-Aromaten und besonders für die Peptide detektiert. Letztere zeigten mit einer Zunahme ihres Anteils von 168,8% über den gesamten Versuchszeitraum die stärkste Veränderung (s. Tab. 3.2.7).

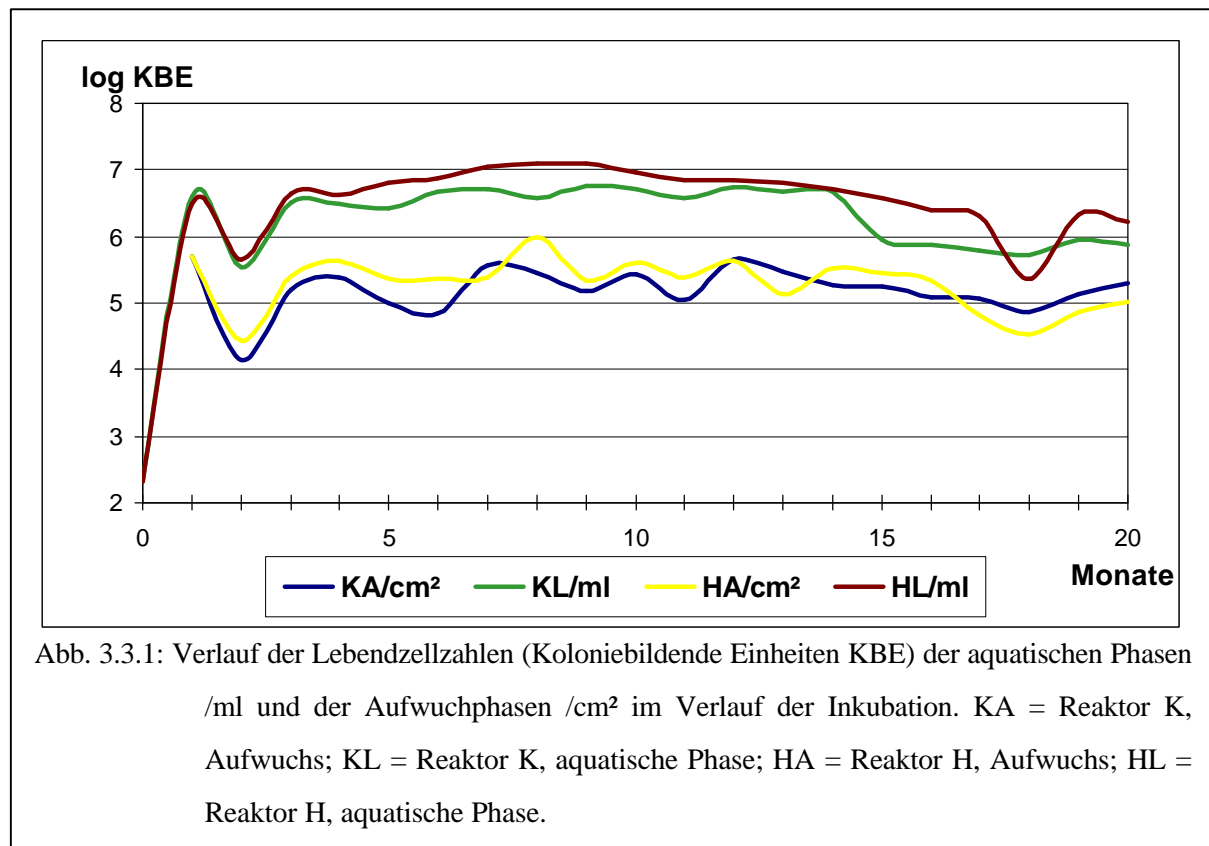
Tab 3.2.7: Anteil verflüchtigtes Material (VM) und Änderung der Substanzklassen 1-10 in % Total Ionen Intensität (TII). In Klammern prozentuale Änderung zu $t = 0$ Mon. = 100% in der Py-FIMS.

	t = 0 Mon.	t = 6 Mon.	t = 18 Mon.	t = 24 Mon.
VM in %	60,6	28,2	25,8	25,0
Anteil der Substkl. 1-10 in % TII	57,9	45,9	55,6	50,7
Total Ionen Intensität (TII)	126970	12946	13795	11442
1: Kohlenhydrate	5,5	4,8 (-12,7)	5,4 (-1,2)	6,4 (+16,4)
2: Ph.-Lig.-Monomere	11,5	9,6 (-16,5)	11,8 (+2,6)	12,5 (+8,7)
3: Lignin-Dimer	6,9	3,6 (-47,8)	5,9 (-14,5)	3,0 (-56,5)
4: Lipide	10,0	6,3 (-37,0)	8,4 (-16,0)	5,2 (-48,0)
5: Alkylaromaten	14,0	9,3 (-33,6)	13,0 (-7,1)	11,9 (-15,0)
6: N-Aromaten	5,0	5,3 (+6,0)	5,6 (+12,0)	6,1 (+22,0)
7: Sterole	1,8	2,4 (+33,3)	1,8 ($\pm 0,0$)	0,7 (-61,1)
8: Peptide	1,6	3,1 (+93,8)	2,8 (+75,0)	4,3 (+168,8)
9: Suberin	0,2	0,4 (+100,0)	0,2 ($\pm 0,0$)	0,1 (-50,0)
10: Fettsäuren	1,3	1,0 (-23,1)	0,8 (-38,5)	0,5 (-61,5)
Summe	57,9	45,9 (-20,3)	55,6 (-4,0)	50,7 (-12,4)

3.3 Mikrobiologische Untersuchungen

3.3.1 Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE)

In logarithmischer Darstellung zeigt Abb. 3.3.1 den Verlauf der Lebendzellzahl in den Reaktoren für die aquatische Phase und den Aufwuchs auf den Glaskugeln. Da die erste Probenahme direkt nach dem Ansetzen der Reaktoren erfolgte, wurde auf eine Beprobung des Aufwuchses verzichtet, da mit keiner Besiedlung der Glaskugeln in diesem kurzen Zeitraum zu rechnen war. Innerhalb des ersten Monats Inkubation war ein starker Anstieg der KBE in der aquatischen Phase zu verzeichnen. Die Werte stiegen von $\log 2,31$ /ml auf $\log 6,61$ /ml (KL) bzw. $\log 6,50$ /ml (HL). Der Inkubationszeitraum 3.-14. Monat war in beiden Reaktoren durch einen relativ stabilen KBE Verlauf in der aquatischen Phase gekennzeichnet. Die Werte schwankten hier nur leicht in Bereichen von $\log 6,64$ /ml - $7,10$ /ml (HL) bzw. $\log 6,51$ /ml -

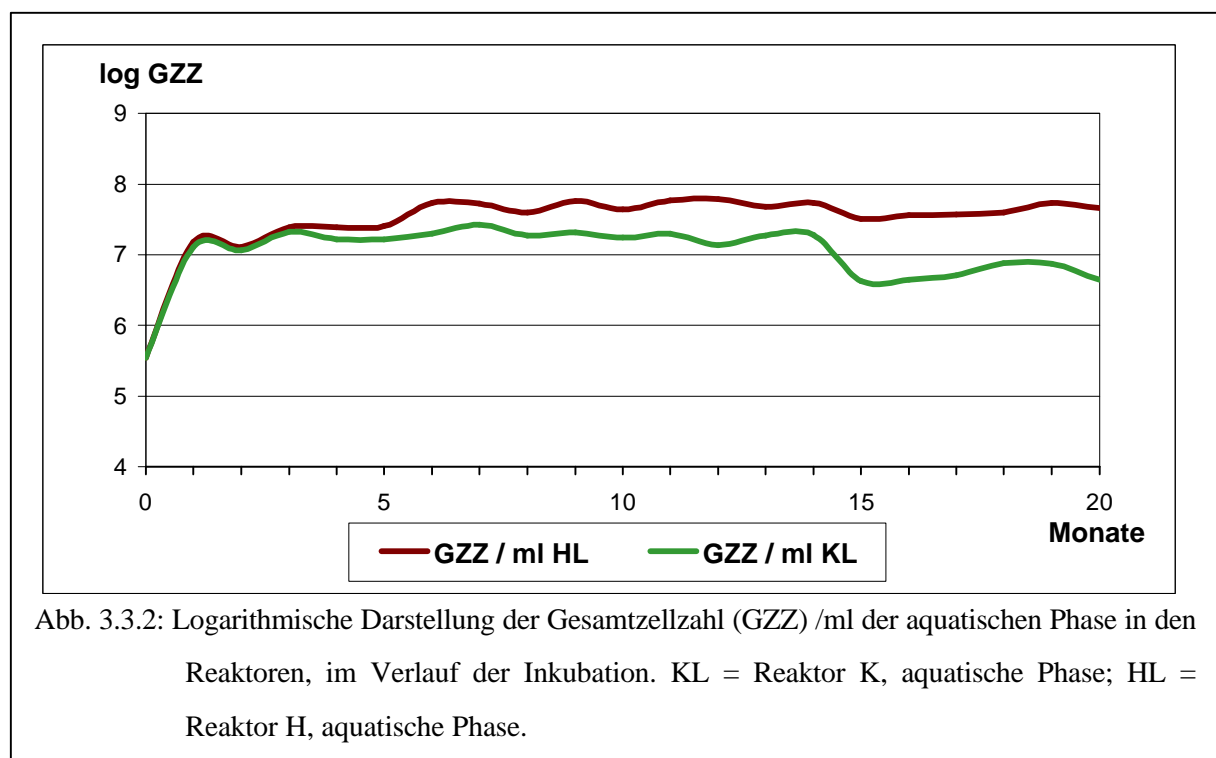


$6,76$ /ml (KL), der Reaktor H zeigte durchgehend höhere Werte als der Reaktor K. Ab dem Inkubationsmonat 15 sanken die Lebendzellzahlen in beiden Reaktoren ab. Im Reaktor K sprunghaft um ca. $\log 0,7$ auf $\log 5,94$ /ml, hier verblieben die Werte bis zum Ende der Inkubation auf dem Niveau $\log 5,72$ /ml - $5,94$ /ml. Der Abfall im Reaktor H verlief langsamer, mit einem einmaligen Einbruch um eine Zehnerpotenz (Monat 18), und endete bei einem Wert von $\log 6,21$ /ml. Die KBE Entwicklung /cm² auf den Glaskugeln folgte einem ähnlichen

Verlauf wie die der aquatischen Phase, war jedoch stärkeren Schwankungen unterlegen. Nach drei Monaten Inkubation stabilisierten sich die Werte und für den Zeitraum 3.-12. Monat wurde ein Niveau von $\log 4,85 / \text{cm}^2 - 5,65 / \text{cm}^2$ (KA) bzw. $\log 5,35 / \text{cm}^2 - 6,00 / \text{cm}^2$ (HA) erreicht. Die Differenzen zwischen beiden Reaktoren waren weniger deutlich ausgeprägt als in der aquatischen Phase. Nach 7 und 13 Monaten Inkubation lagen die Werte des Reaktor K über denen von Reaktor H. Ein leichter Abwärtstrend der Lebendzellzahlen in dem Zeitraum 13.-18. Monat Inkubation wurde in Reaktor K gemessen, zum Ende der Messzeit stiegen die Werte wieder leicht an. In Reaktor H fielen die KBE Werte ab Monat 15 ab, sie erreichten nach dem 18. Monat ihren Minimalwert von $\log 4,52 / \text{cm}^2$ und stiegen ebenfalls zum Ende des Versuchszeitraums wieder an, sie lagen ab Monat 16 unter denen des Reaktor K.

3.3.2 Gesamtzellzahl-Bestimmung mit Acridinorange

Die Bestimmung der Gesamtzellzahl (GZZ) mittels AODC (Acridinorange Direct Counts)



wurde nur für die aquatische Phase der Reaktoren durchgeführt, da bei den Präparationen des Aufwuchses der Glaskugeln ein zu stark fluoreszierender Hintergrund auftrat und eine Auszählung der Zellen nicht möglich war. Ausgehend von einem Wert von $\log 5,54 / \text{ml}$, zu Beginn der Inkubation, erhöhte sich die GZZ innerhalb eines Monats auf $\log 7,11 / \text{ml}$ (KL) bzw. $7,18 / \text{ml}$ (HL) (s. Abb. 3.3.2). Wie bereits unter 3.3.1 für die KBE beschrieben, stellte sich auch für die GZZ im Reaktor K in dem Zeitraum 3.-14. Monat ein stabiles Verhältnis mit

Werten zwischen $\log 7,22$ /ml - $7,42$ /ml ein. Mit dem Inkubationsmonat 15 sank hier die GZZ um ca. $\log 0,6$ auf $6,63$ /ml, und blieb bis zum Ende der Versuchsdauer in einem Bereich zwischen $\log 6,64$ /ml - $6,88$ /ml. Die Gesamtzellzahlen des Reaktor H blieben während der gesamten Versuchsdauer mit leichten Schwankungen in einem Bereich zwischen $\log 7,32$ und $7,79$ /ml. Sie lagen während der gesamten Inkubationszeit über denen des Reaktor K.

3.3.3 MPN-Bestimmung

Aufgrund methodischer Schwierigkeiten (s. 4.1 Methodendiskussion) wurde das MPN-Verfahren nur für das GW und die Probenahmen 6. und 12. Monat durchgeführt. Mit Ausnahme der Schwefeloxidierer (S-OX) des Grundwassers lagen die mit der MPN ermittelten Zellzahlen immer unter den KBE Werten auf P-Agar. Die physiologische Gruppe der Eisenreduzierer (Fe-RED) konnte in keiner der Proben nachgewiesen werden. Im Vergleich zum GW kam es nach 6 Monaten Inkubation für die folgenden physiologischen Gruppen an allen Standorten (HL, HA, KL, KA) zu einer Zunahme der Zellzahlen: Denitrifizierer (DEN), Nitrifizierer 2. Stufe (NO_2 -OX), Eisenoxidierer (Fe-OX), Manganoxidierer und -reduzierer (Mn-OX, Mn-RED). Die Anzahl der Schwefeloxidierer (S-OX) nahm ab, die Nitrifizierer 1. Stufe (NH_4 -OX) konnten nur an einem (HLA), die Sulfatreduzierer (SO_4 -RED) nur an zwei Standorten (HLA, HAA) nachgewiesen werden (s. Tab. 3.3.3). Nach einem Jahr Inkubation waren lediglich die physiologischen Gruppen NO_2 -OX, S-OX und Mn-RED in den Reaktoren nachweisbar. Auch hier lagen die Zellzahlen im Vergleich zum GW höher, mit Ausnahme der Gruppe S-OX des Standortes KLB. Verglichen mit den Daten nach 6 Monaten Inkubation lagen einige MPN Werte höher, andere niedriger, ohne dass eine eindeutige Tendenz bezüglich des Standortes (Aquatisch oder Aufwuchs) oder des Reaktors zu erkennen war.

3.3.4 Isolierung der Reinkulturen, Stammhaltung

Von jedem Standort jeder Probennahme sollten 60, aus dem Grundwasser 80 Reinkulturen, von P-Agarplatten der KBE Bestimmung isoliert werden. In einigen Fällen lies sich nach der zweiten bis vierten Passage kein Wachstum der Isolate auf dem Festmedium mehr feststellen, sodass für die Diversitätsbestimmungen jeweils 45 Isolate, bzw. 63 für das GW, verwendet wurden. Insgesamt wurden 800 Reinkulturen isoliert, von denen 603 weiter untersucht wurden. Native und fixierte mikroskopische Präparate dieser Isolate dienen zur Überprüfung der Reinheit der Kulturen und der Bestimmung zellmorphologischer Eigenschaften wie Gramverhalten, Zellgröße, Beweglichkeit und Zellform und -anordnung.

Bis zur Verwendung in den physiologischen und molekularbiologischen Tests erfolgte eine Konservierung in dem MicroBank™-System. Durch erneutes Ausplattieren einzelner Kugeln auf P-Agar konnten die Isolate auch nach zwei Jahren Lagerung wieder zum Wachstum gebracht werden.

3.3.5 Kolonie- und zellmorphologische Bestimmung

Koloniemorphologisch wiesen die untersuchten Reinkulturen nur geringe Unterschiede auf. Über 90% der Kolonien waren, nach 7- bis 14-tägigem Wachstum, durch einen punktförmigen Habitus < 1 mm, flach-konvexe Form mit glatter Oberfläche, glänzender Optik, weicher Konsistenz und einer grau-beigen Färbung gekennzeichnet. Vereinzelt traten orange und gelb pigmentierte Kolonien auf, letztere zunehmend mit fortschreitender Versuchsdauer. Als einzige Ausnahme bildeten die beiden Stämme HAA 6 und 23 (*Actinomyces*) diffusible Pigmente, einen erdigen Geruch und ein Luft- und Substratmycel aus.

Tab. 3.3.3: Log der Zellzahlen der physiologischen Gruppen /ml.

	DEN	NH4-OX	NO2-OX	S-OX	SO4-RED	Fe-OX	Fe-RED	Mn-OX	Mn-RED
OP	0,81	2,30	0,00	2,54	0,74	0,48	0,00	1,24	0,65
HLA	3,68	1,81	2,18	2,44	1,18	5,48	0,00	5,81	6,30
HAA	2,40	0,00	1,00	1,90	1,54	4,68	0,00	3,24	4,24
KLA	5,24	0,00	1,40	1,18	0,00	4,93	0,00	5,24	6,18
KAA	1,60	0,00	1,18	0,00	0,00	2,00	0,00	3,81	3,18
HLB	0,00	0,00	0,65	5,24	0,00	0,00	0,00	0,00	6,24
HAB	0,00	0,00	1,60	2,81	0,00	0,00	0,00	0,00	3,90
KLB	0,00	0,00	1,00	0,90	0,00	0,00	0,00	0,00	2,81
KAB	0,00	0,00	0,40	2,92	0,00	0,00	0,00	0,00	3,90

Innerhalb der ersten sechs Monate Inkubation konnte eine starke Verschiebung für die zellmorphologischen Eigenschaften der Isolate beobachtet werden. In dem Ausgangsgrundwasser (OP) zeigte sich mit 69,9% eine Dominanz gram positiver Isolate, 14,3% waren gram negativ und 15,8% gram variabel (s. Tab. A 3.3.5, Anhang). In den Reaktoren betrug der Anteil gram positiver Bakterien an den Isolaten nach einem halben Jahr Inkubation lediglich 22,2% (KAA) bzw. 11,1% (HAA) im Aufwuchs und 2,2% in der aquatischen Gemeinschaft des Reaktors H. Im weiteren Verlauf befanden sich unter den Isolaten keine weiteren Bakterien mit einem positiven oder variablem Gramverhalten. Bei den gram positiven Isolaten des Standortes KAA handelte es sich ausschließlich um sporenbildende, bewegliche Stäbchen mit einer Länge zwischen 1,3 und 3,3µm. Diesem Zelltyp entsprachen auch 59,9% der gram positiven Isolate des Grundwassers. Über den gesamten Versuchszeitraum herrschten Stäbchen vor (min: 44,4% KLC - max: 93,4% HLB), als weitere Zellformen traten kokkoide (2,2% HLB - 33,2% HAB) und gekrümmte Stäbchen (0,0% KAA - 33,2% HAC) auf. Fädige Organismen fanden sich mit einem Anteil von 2,2% (HLC) und 4,4% (KLC) nur nach 18 Monaten Inkubation als frei flottierende Organismen in beiden Reaktoren. An allen vier Standorten stieg der Anteil gekrümmter Stäbchen im Laufe der Inkubation an, in der aquatischen Phase deutlich stärker als im Aufwuchs. Kokken waren während der gesamten Versuchsdauer nicht unter den Isolaten vertreten. Die Fähigkeit der Isolate zur Geißelbewegung nahm mit zunehmender Inkubationszeit ab, besonders stark war dieser Effekt bei den Aufwuchsisolaten des Reaktors H zu beobachten, die Beweglichkeit der MO verringerte sich hier von 95,2% (OP) auf 26,7% (HAC). Das mikroskopische Bild der Zellgruppierungen war mit Ausnahme der Proben KLC, KAB und KAC durch einen hohen Anteil von > 90% einzeln liegender Zellen geprägt. Zu einem geringen Prozentsatz traten kettenförmige, paarweise vorliegende oder Klumpen bildende Organismen auf. In den Proben KLC und KAC wurden mit 2,2% bzw. 15,6% MO gefunden, die sich rosettenförmig zusammenlagerten. In der Probe KAB zeigten sich mit einem Anteil von 8,9% Organismen, die sich teilweise zu Fäden ohne deutliche Unterteilung zusammenfügten.

3.3.6 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Isolate

Die Fähigkeiten der Isolate die angebotenen Substrate zu verwerten, ihre enzymatische Potenz und das Wachstum unter veränderten physikalischen Bedingungen ist in Abb. 3.3.6a-d und Tab A 3.3.6 (Anhang) für die einzelnen Gemeinschaften zusammengefasst. Mit Ausnahme der Zellulose und der Arginindehydrolase wurde für alle biochemischen Tests ein positives Ergebnis durch mindestens ein Isolat nachgewiesen. Verglichen mit den biochemischen

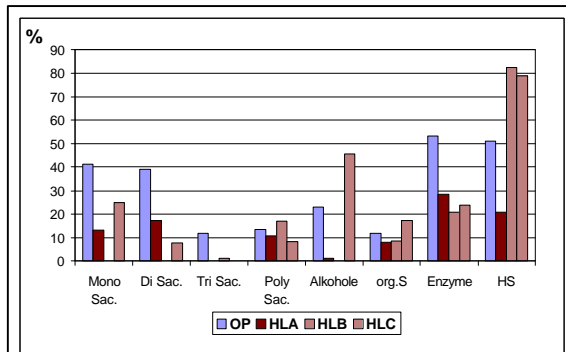


Abb. 3.3.6a: Verwertungsspektrum der Gemeinschaften HI..

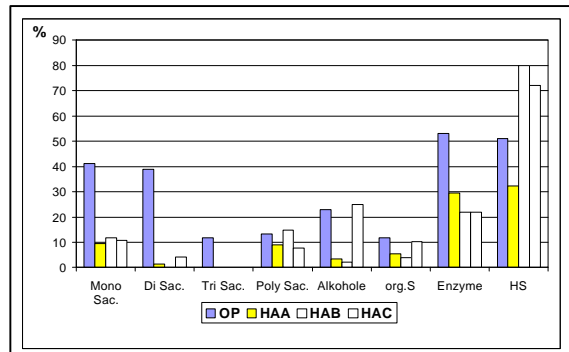


Abb. 3.3.6b: Verwertungsspektrum der Gemeinschaften HA.

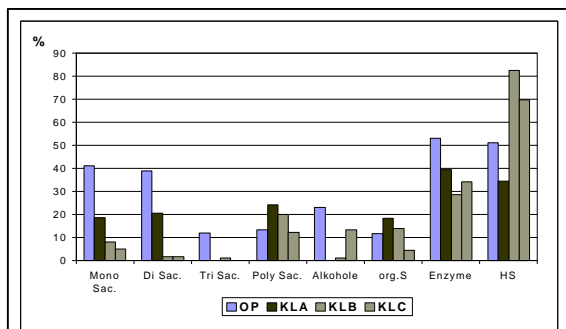


Abb. 3.3.6c: Verwertungsspektrum der Gemeinschaften KL.

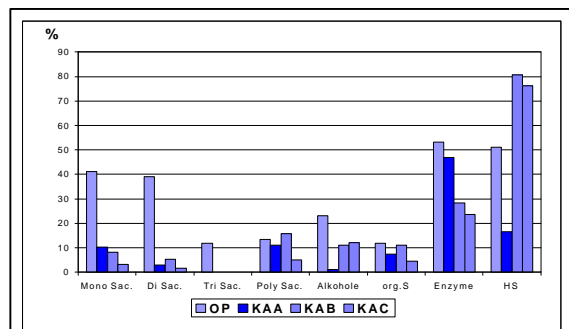


Abb. 3.3.6d: Verwertungsspektrum der Gemeinschaften KA.

Aktivitäten der Gemeinschaft des Ausgangsgrundwassers (OP) zeigten in den Gemeinschaften HLA-KAC eine geringere Anzahl an Isolaten die Fähigkeit zur Verwertung der angebotenen Substrate. Lediglich die Verwertung, der im folgenden aufgeführten Substanzgruppen, konnte von einem höheren Prozentsatz an Isolaten aus den Gemeinschaften der Reaktoren (in Klammern die entsprechenden Gemeinschaften) genutzt werden:

- Polysaccharide (HLB, HAB, KLA, KLB, KAB)
- Alkohole (HLC, HAC)
- organische Säuren (HLC, KLA, KLB)
- HS, mit und ohne Cosubstrat (HLB, HLC, HAB, HAC, KLB, KLC, KAB, KAC).

Die isolierten Gemeinschaften der aquatischen Phase zeigten in beiden Reaktoren für die Substratgruppe der Kohlenhydrate und der organischen Säuren ein höheres Verwertungspotential als die Gemeinschaften des Aufwuchses. Das Potential der Gemeinschaften zur lipolytischen Aktivität (Tween 20-80) und zum Proteinabbau (GEL, CAS) lag in dem Kontrollreaktor in der Summe über denen des Reaktor H. Für die weiteren Substanzgruppen und Wachstumsbedingungen konnten, weder zwischen den beiden Reaktoren, noch zwischen den Isolaten des Aufwuchses und denen der aquatischen Phase eindeutige Tendenzen festgestellt werden. Im zeitlichen Verlauf nahm, mit Ausnahme der Gemeinschaften HL, die Fähigkeit der Isolate die Testsubstrate zu verwerten ab. Diese verringerte biochemische Potenz

während der Inkubation spiegelt sich in den, aus 64 stoffwechselphysiologischen Tests, berechneten *in vitro* Aktivitäten der Gemeinschaften wider (s. Abb. 3.3.6e-q). Die Gemeinschaft OP zeigte mit einer mittleren *in vitro* Aktivität von 35,9% den höchsten Wert an biochemischer Aktivität. Die mittleren Gesamtaktivitäten der Gemeinschaften lagen nach 6 Monaten Inkubation auf einem deutlich niedrigeren Niveau. Besonders stark war dieser Rückgang in dem Reaktor H, hier wurden Mittelwerte von 17,6% (HAA) bzw. 18,9% (HLA) aus den Daten errechnet, während im Reaktor K die Werte 23,2% (KAA) und 28,4% (KLA) betragen. Im zeitlichen Verlauf änderten sich die Verhältnisse, die mittleren *in vitro* Aktivitäten der aquatischen Gemeinschaften aus Reaktor H stiegen auf 25,4% (HLC), die des Aufwuchses stagnierten bei 18,5%. In dem Kontrollreaktor konnte eine kontinuierliche Verminderung der Aktivitäten ermittelt werden. Der Mittelwert der aquatischen Gemeinschaften sank auf 21,3% (KLC), der des Aufwuchses auf 17,2%.

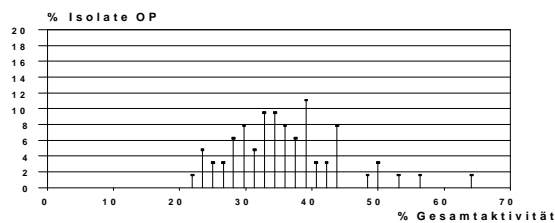


Abb. 3.3.6e: *In vitro* Aktivitäten der Isolate OP. Mittelwert: 35,9.

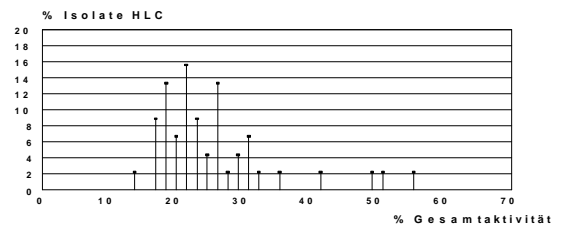


Abb. 3.3.6h: *In vitro* Aktivitäten der Isolate HLC. Mittelwert: 25,4.

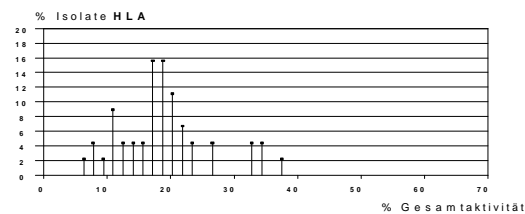


Abb. 3.3.6f: *In vitro* Aktivitäten der Isolate HLA. Mittelwert: 18,9.

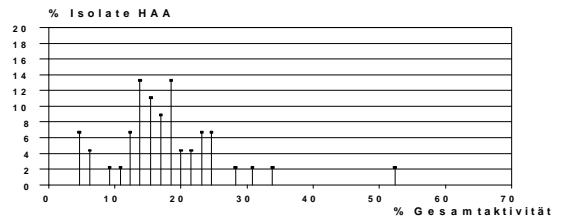


Abb. 3.3.6i: *In vitro* Aktivitäten der Isolate HAA. Mittelwert: 17,6.

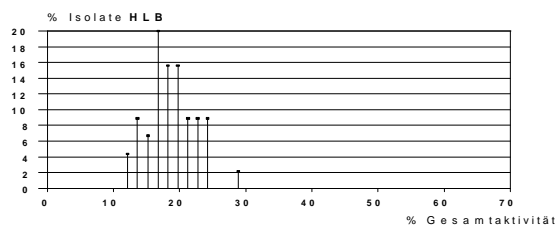


Abb. 3.3.6g: *In vitro* Aktivitäten der Isolate HLB. Mittelwert: 18,7.

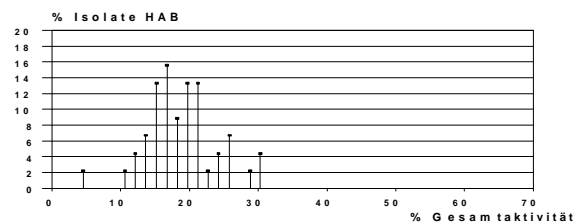


Abb. 3.3.6j: *In vitro* Aktivitäten der Isolate HAB. Mittelwert: 18,8.

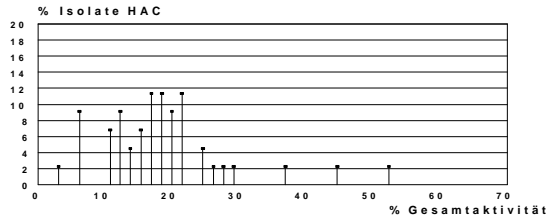


Abb. 3.3.6k: *In vitro* Aktivitäten der Isolate HAC. Mittelwert: 18,5.

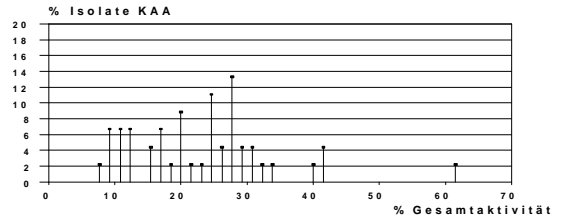


Abb. 3.3.6o: *In vitro* Aktivitäten der Isolate KAA. Mittelwert: 23,2.

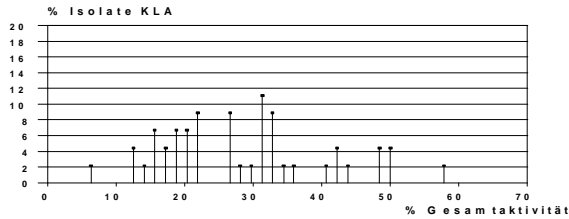


Abb. 3.3.6l: *In vitro* Aktivitäten der Isolate KLA. Mittelwert: 28,4.

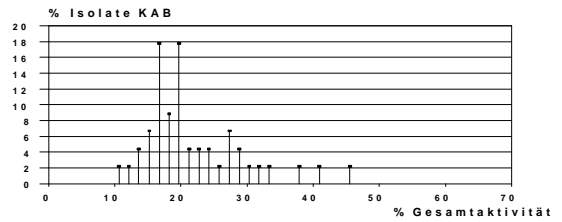


Abb. 3.3.6p: *In vitro* Aktivitäten der Isolate KAB. Mittelwert: 21,8.

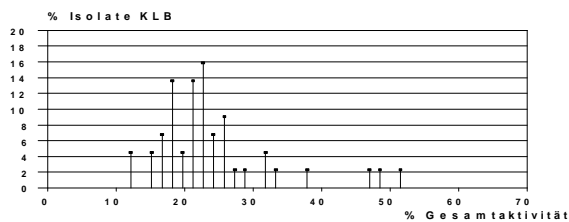


Abb. 3.3.6m: *In vitro* Aktivitäten der Isolate KLB. Mittelwert: 23,9.

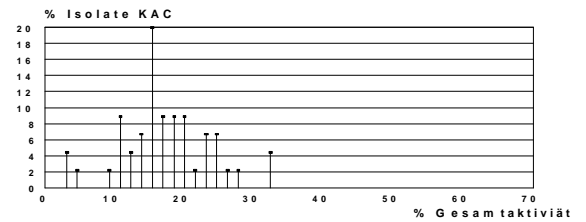


Abb. 3.3.6q: *In vitro* Aktivitäten der Isolate KAC. Mittelwert: 17,2.

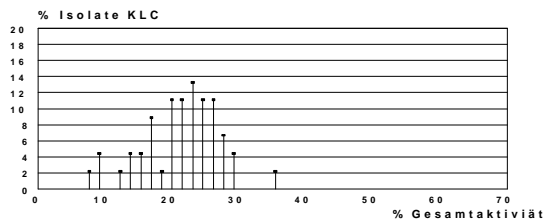
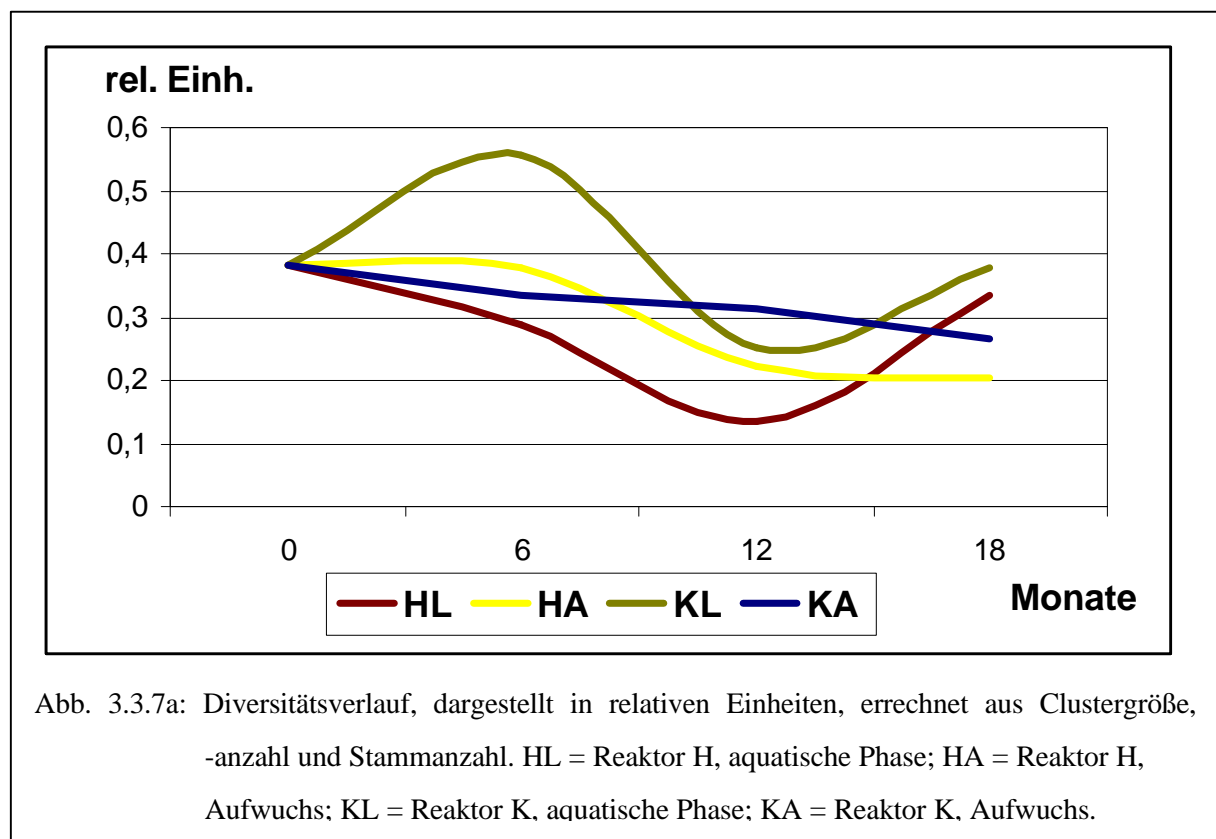


Abb. 3.3.6n: *In vitro* Aktivitäten der Isolate KLC. Mittelwert: 21,3.

3.3.7 Clusteranalyse

Zur Berechnung der Clustermatrizen und Dendrogramme wurden die unter 3.3.5 und 3.3.6 ermittelten Daten zusammengefasst. Nach der Berechnung erfolgte eine manuelle Einteilung der Isolate in gemeinsame Cluster mit einer Ähnlichkeit $\geq 90\%$. Isolate, die nicht einem Cluster zugeordnet werden konnten, sind als Einstammcluster anzusehen. Exemplarisch sind in den Abb. 3.3.7b und c die Clustermatrizen und Abb.3.3.7d und e Dendrogramme für die Standorte HAA und KAA dargestellt. Die Verteilung der Clusteranzahl, die durchschnittliche Clustergröße sowie die relative Diversitätseinheit, als Quotient aus der Summe Einstamm- plus Mehrstammcluster pro Stammanzahl (n) aller Gemeinschaften, findet sich in Tab. A 3.3.7



(Anhang), in Abb. 3.3.7a ist der Quotient graphisch dargestellt. Das Auftreten einer hohen Clusteranzahl mit geringer Größe und das Vorhandensein vieler Einstammcluster lassen auf eine hohe Diversität innerhalb der entsprechenden Gemeinschaft schließen. Im Verlauf der Inkubation konnte für die Gemeinschaften ein leicht unterschiedliches Verhalten bezüglich ihrer Diversitätsprofile gezeigt werden. Die Gemeinschaften HL, HA und KL zeigten einen wellenförmigen Verlauf, mit einer Talsohle nach 12 Monaten Inkubation und einem Wiederanstieg zum Zeitpunkt 18 Monate. Die Ausprägung dieser Profile war unterschiedlich stark, in der Gemeinschaft KL errechnete sich nach 6 Monaten Inkubation der höchste

Diversitätswert aller Gemeinschaften. Die Diversitätsänderungen des Aufwuchses im Reaktor K waren durch ein konstantes, leichtes Absinken gekennzeichnet.

Vergleichende, gemeinsame Clusterungen der Daten gleicher Standorte aus den Reaktoren eines Probenahmetermins (z.B. HLC-KLC) führten nur in wenigen Fällen zu einer Bildung von Mischclustern, in denen Bakterien beider Reaktoren in einem Cluster zusammengefasst wurden. Dieser Effekt konnte auch bei der gemeinsamen Clusterung von zwei gleichen Standorten unterschiedlicher Probenahmetermine (z.B. HAA-HAB) beobachtet werden. Auch innerhalb eines Reaktors waren die Isolate der beiden Phasen aquatisch / Aufwuchs, nur zu einem geringen Anteil in gemeinsamen Clustern vertreten. In allen Fällen waren die Mischcluster durch die Dominanz der Isolate eines Standortes / Probenahmetermins charakterisiert.

Angaben in Prozent, * = 100 %

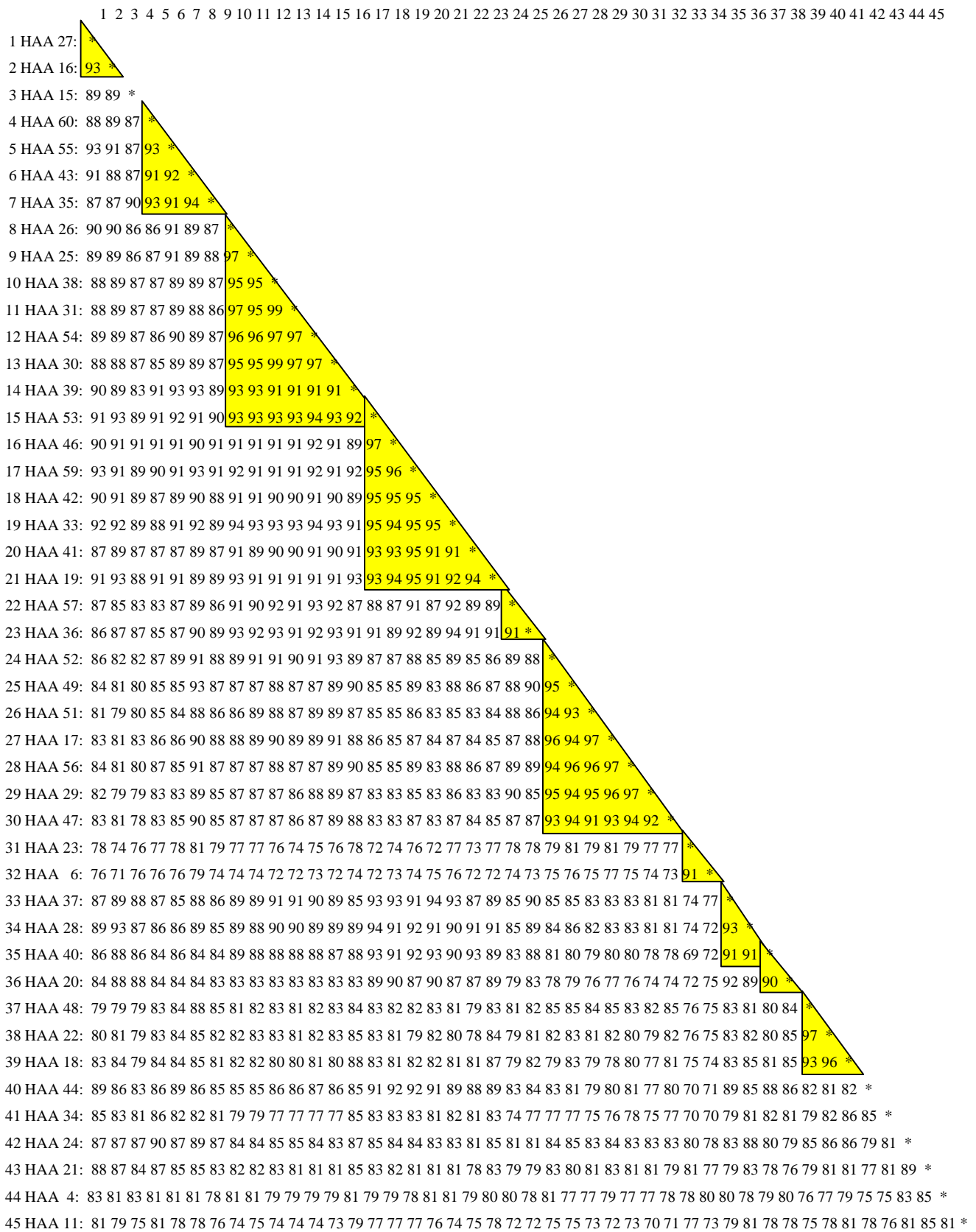


Abb. 3.3.7b: Dendrogramm der Gemeinschaft HAA, Cluster sind gelb unterlegt.

Angaben in Prozent, * = 100 %

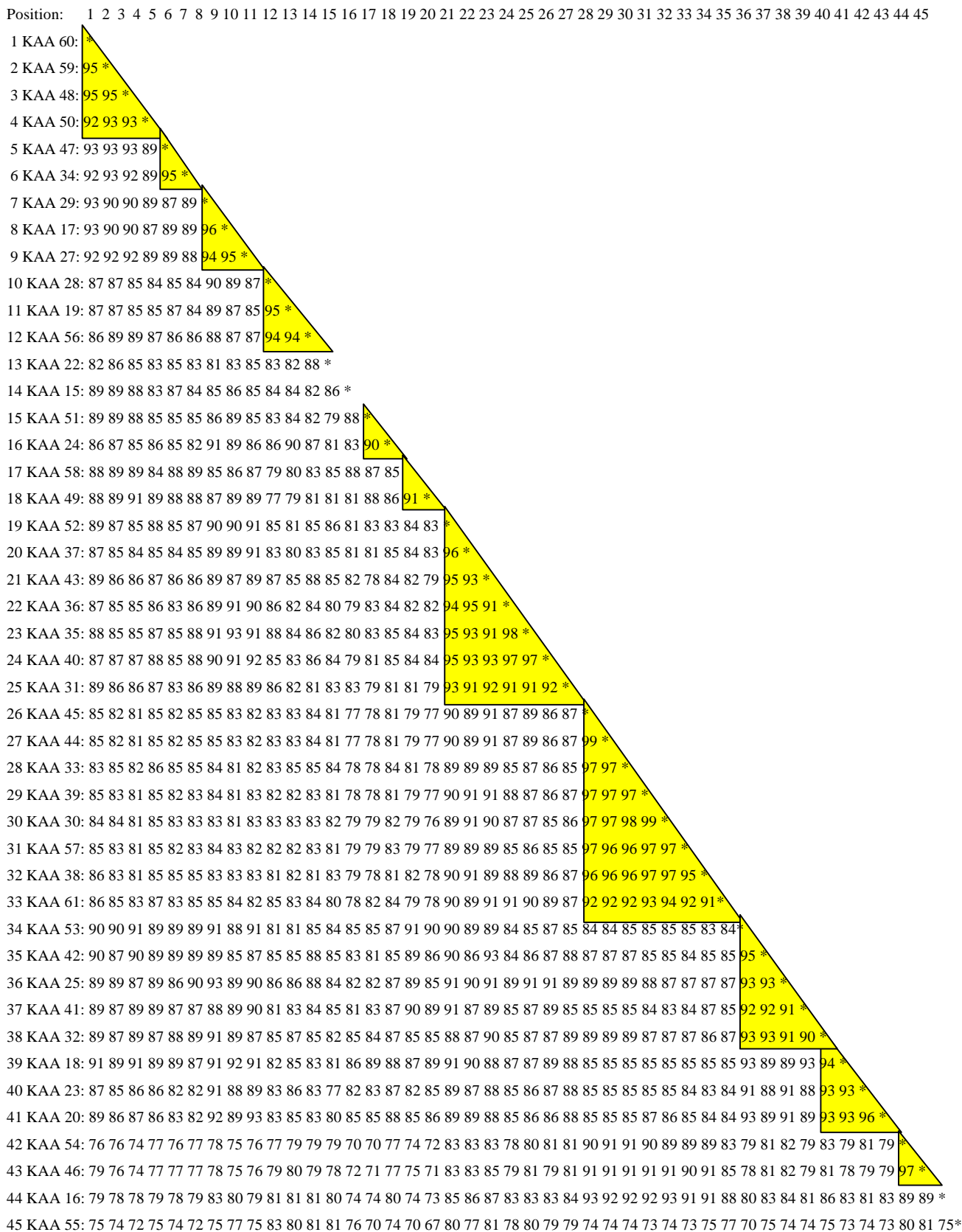


Abb. 3.3.7c: Dendrogramm der Gemeinschaft KAA, Cluster sind gelb unterlegt.

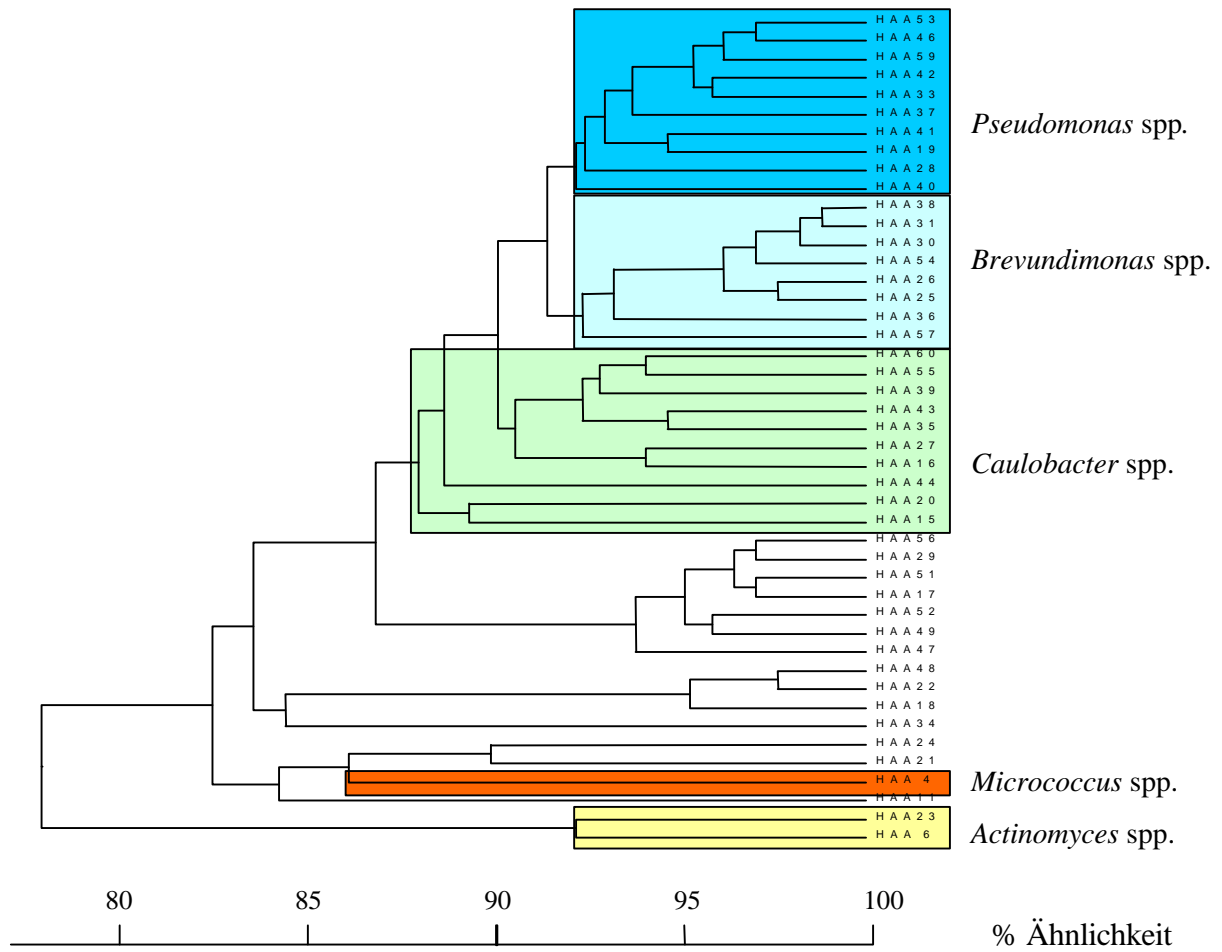


Abb. 3.3.7d: Dendrogramm des Standortes Reaktor H, Aufwuchs, 6 Monate Inkubation. Die Gattungszuordnungen beruhen auf den Daten 3.3.5 und 3.3.6.

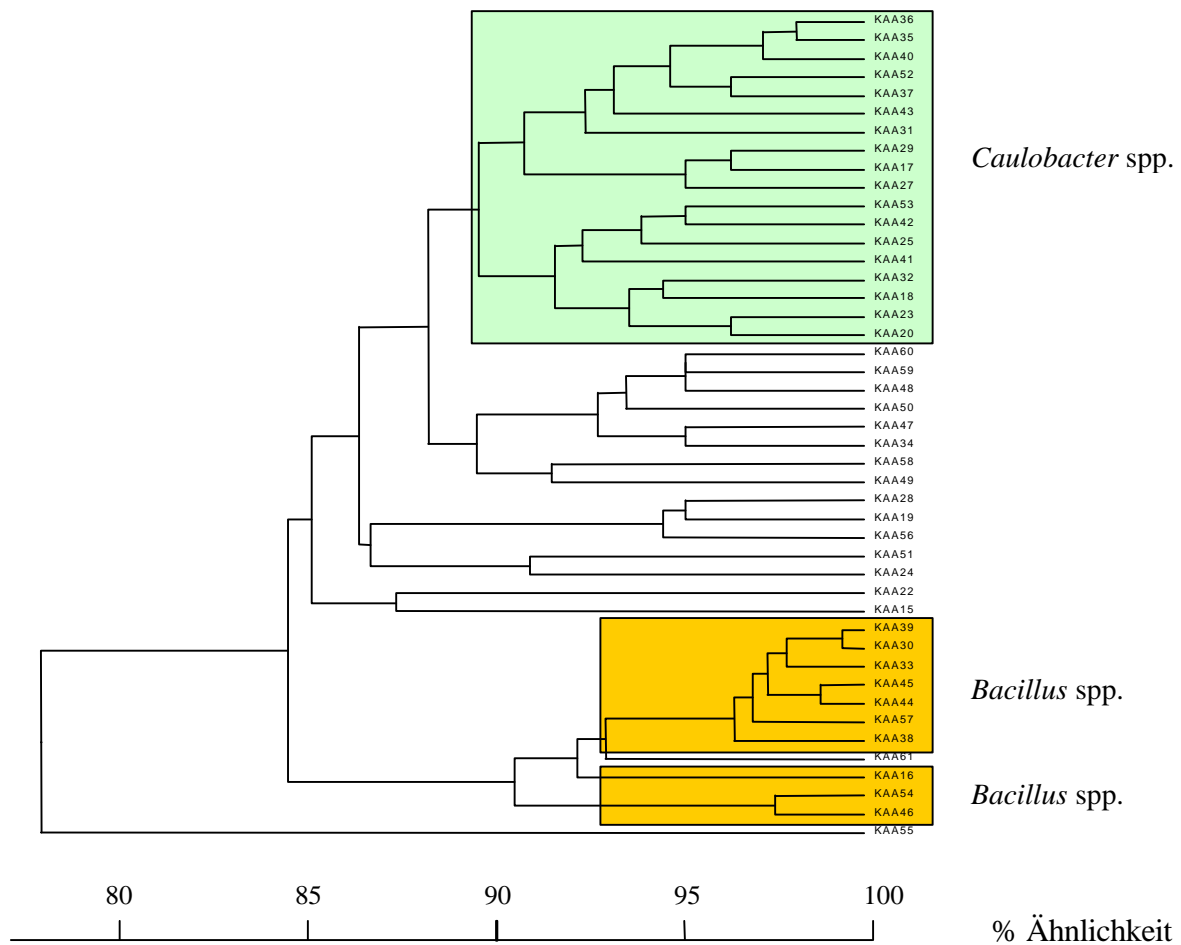


Abb. 3.3.7e: Dendrogramm des Standortes Reaktor K, Aufwuchs, 6 Monate Inkubation. Die Gattungszuordnungen beruhen auf den Daten 3.3.5 und 3.3.6.

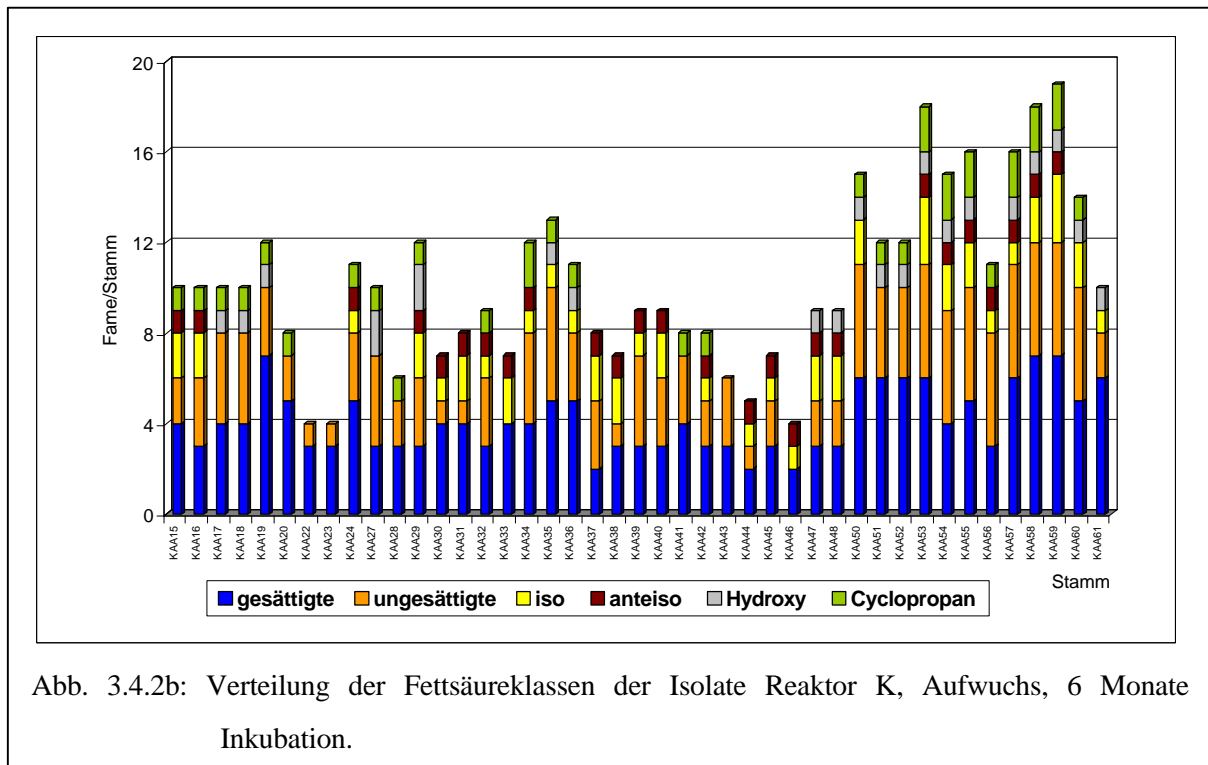
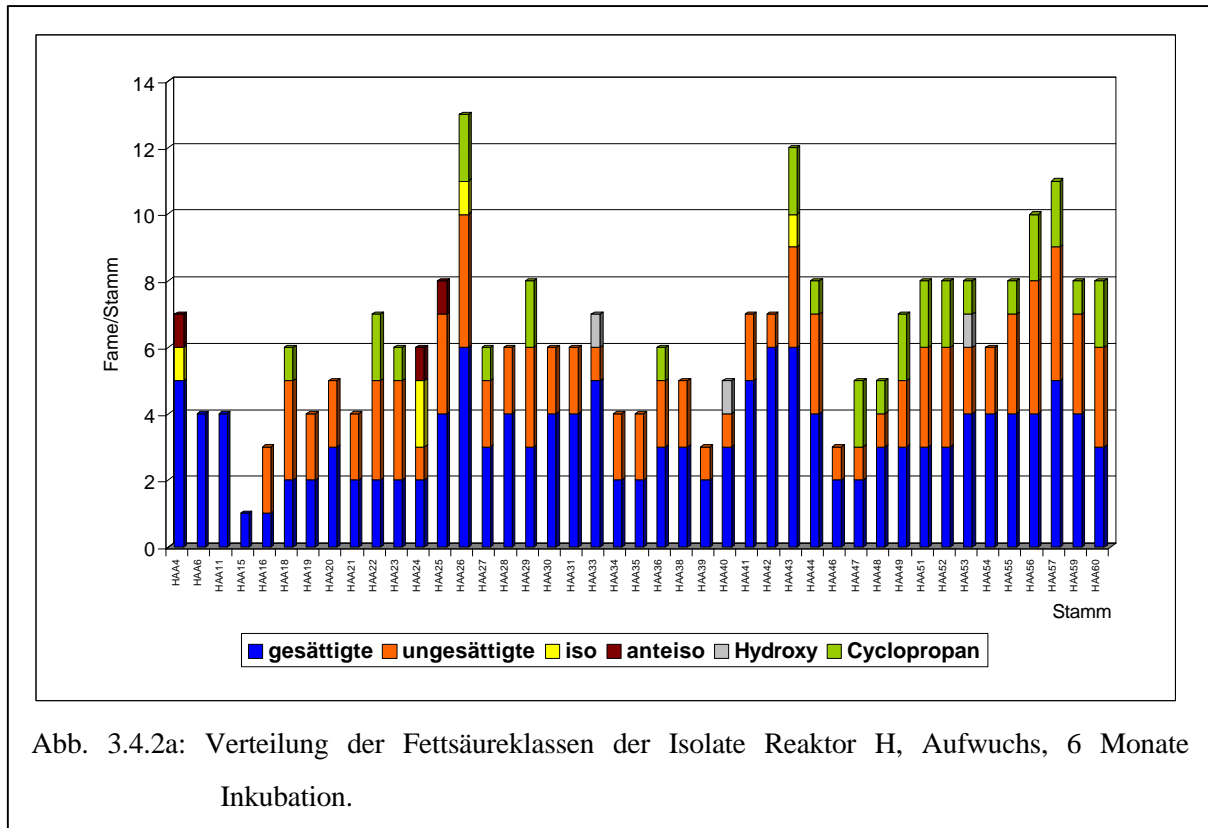
3.4 Chemotaxonomische Charakterisierung

3.4.1 Extraktion der Membranlipide

Die Extraktion und Methylierung der Membranlipide mit der hier verwendeten Methode führte in 96% der Ansätze zur Bildung von Fettsäuremethylestern (FAME) aus den Lyophilisaten der Stämme. Aus den Stämmen HAA 17 und 37 sowie KAA 25 und 49 konnten, trotz Wiederholung der Versuche, keine chromatographierbaren Extrakte gewonnen werden. Über die hierfür verantwortlichen Ursachen wurden keine weiteren Untersuchungen angestellt.

3.4.2 Gaschromatographie

Nach einem halben Jahr Inkubation sind die Fettsäuremuster der Isolate aus den Reaktoren mit und ohne HS sowohl in Qualität als auch in Quantität deutlich voneinander zu unterscheiden. Als dominante Fettsäuren konnten anhand der Standards in den Chromatogrammen in beiden Gemeinschaften Fettsäuren mit einer Kettenlänge von 16 und 18 C-Atomen identifiziert werden. Hierbei handelte es sich um die gesättigten und ungesättigten Fettsäuren C16:0, C18:0 und C16:1(9), C18:1(9). In der Gemeinschaft KAA gehörten weiterhin die gesättigten Fettsäuren C14:0 und C17:0, die ungesättigten C18:1(9') und C18:2(9,12), sowie die verzweigten i-15:0, a-15:0, und i-17:0 zu den vorherrschenden Fettsäuren. Typischerweise traten die Doppelbindungen an der Position C9 auf. Fettsäuren mit einer Doppelbindung an einer anderen Position oder mehrfach ungesättigte Fettsäuren konnten nur selten nachgewiesen werden, auch hier wieder mit einem höheren Anteil in der Gemeinschaft KAA. Als Vertreter der Fettsäurenklasse mit Cyclopropanstruktur wurden in beiden Gemeinschaften cy 17:0 und cy 19:0 detektiert. In beiden Gemeinschaften bildeten mehr Isolate cy 17:0 als cy 19:0. In den Abb. 3.4.2a und b ist die Verteilung der, in Klassen zusammengefassten, Fettsäuren in den Gemeinschaften dargestellt. Abb. 3.4.2c zeigt die zugehörigen Dendrogramme. Zur Berechnung der Dendrogramme wurde ein 1-0 System zu Grunde gelegt, das auf dem Vorhandensein oder Nichtvorhandensein der Fettsäuren basierte. Tab. A 3.4.2 (Anhang) gibt eine Übersicht über die Verteilung der einzelnen detektierten Fettsäuren. Die quantitative Ausbeute lag mit durchschnittlich 10,2 FAME pro Stamm im Reaktor K deutlich über dem im Reaktor H gemessenen Mittelwert von 6,3 FAME pro Stamm.



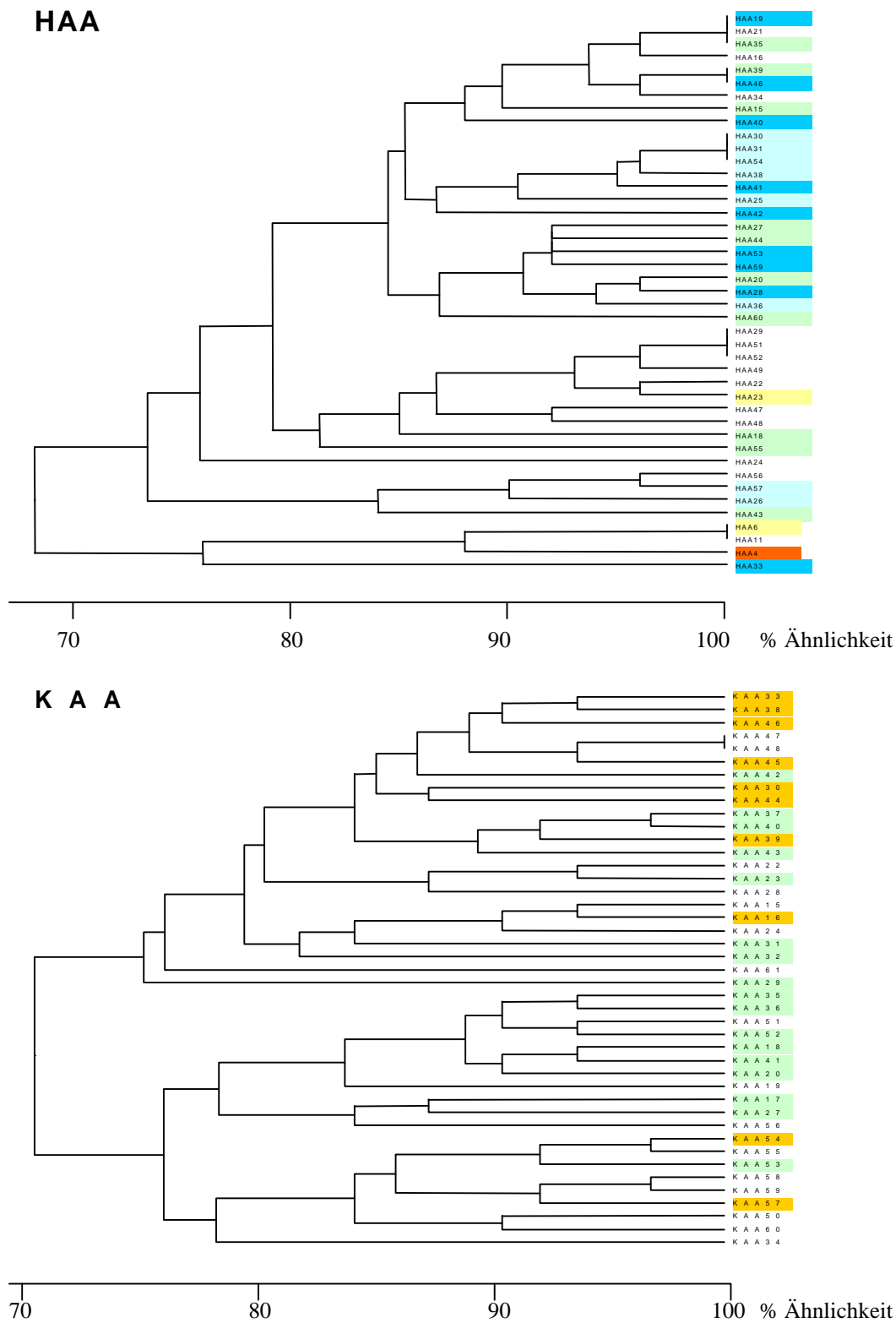


Abb. 3.4.2c: Dendrogramme der Gemeinschaften HAA und KAA, berechnet aus der Verteilung der detektierten Fettsäuren. Farbiger dargestellt die Zuordnung der Isolate zu den, aus den Daten 3.3.5 und 3.3.6 ermittelten Gattungen.

<i>Pseudomonas</i> spp.	<i>Brevundinonas</i> spp.	<i>Caulobacter</i> spp.
<i>Micrococcus</i> spp.	<i>Actinomyces</i> spp.	<i>Bacillus</i> spp.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 16S rDNA-PCR

Mit den in dieser Arbeit verwendeten eubakteriellen Primern konnte mit Ausnahme von 4 Fällen (HAA 51, 57; KAA 49, 55) in der PCR ein Produkt der Isolate und der Mischproben

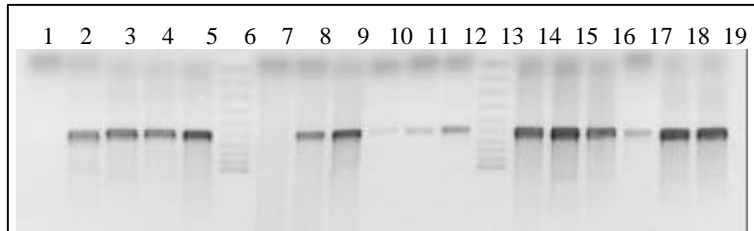


Abb. 3.5.1: Agarosegel der PCR-Amplifikate der Stämme HAA 54, 55, 56, 59, 60. Bandennr. 1: neg. Kontrolle; 2: pos. Kontrolle, 3-5: HAA 54; 6: 100bp-Leiter; 7-9: HAA 55; 10-12: HAA 65; 13: 100bp-Leiter; 14-16: HAA 59; 17-19: HAA 60.

amplifiziert werden, sodass auf den Einsatz einer speziellen Methode zur DNA-Isolierung verzichtet wurde. Durch den Einsatz der touch-down-PCR konnte die Bildung von Amplifikations-Artefakten vermieden werden (s. Abb. 3.5.1).

3.5.2 DGGE der PCR-Produkte

Die Auswertung der DGGE-Gele erfolgte manuell, durch Ausmessen der Abstände der Banden zum Standardisolat HAA 16. Die relative Entfernung der Banden zum Standardisolat HAA 16 wurden zur Beschreibung der genomischen Diversität herangezogen. Die Isolate beider Reaktoren bildeten zwei große Gruppen, die zum einen in einem engen Bereich von -1 mm bis +2 mm Abstand zu Stamm HAA 16 lagen, eine weitere deutliche Gruppierung bildete sich in einem Abstand von 3-5 mm zur Bande des Standardisolates aus. Die PCR-

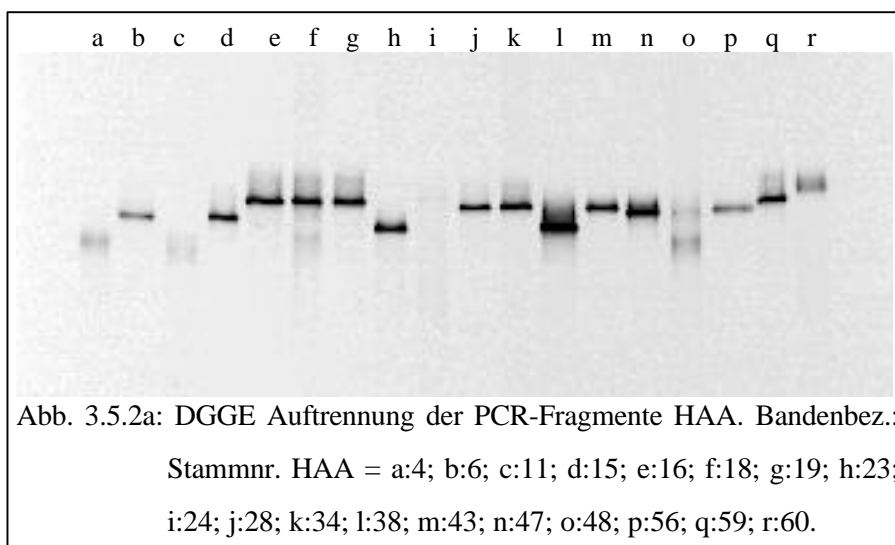
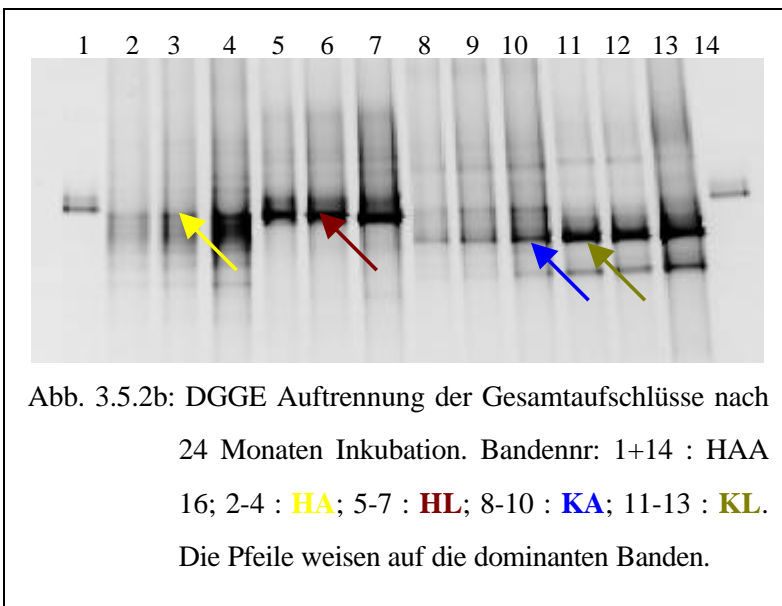


Abb. 3.5.2a: DGGE Auftrennung der PCR-Fragmente HAA. Bandenbez.: Stammnr. HAA = a:4; b:6; c:11; d:15; e:16; f:18; g:19; h:23; i:24; j:28; k:34; l:38; m:43; n:47; o:48; p:56; q:59; r:60.

Produkte der Isolate HAA blieben mit einer Ausnahme in einem dichten Bereich bis max. 8 mm Abstand zu HAA 16. Im Vergleich dazu lagen die KAA-Amplifikate gleichmäßiger über einen größeren Bereich verteilt (Abb. 3.5.2a).

Die nach 24 Monaten Inkubation aus den Reaktoren gezogenen Proben wurden als Gesamtproben direkt nach Zellaufschluss in der PCR amplifiziert. In der anschließenden Auftrennung der PCR-Produkte in der DGGE zeigten sich für die einzelnen Standorte folgende Anzahl distinkter Banden: HA = 7, HL = 5, KA = 6, KL = 4. Die aquatischen Phasen beider Reaktoren (HL, KL) waren von jeweils einer dominanten Bande gekennzeichnet (Abb. 3.5.2b). Diese Bande trat auch in dem entsprechenden Aufwuchs auf, war hier allerdings sehr viel



schwächer ausgeprägt. Diese dominanten Banden wurden aus dem Gel geschnitten, und die DNA aus dem, mittels Beadbeater, geschreddertem Gel in PCR-Wasser gelöst. Nach einer Reamplifikation und Aufreinigung wurden die erhaltenen PCR-Produkte einer Sequenzanalyse unterzogen.

3.5.3 Sequenzanalyse der PCR-Produkte

Anhand der editierten Sequenzen der 16S rDNA-PCR-Produkte konnten, nach Vergleich mit den in der Datenbank des Ribosomal Data Project (RDP; Maidak et al., 1997, 1999) abgelegten Sequenzen, als typische GW-Besiedler, folgende MO als nächste Verwandte der Isolate identifiziert werden. In Klammern der Ähnlichkeitswert der PCR-Produkte zu den von dem RDP angegebenen Organismen (18.01.00):

HAA 4: <i>Micrococcus lylae</i> str. JL DSM 20315, (0.942)	Gram positiv
HAA 15: <i>Caulobacter henricii</i> ATCC 15253, (0.916)	α - Untergruppe der Proteobakterien
HAA 16: <i>Caulobacter subvibrioides</i> ATCC15264, (0.937)	α - Untergruppe der Proteobakterien
HAA 30/54: <i>Brevundimonas diminuta</i> , (0.802)	α - Untergruppe der Proteobakterien
KAA 18: <i>Caulobacter subvibrioides</i> ATCC15264, (0.918)	α - Untergruppe der Proteobakterien
KAA 30/57: <i>Bacillus subtilis</i> , (0.961)	Gram positiv
KAA 35: <i>Caulobacter fusiformis</i> ATCC 15257, (0.916)	α - Untergruppe der Proteobakterien
KAA 52: <i>Caulobacter subvibrioides</i> ATCC15264, (0.932)	α - Untergruppe der Proteobakterien
HL: <i>Sphingomonas subarctica</i> str. KF1, (0.792)	α - Untergruppe der Proteobakterien
KL: <i>Aquabacterium commune</i> str. B8, (0.964)	β - Untergruppe der Proteobakterien

3.6 Rasterelektronenmikroskopie

3.6.1 Präparationsmethoden

Die Rasterelektronenmikroskopie ermöglichte eine qualitative Betrachtung des Biofilms, der sich auf den Glaskugeln ausgebildet hatte. Eine detailgetreue Darstellung des ursprünglichen Biofilms ist mit den hier verwendeten Präparationsmethoden nicht möglich. Abhängig von den Fixierungs- und Dehydrierungsmethoden variierten die Oberflächenstrukturen und unterschiedliche Präparationsartefakte traten auf. Das Auffinden von MO in und auf dem Biofilm war stark von den Präparationsmethoden abhängig. Die Kombinationen Rutheniumrot / Lufttrocknung und Gluthardialdehyd / Rutheniumrot führten zu körnigen Strukturen, in und auf denen teilweise MO sichtbar waren. Bei reiner Lufttrocknung bildeten sich deutliche Risse im Biofilm aus. Gefriertrocknung mit oder ohne Rutheniumrot-Fixierung führte zu lappigen Strukturen, mit dieser Methode konnten Organismen der Gattung *Actinomyces*, die deutlich aus dem Biofilm herausragten, besser erhalten bleiben als mit Lufttrocknung (s. Abb. 3.6.2c).

Die Entstehung eines Biofilms auf den Glaskugeln wurde nach drei Monaten Inkubation gezeigt. Im Vergleich zur Oberfläche unbewachsener Kontrollen, hatte sich innerhalb dieser Zeit in beiden Reaktoren ein rasterelektronenmikroskopisch erkennbarer Aufwuchs auf den Glaskugeln ausgebildet.

3.6.2 Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen

Im folgenden sind REM-Aufnahmen verschiedener Probenahmeterminen und Präparationsmethoden aus beiden Reaktoren dargestellt.

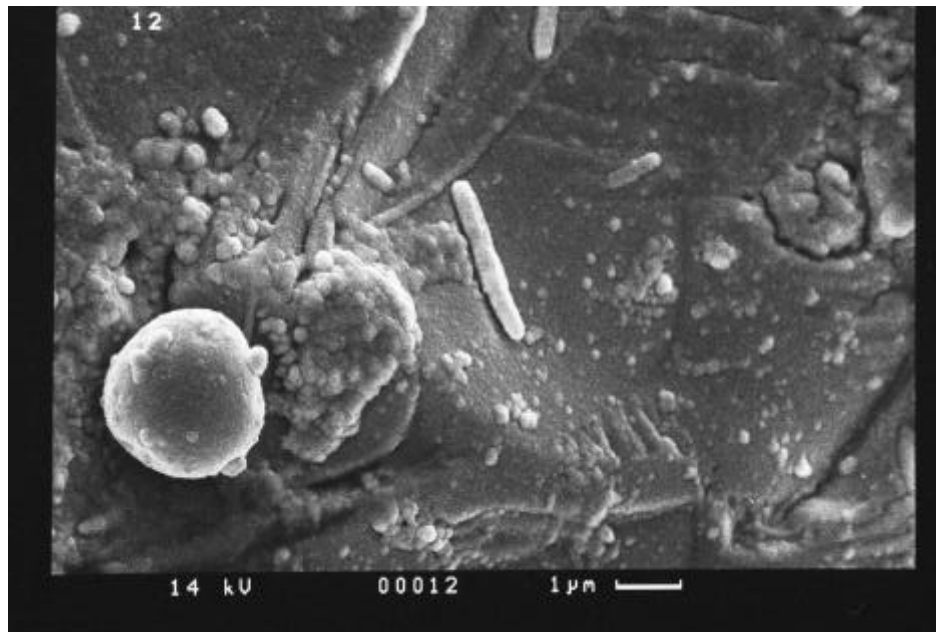


Abb. 3.6.2a: Stäbchenbakterien auf Biofilm aufliegend, Reaktor K, 3 Monate Inkubation. Fixierung mit Glutardialdehyd/Ruthenium-Rot, Entwässerung mit Ethanolreihe, Lufttrocknung aus 100% EtOH. Vergrößerung 9.900fach.

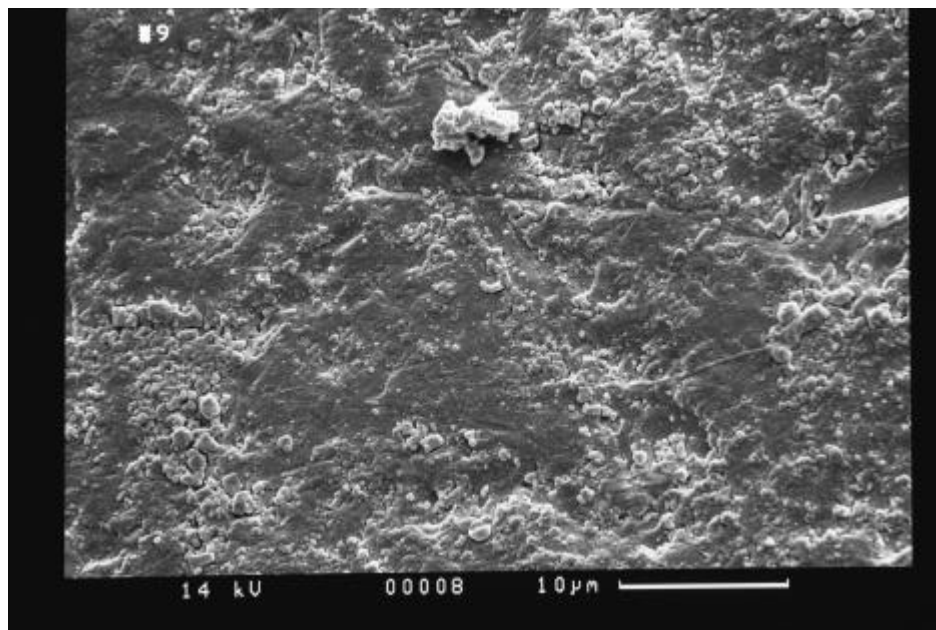


Abb. 3.6.2b: Biofilmoberfläche Reaktor H, 3 Monate Inkubation, es sind keine eindeutigen bakteriellen Strukturen zu erkennen. Fixierung mit Glutardialdehyd/Ruthenium-Rot, Entwässerung mit Ethanolreihe, Lufttrocknung aus 100% EtOH. Vergrößerung 2.430fach.

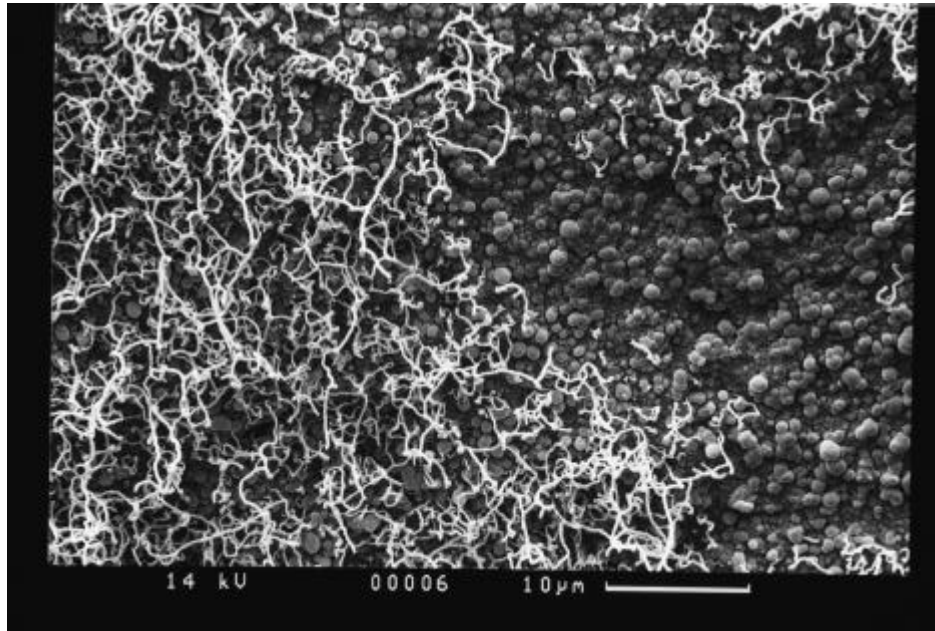


Abb. 3.6.2c: Aus dem Biofilm herausragendes Actinomycetenmycel,
Reaktor H, 6 Monate Inkubation. Keine Fixierung,
Gefriertrocknung, Vergrößerung 2.000fach

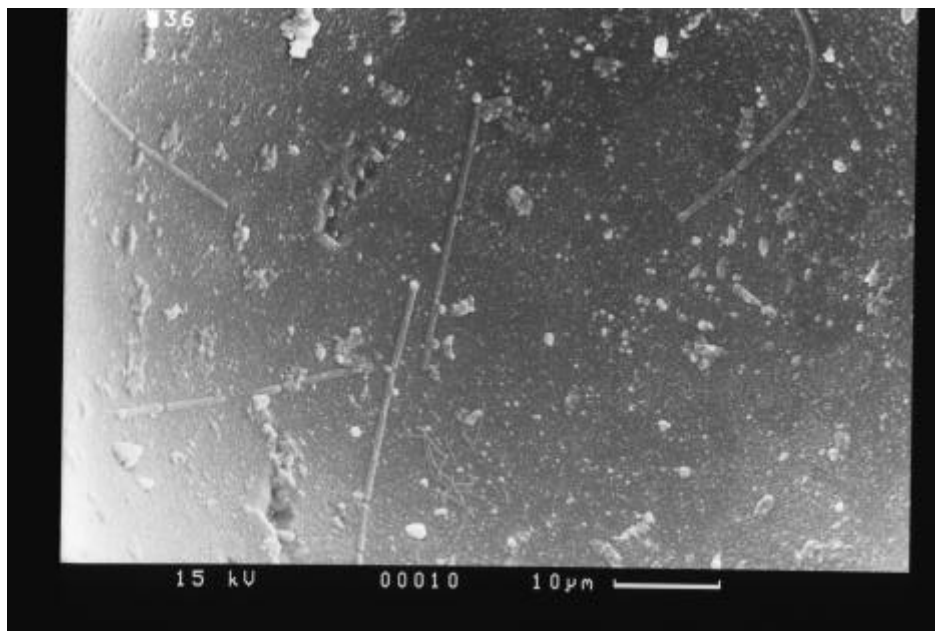


Abb. 3.6.2d: Kettenbildende stäbchenförmige Bakterien auf der Glaskugel-
oberfläche, Reaktor H, 9 Monate Inkubation. Fixierung mit
Glutardialdehyd/Ruthenium-Rot, Entwässerung mit Ethanolreihe,
Lufttrocknung aus 100% EtOH. Vergrößerung 1.580fach.

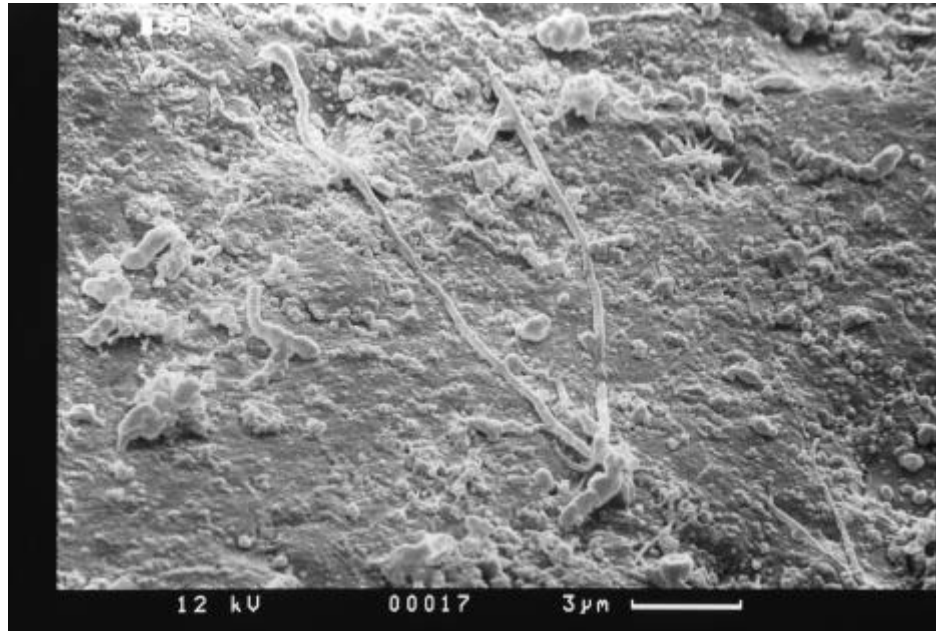


Abb. 3.6.2e: Kettenbildende stäbchenförmige Bakterien auf dem Biofilm aufliegend, spiralig gewundene Organismen vermutlich der Gattung *Seliberia*, Reaktor K, 12 Monate Inkubation. Keine Fixierung, Gefriertrocknung. Vergrößerung 5.000fach.

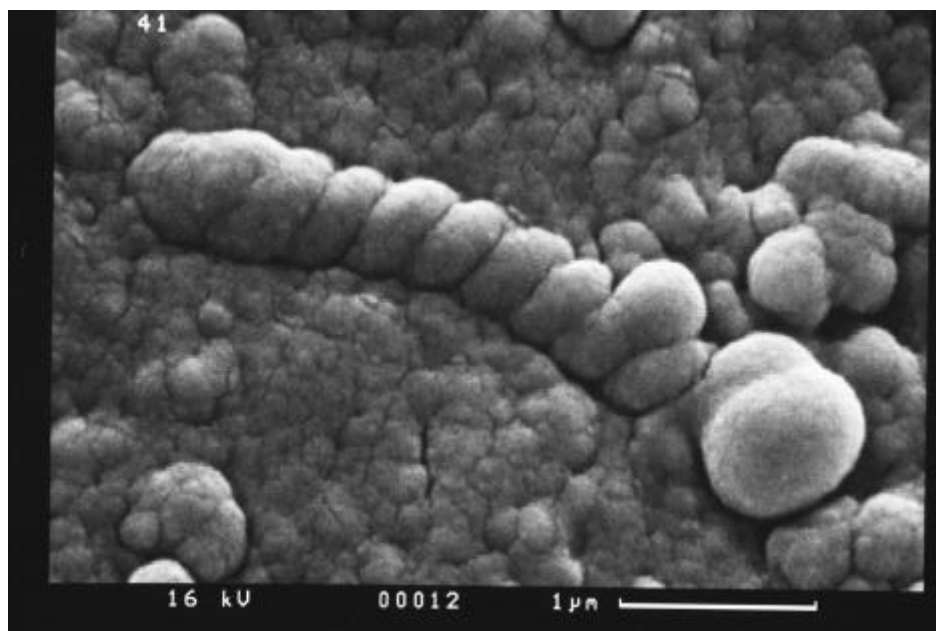


Abb. 3.6.2f: Spiralig gewundenes Bakterium, vermutlich der Gattung *Seliberia*, Reaktor H, 12 Monate Inkubation. Fixierung mit Glutaraldehyd/Ruthenium-Rot, Entwässerung mit Ethanolreihe, Lufttrocknung aus 100% EtOH. Vergrößerung 27.800fach.

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden die Wechselwirkungen zwischen den Bakterien eines Grundwasserleiters und Huminstoffen in einem künstlichen Biotop untersucht. Es sollte überprüft werden, inwieweit sich die Besiedlungs- und Diversitätsstruktur der MO-Gemeinschaft unter dem Einfluss der HS verändert, welche physiologischen Veränderungen sich ergeben, ob die HS den MO als Nährstoffe dienen und welchen Transformationen die HS dabei unterliegen. Die möglichen Diversitätsänderungen in der MO-Gemeinschaft und die Veränderungen an den HS wurden anhand verschiedener Untersuchungsmethoden bestimmt. Laborsysteme sind typischerweise nicht in der Lage, ein exaktes Abbild der *in situ* herrschenden Vorgänge darzustellen. Jede Übertragung von natürlich vorkommenden MO-Gemeinschaften in Laborsysteme stellt einen massiven Eingriff in diese Gemeinschaften dar. Die Änderungen der physikalisch-chemischen Parameter, sowie die Anzucht von MO auf künstlichen Medien, führt zu einer Selektion in der ursprünglichen Gemeinschaft. Daraus ergibt sich, dass Laborsysteme immer einen Modell-Charakter besitzen und kein exaktes Abbild natürlicher Gegebenheiten widerspiegeln. Es lassen sich in Laborversuchen aber generelle Aussagen über das mögliche Potential einer MO-Gemeinschaft und das Verhalten der MO unter den gegebenen Bedingungen treffen.

4.1 Methodendiskussion

4.1.1 Physikalisch/chemische Untersuchung

Die Messung der physikalisch-chemischen Parameter Leitfähigkeit, pH-Wert, DOC und BDOC erfasste summarische Größen, die zur Darstellung eintretender Milieuveränderungen in den Reaktorlösungen genutzt wurden. Die Durchführung und Methodik gestaltete sich einfach in der Handhabung und ist, nach Eichung, lediglich mit den Messfehlern der Geräte behaftet. Die Methoden Säurehydrolyse, LC-DOC-Bestimmung und Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie dienen zur Erfassung von Transformationen an den HS. Sie sind, da die Proben zur Detektion chemisch und / oder physikalisch in Fragmente zerlegt werden, nicht geeignet ein Abbild der originären HS-Struktur aufzuzeichnen. Dennoch geben sie einen Einblick in die spezifischen Veränderungen, die an und in den HS-Molekülen vonstatten gehen und lassen Aussagen zu mikrobiellen Transformationen an den Molekülen zu. Unterschiedlich sind die Methoden in ihrem Untersuchungsziel. Mit Hilfe der Säurehydrolyse wurden die Kohlenhydrat- und Aminosäurebestandteile der HS erfasst, die LC-DOC-Bestimmung lieferte gruppen-

spezifische Verteilungen im Kohlenstoffgehalt der Lösungen. Die Py-FIMS führte, als radikalste Methode, pyrolytisch zu einer kompletten Zerlegung der Moleküle in Bruchstücke, die massenspektrometrisch analysiert wurden. Eine Aussage, wie diese Bruchstücke in dem Molekül angeordnet und verknüpft waren, läßt sich mit dieser Methode nicht treffen.

4.1.2 Mikrobiologische Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit kamen neben den oben angeführten (siehe 2.3) mikrobiologischen Methoden weitere etablierte Untersuchungsmethodiken zur Anwendung, die sich, unter den gegebenen Umständen, als nicht durchführbar erwiesen und hier kurz diskutiert werden sollen.

Enzymatische Tests

Die vielfach genutzten enzymatischen Tests nach Obst und Holzapfel-Pschorn (1988) sollten Aufschluss über das mögliche Potential der mikrobiellen Gemeinschaft geben. In dieser Arbeit wurden als allgemeiner Aktivitätstest die Esterasenaktivitäten anhand der Fluoresceindiacetat-Spaltung gemessen. In den HS-haltigen Lösungen lagen, trotz Variationen im Versuchsablauf, ab einer HS Konzentration von 10 mg/l die Messwerte deutlich unter denen der Kontrollen ohne HS. Mit zunehmender HS-Konzentration wurde dieser Effekt verstärkt. Müller-Wegener (1987) beschreibt drei maßgebliche Effekte in der Wechselwirkung zwischen HS und extrazellulären Enzymen: (i) HS können durch adsorptive und sterische Effekte die quartäre und tertiäre Struktur der Enzyme und damit das aktive Zentrum verändern, (ii) HS-Moleküle können mit ihrer vielfältigen Struktur als Substrat Analoga das Gleichgewicht Enzym / Substrat verschieben und (iii) durch die Bindung von, als Cofaktoren benötigten Kationen, die Katalyse behindern. Als weitere Ursache können Quenching-Effekte durch die Eigenfluoreszenz der HS-Moleküle vermutet werden. Aufgrund dieser Störungen wurden im weiteren Versuchsverlauf enzymatische Tests mit den Reaktorlösungen als ungeeignet verworfen.

MPN

Die Untersuchungen zur Bestimmung physiologischer Gruppen in den mikrobiellen Gemeinschaften waren starken Schwankungen unterlegen (siehe 2.3.3 und 3.3.3). In mehreren Ansätzen zeigte sich erst in den höheren Verdünnungsstufen bakterielles Wachstum. Ein gleichmäßiges Wachstum in den Parallelansätzen war nicht erkennbar und in den Zwischenbewertungen bereits positive Stufen erschienen in der Endauswertung wieder negativ. Aus diesen Gründen wurde auf die Fortführung der MPN-Bestimmung nach 12 Monaten Inkubation verzichtet, die bestehenden Ergebnisse werden im weiteren nicht diskutiert.

Methoden zur Zellzahl-Bestimmung

Zur Bestimmung der Gesamt- und Lebendzellzahlen wurden verschiedene Färbeverfahren, die auf unterschiedlichen Prinzipien beruhen, auf ihre Anwendbarkeit mit den GW-MO überprüft. Verfahren, bei denen stoffwechselaktive Organismen durch Einlagerung eines Farbstoffes im Fluoreszenzmikroskop sichtbar werden, wie z.B. Färbungen mit den Formazansalzen INT (Zimmermann et al., 1978) und CTC (Rodriguez et al., 1992) führten zu keinen befriedigenden Ergebnissen. Sowohl INT als auch CTC werden in der Atmungskette der Bakterien zu unlöslichen Formazan-Kristallen reduziert und akkumulieren innerhalb der Zellen aktiv atmender Bakterien. Durch den sehr langsamen Stoffwechsel der GW-MO konnten im Fluoreszenzmikroskop, auch nach Verlängerung der Inkubationszeiten, nur sehr wenige, schwach gefärbte Bakterien ausgezählt werden. Die Zellzahlen lagen deutlich unter denen, die auf P-Agar gewachsenen KBE-Zahlen und waren somit für die Bestimmung der Lebendzellzahlen nicht geeignet.

Die bei Griebe et al. (1996) beschriebene Kombination von DAPIlac (bindet an doppelsträngige DNA) und CTC zeigte gleiche Resultate, hier kam es sogar zu einem Ausbleichen des Formazans nach Ausleuchten der Filter mit 365 nm zur DAPIlac Anregung. Bei der alleinigen Färbung mit DAPIlac zur Gesamtzellzahl-Bestimmung zeigten sich im mikroskopischen Bild deutlich sichtbare Zellen. Im Vergleich zur AODC wurde aber auf Grund der langen Inkubationszeiten von ≥ 2 h auch diese Methode verworfen. Die Bestimmung der Lebendzellzahl nach der DVC-Methode (Direct Viable Counts; Kogure et al., 1979), hier wird durch den Zusatz des Gyrasehemmers Nalidixinsäure in einer Nährlösung die Zellteilung unterbunden, wodurch es zur Bildung elongierter Zellen kommt, führte zu Zellkonglomeraten und flockigen Strukturen, welche mikroskopisch nicht mehr auszählbar waren. Auch Buchanan-Mappin et al. (1986) konnten durch den Zusatz von Nalidixinsäure keine positiven Ergebnisse bei der Ermittlung der Lebendzellzahl in GW-Proben erzielen.

Der von Molecular Probes (NL) vertriebene LIVE/DEAD[®] BacLight[™] Bacterial Viability Kit, das Prinzip beruht auf zwei an Nucleinsäuren bindenden Farbstoffen (Syto 9, grün fluoreszierend; Propidium Jodid, rot fluoreszierend), lieferte keine zufriedenstellenden Ergebnisse. Syto 9 penetriert in alle Zellen, Propidium Jodid nur in solche mit beschädigter Membran und verdrängt vorhandenes Syto 9, sodass intakte Zellen grün, beschädigte rot fluoreszieren. In der Anwendung überlagerten sich die Farbstoffe, und es konnte nicht klar genug zwischen den unterschiedlich gefärbten Zellen differenziert werden. In der Summe lagen die Zellzahlen unter denen der AODC gefärbten Kontrollen, was zum Ausschluss auch dieser Methode führte.

KBE

Das, zur Bestimmung der Lebendzellzahlen mittels KBE, verwendete P-Medium nach Nehr Korn (1968) ist in seiner Zusammensetzung an die oligotrophen Verhältnisse des GW angepasst und war in der Arbeitsgruppe bereits in vielen Untersuchungen zur Grundwasserbesiedlung (Gültekin, 1997; Kölbel-Boelke, 1987; Plenz, 1994; Preuß, 1991) erprobt und etabliert. Im Vergleich zu dem nährstoffreicheren DEV-Agar und R2A-Medium konnten nach 14-tägiger Inkubation höhere Lebendzellzahlen ermittelt werden. Dennoch bleibt zu bedenken, dass die Isolation von MO auf einem Medium immer eine Selektion darstellt und lediglich 1% - 10% der tatsächlich vorkommenden MO erfasst werden.

Zell- und koloniemorphologische Eigenschaften, physiologische Merkmale

Die Beschreibung der mikrobiellen Diversität der isolierten Reinkulturen erfolgte anhand von 77 zell- und koloniemorphologischen Eigenschaften sowie 76 physiologischen Merkmalen. Zur Berechnung der *in vitro* Aktivitäten der Gemeinschaften wurden 64 der physiologischen Tests herangezogen. Das gesamte Testverfahren wurde von Kölbel-Boelke (1987) an die Wachstumsbedingungen von GW-MO angepasst und optimiert. In ihrer Arbeit findet sich eine ausführliche Diskussion zu der Aussagekraft und Fehlerhäufigkeit dieses Verfahrens. So beträgt der durchschnittliche Animpffehler bei Flüssigmedien ca. 3%, bei Festmedien ca. 1% (Dott und Thofern, 1980). Durch einen hohen Zelltitert (10^8 - 10^9 Zellen/ml) läßt sich aber eine nahezu fehlerfreie Überimpfung auf die Testmedien erreichen. Um falsch negative Ergebnisse zu minimieren, wurde, in der vorliegenden Arbeit, jede Mikrotiterplatte dreimal beimpft, sowie alle Ansätze in drei Parallelen durchgeführt. Erzielten die Parallelen keine gleichen Ergebnisse, wurde eine einfache Mehrheit der Ausprägung (= zwei gleiche Merkmale) in die Wertung genommen.

Negative Testergebnisse in den physiologischen Tests sind nicht zwingend auf eine mangelnde Fähigkeit des Stammes, das entsprechende Substrat umzusetzen, zurückzuführen. Mit Ausnahme der Wachstumstests auf HS waren alle weiteren Ansätze mit einer positiven Nachweisreaktion, entweder der Farbumschlag eines pH-abhängigen Indikators oder die Bildung von Abbauhöfen, gekoppelt. Daraus ergibt sich der Nachteil, dass nur ein Stoffwechselweg eines Substrates verfolgt werden kann. Weitere, mögliche Abbauwege des Substrates werden nicht erfasst. Wenn eine große Anzahl an Stämmen und Substraten überprüft werden soll, ist eine Testung hinsichtlich aller möglichen Abbauwege auch mit dem miniaturisierten Mikrotiter-System nicht möglich. Diese unvermeidlichen falsch negativen

Testergebnisse sind zur Berechnung der Diversität tolerierbar, sie wirken sich allerdings negativ auf die abgeleiteten *in vitro* Aktivitäten aus (Kölbel-Boelke, 1987).

Diversitäts-Beschreibung

Die Anzahl der morphologischen und physiologischen Eigenschaften, die zur Beschreibung mikrobieller Diversitäten in anderen Arbeiten herangezogen wurden, unterscheiden sich von den hier verwendeten Tests. Bianchi und Bianchi (1982) reduzierten die Anzahl der Tests auf 30 und die der Isolate auf 20 bis 30, ohne dabei einen Einfluss auf die Diversitätsmuster in ihren Untersuchungen zu erhalten. Plenz (1994) berechnete die Aktivitäten seiner Isolate mit 42 Tests, Otremba (1992) bezog 31 Tests ein. Mit nur 9 Eigenschaften zur Morphologie und Physiologie führten Griffiths und Lovitt (1980) ihre Untersuchungen durch. In Anlehnung an das API-Identifikations-System (API-Systems S.A., F) stellten sie daraus ein dreizahliges Nummernsystem auf, mit dem sie die bakterielle Diversität in den von ihnen untersuchten Öltanks hinreichend beschreiben konnten. Diese reduzierten Testsysteme scheinen zur Diversitätsbeschreibung anhand morphologischer und physiologischer Merkmale ausreichend zu sein. Sie lassen aber nur sehr geringe Aussagen zur physiologischen Beschreibung der Isolate zu. In der vorliegenden Arbeit sollten, über eine reine Diversitätsbeschreibung hinaus, auch Aussagen über die physiologischen Eigenschaften der Isolate getroffen werden. Aus diesem Grund wurde das von Kölbel-Boelke (1987) und Preuß (1991) verwendete Substrat-spektrum mit 58 Tests hier um 6 Tests zur HS-Verwertung erweitert.

Stammhaltung

Die Konservierung der Isolate mit dem MicroBank™-System hatte sich im Rahmen dieser Arbeit bewährt. Auch nach über 2,5 Jahren Lagerung konnten die Isolate problemlos wieder zum Wachstum auf Fest- und Flüssigmedien gebracht werden.

4.1.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Die chemotaxonomische Charakterisierung von Isolaten und Mikroorganismen-Gemeinschaften über gaschromatographische Analytik der membrangebundenen Fettsäuren wurde von Koopmann (1996) in ihrer Arbeit optimiert und ausführlich diskutiert. Sie konnte experimentell nachweisen, dass die Auftrennung des Gesamtlipidextraktes mittels Festphasenextraktion und die anschließende Methylierung durch methanolische Schwefelsäure eine hohe Ausbeute und einen großen Reinheitsgrad der Extrakte liefert. In Abwandlung zu ihrer Methodik erfolgte in der vorliegenden Arbeit der Aufschluss nur aus Lyophilisaten der Reinkulturen, sowie die Verwendung einer speziell zur Fettsäure-Analytik entwickelte GC-Säule (FFAP, Fa. J&W

Scientific, USA). Neben der Bestimmung mikrobieller Diversität und der Spezies-Identifizierung in kommerziellen Systemen (Hewlett Packard, 1985), eignet sich die Analytik der Fettsäuremuster auch zur Bestimmung von Indikatororganismen. Anhand ihrer Biomarker, spezifische Markerfettsäuren, können sie, ohne vorhergehende Isolierungsschritte in bakteriellen Gemeinschaften nachgewiesen werden (Gumprecht, 1995).

4.1.4 Molekularbiologische Methoden

Die DGGE stellt eine elektrophoretische Technik zur Trennung von DNA-Amplifikaten gleicher Länge dar. Basierend auf dem unterschiedlichen Schmelzverhalten von DNA-Amplifikaten mit gleicher Anzahl an Basenpaaren, aber unterschiedlicher Sequenz, erfolgt in der DGGE die Separation in einem Acrylamidgel, welches einen ansteigenden Gradienten von chemischen Denaturierungsmitteln (Harnstoff / Formamid) besitzt. Zur Beschreibung der mikrobiellen Diversität eines Biotops bieten sich idealerweise Amplifikate der 16S rDNA an.

Die 16S rDNA ist universell in allen MO enthalten. Sie enthält konservierte Bereiche, die sich in allen Eubakterien wiederfinden und als Komplemente für die entsprechenden PCR-Primer dienen können. Somit ist es möglich, aus einer Umweltprobe das gewünschte DNA-Fragment, aller, auch physiologisch nicht aktiver oder nicht kultivierbarer, Organismen zu erfassen und zu vervielfältigen. Einen weiterführenden Überblick über die Anwendungen der DGGE zur Diversitätsbeschreibung mikrobieller Gemeinschaften, auch in Kombination mit weiteren Techniken, findet sich bei Muyzer (1999). Nübel et al. (1999) beschreiben die Möglichkeiten der quantitativen Auswertung von DGGE-Mustern.

Nachteilig kann sich bei der DGGE Auftrennung ein gleiches Wanderungsverhalten im Gel von PCR-Produkten unterschiedlicher Herkunft auswirken. Auch das Vorliegen mehrerer Kopien der 16S rDNA, mit gegebenenfalls unterschiedlicher Sequenz, sowie die, Wachstumsphasen abhängige, Anzahl an identischen Kopie eines Genabschnittes in einem Organismus können sich negativ auswirken (Nübel et al, 1999). Ersteres führt zu nicht mehr auswertbaren Überlagerungen im Gel, letzteres zu einer Überbewertung der Diversität einzelner Organismen. Ein weiteres Problem kann sich aus der vorgeschalteten PCR ergeben. Nicht ausreichend stringente Bedingungen der PCR und eine unspezifische Primerauswahl können zu einem PCR-Bias führen. Hierbei kommt es während der Amplifikation zur bevorzugten Vervielfältigung bestimmter Zielsequenzen, die im Resultat nicht die tatsächliche Abundanz der Organismen widerspiegeln (Reysenbach et al., 1992; Suzuki und Giovannoni, 1996). Zur Beschreibung der genomischen Diversität von Isolaten in größerem Maßstab erwies sich die schlechte Vergleichbarkeit der Gele untereinander weiterhin als Nachteil, streng genommen ist sie, im

vorliegenden Fall, nur innerhalb eines Gels gegeben.

Es muß auch bedacht werden, dass phylogenetische Aussagen allein nicht zwingend auf die physiologischen Eigenschaften der MO *in situ* schließen lassen.

4.1.5 Rasterelektronenmikroskopie

Die REM diente in der vorliegenden Arbeit der Dokumentation des auf den Glaskugeln auftretenden Biofilms. Zur Präparation kamen bereits etablierte Methoden zur Anwendung. Auf eine spezifische Anpassung der Methodik wurde verzichtet, da die Fragestellung auf eine mögliche, unterschiedliche Ausbildung des Biofilms zwischen den Reaktoren abzielte und dafür ausreichend war. Die verwendeten Dehydrierungs- und Fixierungsmethoden führten zum Auftreten unterschiedlicher Veränderungen und Artefakten im Biofilm, sodass eine exakte Darstellung nicht gegeben war. Um ein genaueres Abbild des Biofilms zu erreichen, müssten andere, nahezu artefaktfreie Methoden wie die Low-Temperatur-Scanning-Electron-Microscopy (LTSEM), die Electroscan-wet-Scanning-Electron-Microscopy (EwSEM) und die Confocal-Laser-Scanning-Microscopy (CLSM) eingesetzt werden (Stewart et al., 1995; Sutton et al., 1994). Die letztgenannte Methode ermöglicht es durch die dreidimensionale Darstellung sogar innere Strukturen von Biofilmen sichtbar zu machen.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Physikalisch/chemische Untersuchung

4.2.1.1 pH-Wert

Der alkalische pH-Wert der Reaktorlösung HL zum Zeitpunkt $t = 0$ beruhte auf der Freisetzung von NaOH aus den HS. Diese wurden bei dem Extraktionsprozess mit NaOH aus der XAD-Matrix eluiert und anschließend lyophilisiert. Ein Teil der Lauge blieb an den HS gebunden und führte bei der Rücklösung der HS zu einem Anstieg des pH. Die pH-Wert Änderungen in beiden Reaktoren könnten auf mikrobielle Aktivität hinweisen. Bei gleicher Startpopulation entwickelte sich innerhalb von 4 Wochen in beiden Reaktoren ein Wert von 8,2 bzw. 8,0. Im weiteren Verlauf stabilisierte sich das System und es traten keine weiteren Veränderungen auf, die acido- oder basophile Organismen bevorzugen würden, oder durch solche hervorgerufen wären. Der etwas gedämpftere Verlauf des pH-Wertes während der Inkubationszeit im Reaktor H, läßt auf eine puffernde Wirkung der zugesetzten HS schließen.

4.2.1.2 Leitfähigkeit

Der relativ geringe Anstieg der Leitfähigkeit in beiden Reaktoren ist mit der Abgabe von geladenen und damit elektrisch leitenden Stoffwechselprodukten der MO in die Reaktorlösung zu begründen. Bedingt durch die Zugabe der HS lagen die Werte im Reaktor H über denen des Kontrollreaktors.

4.2.1.3 DOC Messung

Die Abnahme des Gehaltes an gelöstem organischen Kohlenstoff in Reaktor H beruhte maßgeblich auf zwei Faktoren. Zum einen gab es starke Anlagerungseffekte der HS an die Oberflächen der Glaskugeln. Deutlich sichtbar waren die oberen Zentimeter Filterstrecke braun eingefärbt. Diese Färbung verstärkte sich im Laufe der ersten drei Monate und blieb im weiteren Verlauf konstant. Dieser Konditionierungsfilm bildet sich laut Meyer-Reil (1996) auf reinen Oberflächen im Kontakt mit einer wässrigen Phase spontan innerhalb weniger Minuten flächenhaft aus. Er setzt sich aus Proteinen, Glycoproteinen, Polysacchariden und Huminsäuren zusammen und beschleunigt die Ansiedlung von Pionierorganismen (siehe auch 4.2.5). Ein weiterer Effekt ist die Nutzung der HS als Nährstoffe durch die MO. Da die HS als einzige Kohlenstoffquelle dem GW zugesetzt wurden, setzt sich der DOC aus ihnen, und im Laufe der Inkubation aus ihren Transformationsprodukten, zusammen. Eine mikrobielle Verwertung oder Transformation von HS bzw. Anteilen der HS, ist bereits in anderen Untersuchungen beschrieben worden (Plenz, 1994; Tuschewitzki et al., 1992; Visser, 1985a+b; Ziechmann, 1980) und konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nachgewiesen werden (siehe 4.2.1.5 und 4.2.2.5). Der am Ende des Inkubationszeitraums gemessene Abfall des DOC von 67,5 mg/l (t = 9 Mon.) auf 54,6 mg/l (t = 19 Mon.) in Reaktor H war mit einem gleichzeitigen Absinken der KBE-Zahlen sowohl der aquatischen Phase als auch des Aufwuchses verbunden (siehe 4.2.2.1).

Der gemessene DOC lag mit einem Wert von 220 mg/l (t = 0) in der Reaktorlösung H deutlich über dem der Einwaage von 100 mg HS/l, was einem theoretischen DOC von ca. 50 mg/l entsprechen müsste. Dieses Phänomen wurde auch bei den Ansätzen zum BDOC beobachtet und von anderen Forschungsgruppen des DFG-Schwerpunktes "Refraktäre organische Säuren in Gewässern" bestätigt. Es wird vermutet, dass die HS kolloidal in der Lösung vorliegen und sich so eine gleichmäßige DOC-Messung schwierig gestaltet (Abbt-Braun, pers. Mitteilung; Ziechmann, 1980).

Der leichte DOC-Anstieg in dem Kontrollreaktor während der ersten 12 Inkubationsmonate muss, bedingt durch den Versuchsaufbau, in einem zusätzlichen Eintrag von Kohlenstoff in die Reaktorlösung begründet sein. Dieser Eintrag kann auf das mechanisch und mikrobiell verursachte in Lösung gehen von Bestandteilen, wie z.B. Weichmachern, der verwendeten Norprene®-Schläuche der Peristaltikpumpe zurückgeführt werden. Die Schläuche waren durch den permanenten Gebrauch einem starken Verschleiß unterlegen und mussten monatlich ausgetauscht werden. Ein weiterer, vermutlich nur geringer, Anteil an dem DOC-Anstieg kann in der bakteriellen Fixierung von CO₂ in dem Reaktor gesehen werden. Durch diese Faktoren und die erhöhten Lebend- und Gesamtzellzahlen war mit einer vermehrten mikrobiellen Aktivität eine Beeinflussung des DOC gegeben.

Der Anteil an HS in dem hier verwendeten GW, ermittelt durch Filtration über eine XAD-Säule, stellt mit einem Wert von 1,9 mg/l, bei einem gesamt DOC-Gehalt im GW von 9,1 mg/l, einen Anteil von 20,8% am DOC dar. Der HS-Anteil liegt, verglichen mit dem bei Ziechmann (1980) angegebenen Wert von maximal 90% Anteil am DOC, auf einem niedrigen Niveau und lässt sich mit der oberflächennahen Lage des untersuchten GW-Leiters erklären.

4.2.1.4 LC-DOC-Messung

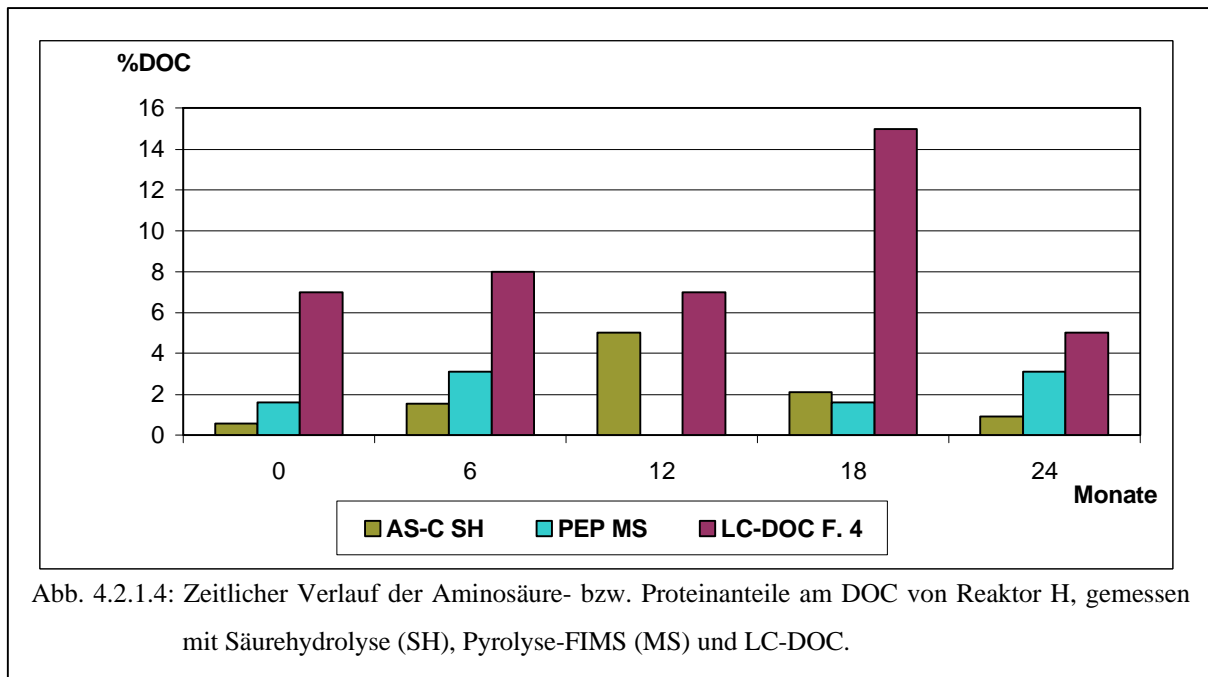
Die LC-DOC-Analysen geben mit 58% einen relativ geringen Anteil an hydrophilen organischen Substanzen (cDOC) für das Grundwasser wieder. Der hohe Anteil hydrophober organischer Bestandteile (HOC = 42%) setzt sich aus Huminen, organischen Kolloiden und partikulärer org. Substanz zusammen. Diese Stoffe sind als refraktär zu bezeichnen und liegen in der Regel für MO in einer nicht oder nur sehr schwer bioverfügbaren Form vor, und stehen den MO somit nur in geringem Umfang als C- und Energiequelle zur Verfügung. Der Anteil der HS-Fraktion in der LC-DOC-Analytik des GW beträgt 34% vom DOC. Im Gegensatz dazu konnte mit dem, bei Hack und Selenka (1989) beschriebenen Verfahren zur HS-Extraktion über XAD-Säulen, in demselben GW nur ein HS Anteil von 20,8% ermittelt werden. Diese Diskrepanz spiegelt die Schwierigkeiten in der HS-Analytik und Differenzierung wider. Der höhere Anteil der HS-Fraktion in der LC-DOC-Messung kann aber auch durch die Zusammenfassung eines größeren Spektrums an Substanzen in der Detektion begründet sein. Die HS-Fraktion wird in der LC-DOC-Analytik als Integral von aquagenen Polysacchariden über Fulvinsäuren zu pedogenen Huminsäuren beschreiben. Polysaccharide (Fraktion 5 der LC-DOC, siehe Tab. 3.2.4) und mineralische Kolloide (Fraktion 6) konnten weder im GW noch in dem DOC des Reaktor H nachgewiesen werden. Fraktion 5 ist biogenen Ursprungs und von vermutlich guter Bioverfügbarkeit, da sie in biologisch ausgezehrten oder gealterten

Wässern nicht nachgewiesen wird. Fraktion 6 tritt häufig in anaeroben Grundwässern auf, in aeroben wurde sie bisher nicht nachgewiesen (Huber und Frimmel, 1996).

Nahezu der gesamter Anteil des DOC in der Lösung des Reaktor H besteht aus hydrophilen, chromatographierbaren Substanzen. Die Zusammensetzung der zugegebenen HS (DFG 1/2) wird mittels der LC-DOC-Analyse noch einmal in einzelne Fraktionen aufgesplittet, die Daten sind in Tab. 3.2.4 wiedergegeben. Die geringen Schwankungen in der Verteilung der detektierten Fraktionen während der ersten 12 Monate Inkubation lassen keine Aussage über die mikrobiellen Veränderungen an den HS bzw. an der HS-Fraktion des DOC zu. Die mikrobielle Nutzung der HS als C- und Energiequelle konnte nachgewiesen werden (s. 4.2.1.5 und 4.2.2.5). Diese Nutzung führte zu Transformationen an den HS, ohne dass dadurch ihre Grundstruktur, durch die sie in der LC-DOC-Detektion charakterisiert sind, verändert wurde (s. 4.2.1.6 und 4.2.1.7). Erst in der Probe nach 18 Monaten Inkubation zeigten sich deutliche Veränderungen in der Zusammensetzung des DOC, der hier mit 54,6 mg/l seinen niedrigsten Wert erreichte. Die Fraktion der HS ist deutlich reduziert, der HOC Anteil deutlich erhöht. Das bedeutet, dass die MO starke Veränderungen an den HS vorgenommen haben, die zur Bildung hydrophoberer Substanzen, wie z.B. Humine führten. Diese Zunahme steht im Widerspruch zu den Ergebnissen der Py-FIMS, hier wurde eine Abnahme hydrophober Substanzen wie z.B. Fettsäuren und Lipiden ermittelt. Der gleichzeitig gemessene Anstieg amphiphiler Substanzen (Fraktion 4: Proteine, Peptide, Aminozucker) in der LC-DOC, läßt sich mit der Freisetzung dieser Substanzen aus den mikrobiell veränderten HS erklären.

Das die höchsten Anteile von Fraktion 4 in der LC-DOC nach 18 Monaten Inkubation gemessen wurden, steht im Gegensatz zu den Ergebnissen der Säurehydrolyse (4.2.1.6) und der Pyrolyse-FIMS (4.2.1.7). In der Säurehydrolyse wurde der höchste Anteil an Aminosäure-Kohlenstoff nach 12 Monaten Inkubation ermittelt, in der Py-FIMS wurde für die Substanzklasse der Peptide nach 24 Monaten Inkubation der maximal Wert gemessen (s. Abb. 4.2.1.4).

In weiteren Versuchen mit dem unter 2.1 beschriebenen Rührkesselfermenter zeigten sich innerhalb der 10 Wochen Inkubationszeit ähnliche Veränderungen in der Zusammensetzung der DOC-Fraktionen (Tab. 4.2.1.4) wie in Reaktor H. Der Ansatz wurde ebenfalls mit GW aus Brunnen 14 (Wasserwerk Bremen Blumenthal) und den HS DFG 1/2 (100 mg/l) inkubiert. Die innerhalb eines kürzeren Zeitraums (hier 10 Wochen) detektierten Veränderungen, d.h. das Absinken des HS-Peaks, die Erhöhung des HOC-Anteils und die Verdoppelung der Building Block Fraktion, fiel mit einer Erhöhung der Gesamtzellzahlen um mehr als eine Zehnerpotenz zusammen. Durch die Begasung des Fermenters war eine bessere Sauerstoffversorgung der



Lösung im Vergleich zu den Reaktoren gewährleistet. Hierdurch waren zur mikrobiellen Transformation der HS bessere oxidative Bedingungen geschaffen, die sich in der schnelleren Veränderungen der Fraktionen, verglichen mit Reaktor H, zeigten.

Tab. 4.2.1.4: Verteilung der mittels LC-DOC Messung bestimmten Fraktionen im Rührkessel-fermenter.

Anteil in % DOC	t = 0	t = 10 Wochen
HS-Peak (F.1)	74	69
Building Blocks (F.2)	3	6
Salzpeak (F.3)	13	14
Proteine, AS (F.4)	7	6
cDOC	97	95
HOC	3	5
log GZZ / ml	5,57	6,75

F. = Fraktion; Fraktion 5 und 6: n.d.; cDOC: chromatographierbarer, hydrophiler Anteil. HOC: nicht chromatographierbarer, hydrophober Anteil. AS: Aminosäuren

4.2.1.5 BDOC-Bestimmung

Messungen zur Bestimmung des biologisch abbaubaren gelösten organischen Kohlenstoffs (BDOC) werden hauptsächlich in der Trinkwasseraufbereitung angewendet. Sie dienen als Leitwert um eine Aussage zum Potential der Wiederverkeimung von Trinkwasserleitungssystemen zu erhalten (Laurent et al., 1999; Prévost et al., 1998). In der vorliegenden Arbeit sollte mit den Messungen des BDOC der bioverfügbare Anteil an den eingesetzten HS erfasst werden. Durch die moderaten Änderungen des DOC und der Zellzahlen über einen Inkubationszeitraum von 14 Tagen zeigte sich, dass die eingesetzten MO die HS als alleinige C- und Energiequelle nutzen können. In allen vier Ansätzen stiegen die Gesamtzellzahlen um eine halbe Zehnerpotenz. In den Ansätzen mit einer HS-Konzentration von 50, 100 und 500 mg/l nahm der DOC der Lösung um ca. 10% ab. Lediglich in den Ansätzen mit einer HS-Konzentration von 10 mg/l stieg der DOC um 8% an. Die Ergebnisse der drei erstgenannten Ansätze stehen in Einklang mit denen von Plenz (1994). Er beziffert den als mikrobiell nutzbaren Anteil am DOC im GW mit 11%. Plenz (1994) verwendete in seinem Screening HS-Konzentrationen in einem Bereich zwischen 0,1 und 10,0 mg/l. Wachstumsfördernde Wirkungen von HS auf MO ermittelte er bei Konzentrationen bis zu 100 mg/l, höhere Konzentrationen wurden bei ihm nicht überprüft.

Der Anstieg der Zellzahlen und des DOC um 8% in den Ansätzen mit einer HS-Konzentration von 10 mg/l steht in Übereinstimmung mit den Messergebnissen des Reaktor K. Auch dort konnte ein Ansteigen der Zellzahlen und des DOC, ohne Zugabe von weiteren C-Quellen beobachtet werden. Volk et al. (1997) führten Untersuchungen zur Erhöhung des BDOC-Anteils bei der Behandlung von Rohwässern in der Trinkwasseraufbereitung durch. Sie fanden in einer fulvinsäurehaltigen Lösung einen BDOC von 8%, den sie durch Ozonbehandlung der Lösung auf 35% erhöhen konnten. In diesem Fall bewirkte das Ozon als Radikalbildner eine erhöhte Bioverfügbarkeit der Fulvinsäure-Moleküle. Es zerlegte diese in kleinere Bruchstücke und erhöhte die Anzahl der reaktiven Gruppen.

4.2.1.6 Säurehydrolyse der Huminstoffe

Die qualitativen und quantitativen Veränderungen in den Aminosäure (AS)- und Kohlenhydrat (KH)-Kohlenstoff-Anteilen des DOC, zeigten die mikrobiell bedingten Transformationen an den HS auf. In der Summe ergab sich für die AS und KH ein unterschiedlicher Verlauf über die Inkubationszeit. Die Menge der an HS assoziierten AS erreichte bei einem konkaven Kurvenverlauf ihren Maximalwert nach 12 Monaten Inkubation (s. Abb. 4.2.1.4), während der

Anteil an KH mit der Inkubationszeit deutlich zunahm (s. Abb. 3.2.6). Mit Ausnahme von Prolin und Isoleucin folgten alle einzel detektierbaren AS dem beschriebenen Verlauf (s. Tab. A 3.2.6). Dieser Anstieg trat in dem gleichen Zeitfenster auf, in dem die Zellzahlen in Reaktor H auf einem sehr hohen Niveau lagen. Unter der Prämisse, dass in diesem Zeitraum in dem Reaktor H eine hohe mikrobielle Aktivität, d.h. auch die vermehrte Abgabe von extrazellulären Enzymen, stattfand, läßt sich die Zunahme des AS-Anteils mit unspezifischen Bindungen von Enzymen an die HS erklären. Die von Müller-Wegener (1988) beschriebenen direkten und indirekten Reaktionen zwischen HS und Enzymen führen neben Hemmungen der enzymatischen Wirkung auch zu Bindungen der Enzyme an die HS-Matrix und damit zu steigenden AS-Anteilen in der SH. Die Zusammensetzung der AS-Anteile am DOC entsprach nach 12 Monaten Inkubation, mit geringen Abweichungen, qualitativ und quantitativ denen des eingesetzten Grundwassers.

Betrachtet man die Kohlenhydrate, so ist eine eindeutige Tendenz in der Zunahme von Einzelsubstanzen lediglich für Galactose; Fructose, Ribose und Mannose/Xylose während der letzten 12 Monate Inkubation feststellbar, als einziger Zucker war in allen Proben Glucose nachweisbar. Eine Zunahme bakterienbürtiger Desoxyzucker (Fucose und Rhamnose) konnte nicht verzeichnet werden. Beide konnten nur in den Proben $t = 0$ und 18 Monate nachgewiesen werden (s. Tab. A 3.2.6). Desoxyribose bildet das Grundgerüst der DNA. In den untersuchten Proben konnte nur nach 18 und 24 Monaten Inkubation Ribose nachgewiesen werden. Diese stammt vermutlich aus DNA von abgestorbenen und lysierten Zellen. Diese gelöste DNA bindet an die HS-Matrix und setzt bei der sauren Hydrolyse Ribose frei.

Die gemessenen Gesamtwerte an assoziierten KH waren in Reaktor H mit 1,39 bis 12,36 $\mu\text{gC}/\text{mg DOC}$ und 2,36 $\mu\text{gC}/\text{mg DOC}$ in Reaktor K relativ niedrig angesiedelt. Hack (1988) konnte in Grundwässern KH-Werte zwischen 1,4 und 17,4 $\mu\text{gC}/\text{mg DOC}$ ermitteln, mit abnehmender Tendenz bei steigender Bohrtiefe. In den entsprechenden Sedimenten betrug der Anteil 0,1 bis 9,0 $\mu\text{gC}/\text{mg DOC}$, und in der ungesättigten Zone fand er sogar einen KH-Anteil bis zu 126 $\mu\text{g}/\text{mg DOC}$. Thurman (1985) gibt den KH-Anteil am organischen Kohlenstoff in XAD-Extrakten aus GW mit Werten zwischen 1% und 4% (= 10 - 40 $\mu\text{gC}/\text{mg DOC}$) an. Malcolm (1985) findet in der Fulvin-Fraktion aus einem Fluss ca. 5%, in der entsprechenden HS-Fraktion ca. 10% KH-Anteil.

Die KH lagen in der HS-Matrix vermutlich nicht als Mono- sondern als Polysaccharide vor. Sie werden erst durch die SH in Monomere gespalten, sodass sich mit dieser Untersuchungsmethode die Anteile einzelner KH messen lassen, nicht aber in welcher polymeren Form sie im

HS-Molekül gebunden vorliegen.

4.2.1.7 Pyrolyse-FIMS der Huminstoffe

In der vorliegenden Arbeit wurde keine Auftrennung der Proben in Huminsäuren (HA) und Fulvinsäuren (FA) vorgenommen. Die Py-FIMS Daten beziehen sich immer auf den Gesamtextrakt. Eindeutige Veränderungen in der Zusammensetzung der HS konnten in den Untersuchungen mit der Py-FIMS nachgewiesen werden. Mit zunehmender Inkubationszeit zeigten sich in den Massenspektren der Proben kleinere Fragmente des thermischen Abbaus der extrahierten HS, welche auch einer deutlichen Änderung in ihrer Zusammensetzung unterlagen. Ein Vergleich der beiden Spektren zu Beginn und nach 24 Monaten Inkubation (Abb. 3.2.7) zeigt eine klare Verschiebung der Pyrolyse-Produkte zu Substanzen mit einer geringeren Massenzahl, einer Transformation von einem stark fulvinhaltigen HS ($t = 0$ Monate) hin zu einem fulvinärmeren HS ($t = 24$ Monate). Fulvinsäuren sind aufgrund ihrer geringeren Molekülgröße und der besseren Wasserlöslichkeit im Vergleich zu Huminsäuren leichter von MO zu verwerten. Die gemessenen Transformationsprozesse an den HS beruhen also nicht nur auf Veränderungen in der Struktur und dem Aufbau einzelner Moleküle, d.h. Abbau assoziierter Moleküle und Verwertung von mikrobiell abbaubaren reaktiven Gruppen, sondern anscheinend auch in der Mineralisation von Substanzen, die als FA definiert werden. Abbt-Braun (1987) und Schulten (1992, 1999) wiesen in ihren Untersuchungen ein unterschiedliches Verhalten von HS, Huminsäuren und Fulvinsäuren in der Py-FIMS nach. Besonders anschaulich sind die Effekte bei Schulten (1999) heraus gestellt. Die Massenspektren von FA sind durch einen breiten Massenbereich mit einer hohen Total Ionen Intensität (TII) und hohem mittlerem Molekulargewicht charakterisiert. Massenspektren von HA zeichnen sich durch niedrige mittlere Massenanteile und eine geringere TII aus.

In den Thermogrammen der Proben ist das, bei Abbt-Braun (1987) beschriebene, zweistufige thermische Abbauverhalten von HS in der Pyrolyse in den Proben $t = 6, 18, 24$ Monate deutlich erkennbar. In diesen Proben begann die thermische Zersetzung bereits unter 200°C , stieg ab ca. 300°C stärker an, mit einem Maximum zwischen 460°C und 480°C und zeigte damit ein typisches Verhalten für HS in der Pyrolyse. Das Thermogramm der Probe $t = 0$ zeigt dagegen einen Verlauf, der dem einer FA in der Untersuchung von Schulten (1999) sehr ähnlich ist, und bestätigt damit den hohen Anteil an FA in dieser Probe, der sich auch in den Massenspektren widerspiegelte.

Betrachtet man die prozentualen Änderung der detektierbaren Substanzklassen ($t = 0$ Monate entspricht 100%), war eine eindeutige Abnahme lipophiler Substanzen und eine Zunahme

hydrophober Substanzen zu verzeichnen. Drastische Änderungen betrafen hier vor allem den Anteil der Peptide, er stieg während der Inkubationszeit um über 150 % an, und zeigte einen gegenläufigen Trend zu den Ergebnissen der LC-DOC-Messung und Säurehydrolyse (s. Abb. 4.2.1.4).

4.2.2 Mikrobiologische Untersuchungen

4.2.2.1 Bestimmung der Lebendzellzahl (KBE)

Die erhöhte Inkubationstemperatur in den Reaktoren und die Oberflächeneffekte der Glaskugeln führten, neben weiteren Effekten, innerhalb kurzer Zeit zu einer deutlichen Zunahme der Lebendzellzahlen der aquatischen Phase und des Aufwuchses in beiden Reaktoren. Im Vergleich zu dem eingesetzten GW erhöhten sich die Lebendzellzahlen innerhalb eines Monats um vier Zehnerpotenzen. Die Lebendzellzahlen waren in den Reaktoren höher als in natürlichen, unbelasteten GW-Biotopen, in denen tiefenabhängige KBE-Werte zwischen $\log 4,0$ /ml (Oberflächennah) und unter $\log 1,0$ /ml gemessen wurden (Hack, 1988; Kölbel-Boelke, 1987; Kölbel-Boelke und Nehr Korn 1992; Otremba, 1992). Neben der Selektion durch die Medien-Zusammensetzung hatte die Inkubationstemperatur einen entscheidenden Einfluss auf die Zellvermehrung bei der KBE-Bestimmung. Eine primäre Selektion durch die erhöhte Inkubationstemperatur (GW-Temp.: 6°C, Inkubtemp.: 20°C) hat damit auch in dem hier verwendeten Reaktorsystem stattgefunden und zu einer ersten Verschiebung des Artenspektrums geführt.

Die Schwankungen im zeitlichen Verlauf der KBE-Werte des Aufwuchses lassen auf eine nicht optimale Methode der Ablösung schließen. Im Gegensatz zur Ultraschallbehandlung wurden mit Quarzsand höhere KBE-Werte erzielt. Inwieweit aber die Scherkräfte zu groß (Zerstörung der Zellen) oder zu klein (nicht vollständiges Ablösen der Zellen von den Glaskugeln) waren, wurde im Rahmen dieser Arbeit nicht überprüft. Während die KBE der aquatischen Phasen innerhalb der ersten 14 Monate Inkubation nur von leichten Schwankungen gekennzeichnet war, betragen die Unterschiede bei dem Aufwuchs innerhalb eines Monats bis zu dreiviertel einer Zehnerpotenz. Die Differenzen in den KBE-Zahlen zwischen den beiden Reaktoren liegen im Fehlerbereich der Methode und lassen keinen Wachstumsvorteil in Form höherer Lebendzellzahlen durch die Zugabe der HS erkennen. Otremba (1992) ermittelte in einem ähnlichen Reaktorsystem mit geringerer HS-Zudosierung (Festbettreaktoren, gefüllt mit Glaskugeln, kontinuierlich im Gegenstrom von GW durchspült, Zudosierung von HS der Fa. Fluka), niedrigere KBE-Werte als die hier gemessenen. Sie erfasste in der aquatischen Phase

im Mittel KBE-Werte von $\log 2,8$ /ml ohne und $\log 3,2$ /ml mit HS-Zusatz. Auch die Aufwuchsbesiedlung auf den Glaskugeln ihrer Untersuchungen zeigte mit KBE-Mittelwerten von $\log 3,3$ /cm² (ohne HS) und $\log 4,3$ /cm² (mit HS) deutliche Wachstumsvorteile durch den HS-Zusatz. Generell sind in GW-Leitern die Sedimente stärker besiedelt als das freiströmende Wasser (Kölbel-Boelke, 1987). Matthess (1994) gibt 80% bis 99% der MO an Partikel gebunden an. Die Besiedlung von Oberflächen in nährstoffarmen Biotopen bietet den MO den Vorteil der kontinuierlichen Versorgung mit Nährstoffen durch das vorbeiströmende Wasser. Durch die Akkumulation der Nährstoffe an den Oberflächen und dem Biofilm (Meyer-Reil, 1996) entsteht eine bessere Nährstoffversorgung im Vergleich zu den frei flottierenden MO. Die hier mittels KBE gemessenen Lebendzellzahlen scheinen bei einem Vergleich der Werte der aquatischen Phase und des Aufwuchs im Widerspruch zu diesem Vorteil zu stehen. Die KBE /ml lagen über denen der Glaskugeln /cm². Erst mit dem Absinken des DOC in Reaktor K zeigte sich ein sprunghafter Rückgang der KBE /ml, während die Lebendzellzahlen des Aufwuchses nahezu konstant blieben. Ein direkter Vergleich der Zahlen ist hier aber nicht zulässig, da sich die Werte auf verschiedene Maßeinheiten (ml und cm²) beziehen. Die in natürlichen Sedimenten gefundenen höheren KBE-Werte anderer Untersuchungen beziehen sich immer auf Gramm Trockengewicht der entnommenen Probe. Sedimente haben eine große innere Ober- und damit mögliche Besiedlungsfläche für MO. Hieraus lassen sich die höheren Lebendzellzahlen der Sedimente im Vergleich zu der glatten Oberfläche der Glaskugeln erklären.

4.2.2.2 Gesamtzellzahl-Bestimmung mit Acridinorange

Die Gesamtzellzahlen (GZZ) /ml stiegen in beiden Reaktoren, durch die oben beschriebenen Effekte, während des ersten Monats um ca. zwei Zehnerpotenzen an und lagen ca. eine über denen der entsprechenden KBE /ml. Die bessere Nährstoffversorgung im Reaktor H führte zu deutlich höheren GZZ /ml als im Kontrollreaktor, bereits nach vier Monaten Inkubation lagen sie bis zu einer Potenz über denen des Kontrollreaktors. Die im GW ermittelten GZZ /ml lagen um zwei bis drei Zehnerpotenzen über den KBE-Werten /ml. Diese Ergebnisse decken sich mit denen von Hack (1988) und Kölbel-Boelke (1987). Auch sie ermittelten in Grundwässern Differenzen von zwei bis drei Potenzen zwischen GZZ /ml und KBE /ml. Hirsch und Rades-Rohkohl (1992) fanden dagegen in ihren Untersuchungen von GW-Brunnen nur Unterschiede von maximal einer Potenz zwischen Lebend- und Gesamtzellzahlen. Das verminderte Nährstoffangebot im Reaktor K ab Inkubationsmonat 15 wirkte sich auch auf die GZZ /ml aus, sie sank um über eine halbe Potenz ab.

4.2.2.3 Kolonie- und zellmorphologische Bestimmung

Kolonie- und zellmorphologische Eigenschaften von isolierten Reinkulturen stehen oft in direkter Abhängigkeit zu dem verwendeten Medium, sodass sich bei gesonderter Betrachtung dieser Daten noch keine Aussagen über bakterielle Diversitäten treffen lassen. Dennoch zeigten die Veränderungen der kolonie- und zellmorphologischen Eigenschaften der Isolate erste Verschiebungen innerhalb der mikrobiellen Gemeinschaft des Versuchssystems auf. Besonders deutlich zeigte dies das völlige Fehlen gram positiver Stämme nach einem Jahr Inkubation. Lag der Anteil gram negativer Isolate im GW nur bei 14,3%, war er nach einem halben Jahr bereits auf 77,8% (KAA) bis 100% (KLA) in den einzelnen Phasen angestiegen. Ähnliche Effekte, jedoch deutlich schwächer ausgeprägt beobachtet Otremba (1992). Auch in ihrem Versuchsaufbau erhöhte sich der Anteil gram negativer Isolate in der aquatischen Phase geringfügig und im Aufwuchs deutlich im Vergleich zum zuströmenden GW. Im Gegensatz dazu fand Gültekin (1997) im Sediment von Langsamsandfiltern mit zunehmender Tiefe ansteigende Zahlen gram positive Isolate. Er ermittelte einen Anteil zwischen 27% und 67%. Auch Kölbel-Boelke (1987) und Preuß (1991) stießen in ihren Untersuchungen auf mehr gram positive Isolate (bis zu 60%) in den Sedimentproben als in der aquatischen Phase.

Als häufigste Zellform traten unter den Isolaten Stäbchen auf. Der Anteil beweglicher Formen nahm in den Gemeinschaften mit zunehmender Inkubationszeit ab, unter HS-Einfluss deutlicher als im Kontrollreaktor und im Aufwuchs ausgeprägter als in den aquatischen Phasen. Otremba (1992) beobachtete dagegen in ihrem Versuchsaufbau eine Zunahme beweglicher MO, mit einem deutlich höherem Anteil im Aufwuchs unter HS-Zugabe als in der entsprechenden aquatischen Phase. Sporenbildner konnten nur im GW und nach einem halben Jahr Inkubation aus der aquatischen Phase des Kontrollreaktors isoliert werden. Aufgrund des mikroskopischen Bildes ließen sich diese Isolate der Gattung *Bacillus* spp. zuordnen. Als typische Besiedler von Böden (Slepecky und Hemphill, 1992) finden sie sich auch in aeroben, oberflächennahen Grundwässern (Bonde, 1985; Chapelle, 1993). Buchanan-Mappin et al. (1986) identifizierten, unabhängig vom Isolationsmedium, in ihren Untersuchungen *Bacillus* spp. als Hauptgruppe der Isolate eines GW-Biotops. Unter 4.2.2.5 wird noch einmal gesondert auf diese Gattung eingegangen.

4.2.2.4 Stoffwechselphysiologische Charakterisierung der Isolate

Die durchgeführten biochemischen Wachstumstests stellen das mögliche Potential der einzelnen Isolate und, zusammengefasst, das der Gemeinschaften dar, die angebotenen Substrate als C- und Energiequelle zu nutzen. Diese Ergebnisse stehen immer unter dem Vorbehalt, dass sie unter *in vitro* Bedingungen ermittelt wurden. Sie lassen keinen direkten Vergleich zu den *in situ* Bedingungen zu. Es ist aber möglich, die Veränderungen in den physiologischen Fähigkeiten der isolierten MO unter den gegebenen Bedingungen aufzuzeigen. In der vorliegenden Arbeit wurde das biochemische Potential von 600 Stämmen, die aus einem GW und der Versuchsanlage isoliert wurden, überprüft. Da die Reaktoren mit dem untersuchten GW angeimpft wurden, stellen die aus den Reaktoren isolierten MO auch einen Teil der GW-Besiedlung dar. In den Reaktoren kam es durch die veränderten Bedingungen zu Umwandlungen in der Populationsstruktur. Die Gemeinschaften wurden von Isolaten dominiert, die den neuen gegebenen Bedingungen angepasst waren. So waren z.B. nach 18 Monaten Inkubation nur noch 26,7% der Isolate der aquatischen Phase aus Reaktor H in der Lage bei einer Temperatur von 4°C zu wachsen. Im GW betrug der Anteil 100%.

Als Maß für das biochemische Potential und die Diversität der Gemeinschaften dienten die, aus den Stoffwechseleigenschaften errechneten, mittleren *in vitro* Aktivitäten. Das Spektrum der Aktivitäten einzelner Stämme, die angebotenen Substrate zu verwerten, lag in einem Bereich zwischen 3,1% (KAC) und 64,1% (OP). Die mittleren Gesamtaktivitäten der Gemeinschaften waren in einem Bereich zwischen 17,2% (KAC) und 35,9% (OP) angesiedelt (s. Tab. A 3.3.6, Anhang). Die höchsten Aktivitäten zeigten die MO des GW, alle Isolate waren in der Lage über 20% der Substrate zu verwerten. Klare Unterschiede konnten sowohl zwischen den Reaktoren als auch zwischen der aquatischen Phase und dem Aufwuchs im Kontrollreaktor festgestellt werden. Mit Ausnahme des Probenahmetermins C (18 Monate Inkubation) wiesen die Isolate aus Reaktor H niedrigere Gesamtaktivitäten als die des Kontrollreaktors auf. Die Reaktoren wurden im batch-Ansatz betrieben, sodass in dem Kontrollreaktor ein direkter Zusammenhang zwischen der Abnahme des DOC (Verringerung um 50% zum maximal Wert) und den kontinuierlich sinkenden Gesamtaktivitäten (und Zellzahlen) hergestellt werden kann. Der bioverfügbare Kohlenstoff der Lösung hatte sich im Laufe der Inkubation soweit reduziert, dass der noch verbleibende Anteil des DOC sich aus refraktären Substanzen zusammensetzte, der nur von wenigen oligocarbophilen Spezialisten unter den MO als C- und Energiequelle genutzt werden konnte.

Die Gemeinschaften der aquatischen Phase zeigten höhere Aktivitäten als die des Aufwuchses.

Die niedrigeren Aktivitäten des Aufwuchses stehen im Widerspruch zu den Ergebnissen anderer Autoren. Kölbel-Boelke et al. (1987), Marxen (1988) und Preuß (1991) führten ihre Untersuchungen an Proben durch, die direkt aus GW-Leitern gewonnen wurden. Sie konnten den Sedimentisolaten höhere Gesamtaktivitätswerte als denen der aquatischen Phase zuordnen. Unterstützt werden die in dieser Arbeit gemessenen Ergebnisse von Otremba (1991). Mit einem geringeren Umfang von 31 Tests überprüfte sie die physiologischen Fähigkeiten der in ihrem Versuchsaufbau (Festbettreaktoren, gefüllt mit Glaskugeln, kontinuierlich im Gegenstrom von GW durchspült, Zudosierung von HS der Fa. Fluka) isolierten MO. Die Aktivitätsspektren ihrer Isolate reichten von 0% bis 76%. Mittlere Gesamtaktivitäten werden bei ihr nicht angegeben. Die Isolate aus dem freien Wasser wiesen in ihren Untersuchungen höhere Aktivitäten auf als die Isolate der Glaskugeloberfläche. Als signifikant beschreibt Otremba (1991) die Unterschiede der Aktivitätsspektren unter HS-Einfluss, während sie ohne HS-Zugabe zufällig waren.

Insgesamt bewegen sich aber die errechneten physiologischen Fähigkeiten der Isolate der Reaktoren H und K in den Bereichen, die in anderen Untersuchungen zur Aktivität von GW-MO gemacht wurden. Kölbel-Boelke (1987) fand in den von ihr untersuchten Brunnen mittlere Gesamtaktivitäten zwischen 11,9% und 43,0% mit Aktivitätsbereichen einzelner Stämme von 0% bis 75%. Preuß (1991) ermittelte bei einem fast gleichen Aktivitätsspektrum der Isolate (0,0% - 76,2%) mittlere Gesamtaktivitäten die in einen etwas engeren Bereich zwischen 21,0% und 31,3% fallen. Einen Teil dieser Isolate unterzog Plenz (1994) weiteren Untersuchungen. Er berechnete anhand von 42 physiologischen Tests für die Isolate des freien Wassers mit 17,5% eine um 3% geringere, und für die Sedimentflora mit 26,0% eine um 2% erhöhte mittlere Gesamtaktivität. Auch die Spektren der Aktivitätsbereiche wichen in seiner Arbeit nur unwesentlich von denen durch Preuß (1991) berechneten ab. Weitere, aus einem anderen GW-Leiter isolierte MO zeigten in seiner Arbeit mit 7,2% nur sehr geringe mittlere Aktivitäten.

Die in der vorliegenden Untersuchung gemessenen, geringeren physiologischen Aktivitäten unter HS-Einfluss stehen in einem scheinbaren Widerspruch zu den erhöhten Zellzahlen im Reaktor H. Der Nachweis, dass die HS den isolierten MO als alleinige C- und Energiequelle dienten, wurde durch die Untersuchungen zum BDOC und dem Wachstum der Isolate auf Festmedien mit HS-Zusatz gezeigt. Auch die mittels LC-DOC, SH und Py-FIMS nachgewiesenen Transformationen an den HS geben unmissverständliche Hinweise auf die mikrobiellen Einflüsse in der Umsetzung der HS. Ein Grund der geringeren Aktivitäten der Isolate aus Reaktor H könnte darin liegen, dass sich die MO an das HS-haltige Milieu

angepasst hatten und physiologische Fähigkeiten aufzeigten, die mit den durchgeführten Tests nicht nachweisbar waren. Diese Anpassungen von MO an HS-haltige Medien konnte Visser (1985b) in seinen Untersuchungen nachweisen. Weiterhin sind nicht alle Stämme einer Art zwingend zur Verwertung eines spezifischen Substrates fähig (Buchanan und Gibbons, 1974; Krieg und Holt, 1984).

Eine stoffspezifische Induktion zum Wachstum mit HS als alleiniger C- und Energiequelle war mit den hier verwendeten HS DFG 1/2 nicht gegeben. Auf Festmedien waren zwischen 22,2% (KAA) und 100% (KAB) der Isolate in der Lage diesen HS als alleinige C- und Energiequelle zu nutzen. Die Anteile der positiven Isolate aus dem Kontrollreaktor lagen auf dem gleichem Niveau wie die des Reaktor H. Diese Ergebnisse zeigen zum einen eine relativ gute Bioverfügbarkeit des HS (s. 4.2.1.5, BDOC), zum anderen, dass die Fähigkeit zur Verwertung des HS DFG 1/2 nicht stoffspezifisch induziert wird (s.u. und Plenz, 1994). Eine Adaptation an refraktäre Substanzen wie HS ist bei den MO des GW bzw. Reaktor K durch die Zusammensetzung des DOC bereits vorhanden. In Abhängigkeit von der Messmethodik konnte in dem GW ein HS-Anteil von 20% = 1,8 mg/l (XAD-Extraktion) bzw. 34% = 3,1 mg/l (LC-DOC) nachgewiesen werden.

Durch den Zusatz von Cosubstraten zu dem HS-Medium ließ sich kein verbessertes Wachstum der Stämme beobachten. Der Zusatz von Malonat und Succinat führte zu einer Unterdrückung bzw. starken Reduzierung des Wachstums der Isolate. Von insgesamt 601 untersuchten Stämmen besaßen 13,3% die Fähigkeit mit Malonat als alleiniger C-Quelle zu wachsen. 91,3% dieser Isolate zeigten Wachstum mit HS als alleiniger C-Quelle, waren aber nicht in der Lage, auf HS mit dem Cosubstrat Malonat zu wachsen. Alle Isolate, die mit HS und dem Cosubstrat Malonat Wachstum zeigten, konnten auch HS als alleinige C- und Energiequelle zum Wachstum nutzen. Diente jedoch Malonat als alleinige C-Quelle im Medium, war bei keinem der Isolate ein Zellvermehrung zu beobachten. In 6 der 13 Gemeinschaften führte die Zugabe von Succinat als Cosubstrat zu den HS, zu einem verminderten Wachstum der Isolate im Vergleich zu dem Medium mit HS als alleiniger C-Quelle. Auch hier fanden sich, in ähnlicher Verteilung wie für Malonat beschrieben, Stämme, die sowohl auf den HS, als auch auf Succinat als alleiniger C-Quelle wachsen konnten, aber nicht auf Medien, die HS und das Cosubstrat Succinat enthielten. Die Eigenschaft von Malonat, als kompetitiver Hemmstoff bei der Succinatumsetzung in MO zu wirken, ist bei Schlegel (1992) beschrieben. Eine direkte, den bakteriellen Stoffwechsel hemmende Wirkung von Malonat und Succinat kann aufgrund des oben beschriebenen Wachstums von einigen Isolaten mit den Dicarbonsäuren als alleiniger C-

und Energiequelle ausgeschlossen werden. Die Ergebnisse sind Anzeichen für eine Änderung der HS durch die Zugabe von Malonat und Succinat, die zu einer verminderten Bioverfügbarkeit der HS führt. Mögliche Ursachen könnten in einer Protonierung reaktiver Gruppen an den HS oder eine Präzipitation durch den absinkenden pH-Wert zu sehen sein.

In einem Screening zum Wachstum von drei GW-Gemeinschaften auf verschiedenen HS überprüfte Plenz (1994) auch den in dieser Arbeit verwendeten HS DFG 1/2. Bei Konzentrationen zwischen 0,1 und 10,0 mg/l wuchsen 36,8% seiner Isolate mit dem HS DFG 1/2 als alleiniger C- und Energiequelle. Eine Abhängigkeit von der eingesetzten HS-Konzentration wurde nicht festgestellt. Alle Gemeinschaften zeigten auf den HS-Medien eine höhere Aktivität als auf den Tests zur allgemeinen physiologischen Aktivität (s.o.). Die größten Differenzen traten hier bei den aus dem Fuhrberger Feld isolierten Stämmen auf. Bei einer mittleren Gesamtaktivität von 7,2% für die physiologischen Tests, waren 33,7% dieser Isolate in der Lage auf den 18 getesteten HS zu wachsen. Bemerkenswerterweise lag hier der Anteil der positiven Stämme für die, aus Fuhrberger Wasser extrahierten, HS am niedrigsten. Visser (1985b) wies in seinen Untersuchungen mit Bodenbakterien eine bis zu 2000fache Zellzahl-erhöhung durch die Zugabe von HS in Konzentrationen bis zu 30 mg/l nach. Für höhere HS-Konzentrationen bis zu 500 mg/l beschreibt er einen, in manchen Versuchsansätzen auftretenden, gegenteiligen Effekt mit verminderten Zellzahlen, aber keine toxischen Wirkungen auf die MO durch die HS. StoffwechsellLeistungen, die er an den eingesetzten Stämmen zuvor nicht nachweisen konnte, wurden in seinen Tests durch HS-Fractionen mit einem Molekulargewicht zwischen 1.000 und 10.000 induziert. Durch ihre Oberflächenaktivität erhöhen HS die Permeabilität von Zellmembranen, und zeigen damit ähnliche, die Zellzahlen erhöhende, Einflüsse wie Detergenzien, z.B. Tween (Visser, 1985b). Otremba (1992) konnte keine Nutzung der HS aus Fuhrberg und der Fa. Fluka als primäre C-Quelle zur dauerhaften Biomassenbildung durch einzelne Stämme nachweisen. Auch Tuschewitzki et al. (1992) konnten zeigen, dass der Stamm *Pseudomonas fluorescens* DSM 84 nicht fähig war HS (Fa. Fluka) als alleinige C-Quelle zu nutzen. In N- und P- limitierten Medien unter Zusatz eines Cosubstrates konnte der Stamm jedoch die HS als N- und P-Quelle nutzen.

Das höhere biochemische Potential der Isolate der aquatischen Phase wurde schon unter den *in vitro* Aktivitäten diskutiert. Betrachtet man nun die einzelnen Substanzgruppen, so sind generell höhere Aktivitäten bei der Verwertung von Sacchariden und organischen Säuren durch die Isolate der aquatischen Phasen beider Reaktoren gegenüber den Stämmen der Aufwuchsgemeinschaften ermittelt worden. Darüber hinaus ließ sich ein höheres Potential für

die Verwertung von Proteinen und lipolytischer Aktivitäten durch die Gemeinschaften des Kontrollreaktors feststellen. Werden die Aktivitäten der Kohlenhydrat (KH)-Verwertung zusammengefasst, so besteht in allen Gemeinschaften ein größeres Potential mit Polysacchariden Wachstum zu zeigen, als mit Mono-, Di-, oder Trisaccharide. Kölbel-Boelke (1987) beschreibt für ihre Gemeinschaften den entgegengesetzten Trend mit höheren Anteilen bei der Verwertung von Monosacchariden. Keine eindeutige Tendenz in der bevorzugten Verwertung von Mono-, Di-, Tri- oder Polysacchariden beschreiben Plenz (1994) und Preuß (1991) in ihren Untersuchungen. Kalmbach et al. (1999) konnten zeigen, dass die von ihnen aus einer Trinkwasserleitung isolierte und neu beschriebene Gattung *Aquabacterium* zu einer Metabolisierung von Sacchariden nicht fähig ist.

In der vorliegenden Untersuchung konnte eine Korrelation zwischen den, mit der Säurehydrolyse in den HS nachgewiesenen Kohlenhydraten und den Fähigkeiten der Isolate, diese Substanzen als alleinige C-Quelle in den physiologischen Tests zu verwerten, nicht aufgezeigt werden. Die mittels Säurehydrolyse detektierbaren Kohlenhydrate sind methodisch bedingt Monomere. Ob diese in dem HS-Molekül in einem Polymer gebunden, oder einer, von dem HS-Molekül maskierten, und damit für die MO nicht bioverfügbaren, Form vorlagen, läßt sich nicht aus den Hydrolysedaten schließen.

Die, für die hier untersuchten Gemeinschaften nachgewiesenen Eigenschaften, ein hohes Potential bei dem Abbau von Polymeren und lipophilen Substanzen, darzulegen, wird durch die Ergebnisse der Py-FIMS gestützt. Im Vergleich der Daten des Ausgangsmaterials mit dem nach 24 Monaten Inkubation trat auch hier eine deutliche Abnahme von lipophilen Substanzen und Makromolekülen als Anteile des DOC aus Reaktor H auf.

4.2.2.5 Clusteranalyse

Die Zusammenfassung der Isolate in Cluster diente als Maß der Diversität der jeweiligen Gemeinschaft. Die Clusterbildung erfolgte manuell. Als Schwellenwert wurde für die hier untersuchten Isolate eine Ähnlichkeit $\geq 90\%$ angesetzt. Kölbel-Boelke (1987), Plenz (1994) und Preuß (1991) benutzten als Grenze für ein Cluster eine Ähnlichkeit von $\geq 85\%$. Der in Abb. 3.3.7c dargestellte Diversitätsindex gibt die Schwankungen, denen die Gemeinschaften der einzelnen Standorte unterlagen wieder. Die Gemeinschaften der aquatischen Phase aus dem Kontrollreaktor zeigten sowohl die höchste Diversität, als auch die größten Schwankungen im zeitlichen Verlauf. Die gemeinsamen Clusterungen verschiedener Gemeinschaften zeigten nicht die erwarteten Einflüsse durch die HS auf. So konnten z. B. nach 18 Monaten Inkubation mehr

Isolate der Gemeinschaft KAC gemeinsamen Clustern mit den Isolaten HAC zugeordnet werden, als den Isolaten KLC. Das bedeutet, dass die Aufwuchsisolate des Kontrollreaktors nach 18 Monaten Inkubation den Aufwuchsisolaten des Reaktors H ähnlicher waren als den Isolaten der korrespondierenden aquatischen Phase. Hier ist der Standortfaktor, d. h. Wachstum auf der Glasoberfläche, von größerer Bedeutung für die Besiedlungsstruktur, als das Vorhandensein bzw. Fehlen der HS. Bei der gemeinsamen Clusterung der Gemeinschaften Aufwuchs / aquatisch eines Reaktors nach 18 Monaten Inkubation, zeigten die des Reaktor H eine geringere Diversität als die des Kontrollreaktors. Nach Matthess (1994) wachsen 80% - 99% der MO im GW auf festen Untergrundpartikeln auf. Durch mechanische Ablösung von Zellen und den Übergang in Schwärmerstadien sowie eine Anheftung und Sorption flottierender Zellen findet ein permanenter Austausch zwischen dem Aufwuchs und der aquatischen Phase statt. Die daraus resultierende hohe Ähnlichkeit konnte hier, bei gleichem Inokulum der Reaktoren, nur unter HS-Einfluss nachgewiesen werden. Kölbel-Boelke (1987) wies dagegen in ihren, aus einem natürlichen Biotop gewonnenen Gemeinschaften, keine relevanten Übereinstimmungen zwischen Sediment- und Wasserisolaten nach. Die ermittelten Diversitäten sind natürlich unter der Vorgabe der durchgeführten Untersuchungen und Isolierungsschritte zu betrachten.

Durch die Inkubation in den Reaktoren traten Veränderungen in den physiologischen Leistungen der Isolate auf, die anhand der Clusterung der gram positiven Sporenbildner aus dem GW und Reaktor K dargestellt werden sollen. Mittels Sequenzanalyse zweier Stämme und dem eindeutigen mikroskopischen Bildes konnten diese Isolate der Gattung *Bacillus* zugeordnet werden. Die Sequenzanalyse der 16S rDNA-PCR-Produkte der Isolate KAA 30 und 57 zeigte, dass beide Isolate einem Stamm angehören, die PCR-Produkte sind in ihrer Sequenz identisch. Der Vergleich mit den in dem RDP (Maidak et al., 1999) abgelegten Sequenzen zeigte eine Übereinstimmung von 0.961 mit *Bacillus subtilis*. In Abb. A 4.2.2.5a-b (Anhang) sind Dendrogramme dieser Isolate dargestellt, als Berechnungsgrundlage wurden die kolonie- und zellmorphologischen Charakteristika (a), sowie die physiologischen Leistungen (b) verwendet. Morphologisch konnten zwischen allen *Bacillus* Isolaten mit den erhobenen Daten Unterschiede bis maximal 10% ermittelt werden. Es bildeten sich zwei deutlich voneinander getrennte Cluster aus, die jeweils nur aus den Isolaten der Standorte OP oder KAA zusammengesetzt waren. Physiologisch betrug die errechneten Unterschiede bis zu maximal 39%. Auch die beiden sequenzierten *Bacillus* Stämme zeigten physiologische Unterschiede auf, die Differenz mit den hier durchgeführten Tests betrug 7%, morphologisch

gab es keine Unterschiede. Die mittleren *in vitro* Aktivitäten der isolierten *Bacillus* spp. wurden mit 36,6% (OP) bzw. 30,4% (KAA) berechnet (s. Tab. A 4.2.2, Anhang). Sie lagen damit auf gleichem (OP) bzw. höherem (KAA) Niveau als die mittleren *in vitro* Aktivitäten dieser Standorte. Die größten physiologischen Unterschiede zwischen den *Bacillus* spp. Stämmen der Standorte OP und KAA zeigten sich für die Verwertung der Kohlenhydrate und dem Wachstum auf HS. Die *Bacillus* Isolate aus KAA waren zu einem geringeren Anteil in der Lage, mit den angebotenen Kohlenhydraten oder den HS zu wachsen, als die *Bacillus* Isolate aus OP (Tab. A 4.2.2, Anhang) Die physiologischen Einschränkungen bezüglich der KH-Verwertung im Vergleich zu den OP-Isolaten wurde auch für die weiteren isolierten MO beobachtet und scheint durch den Versuchsaufbau bedingt. Im Gegensatz zu einem natürlichen GW-Leiter war hier ein kontinuierlicher Zustrom von Nährstoffen nicht gegeben. Durch den beschränkten bioverfügbaren Kohlenstoff-Anteil und die mikrobielle Verwertung dieser Teile der HS, wurde der Grad an Oligotrophie in den Reaktoren, trotz hohem DOC in Reaktor H, in Laufe der Inkubation zunehmend größer. Eine Anpassungsstrategie an solch ein Milieu scheint in einer geringeren Fähigkeit KH zu verwerten zu liegen.

4.2.3 Chemotaxonomische Charakterisierung

Die Bestimmung der Fettsäuremuster wurde als weiterer, chemotaxonomischer Parameter zur Diversitätsbestimmung herangezogen. Es wurden hierfür die Standorte HAA und KAA ausgewählt. Aus den Isolaten KAA konnten im Durchschnitt eine qualitativ und quantitativ höhere Anzahl an Fettsäuren extrahiert werden als aus den Isolaten HAA. Diese Unterschiede beruhen maßgeblich auf einer höheren Anzahl an Anteiso- und Hydroxyfettsäuren in den Isolaten KAA. Die Gemeinschaft KAA zeigte bei der Clusterung der Daten eine höhere Diversität als die Gemeinschaft HAA (s. Tab. A 3.3.7, Anhang). Steigende Anteile von Anteiso-fettsäuren bei Wachstum auf nährstoffreichem Agar konnte Koopmann (1996) in ihrer Arbeit nachweisen. Weiterhin zeigte sie, dass mit zunehmender Inkubationstemperatur die Anteile an Anteiso- und Hydroxyfettsäuren abnahmen. Durch die Variation dieser Fettsäureanteile sind die MO in der Lage die Fluidität der Membran zu regulieren und damit gegebenen Milieuveränderungen anzupassen. Visser (1985b) beschreibt in seiner Arbeit oberflächenaktive Wirkungen von HS auf die Zellmembranen von MO. Koopmann (1996) berichtet über starke Änderungen in den Fettsäuremustern als Reaktion der MO auf erhöhte Frachten von organischen Lösungsmitteln in einer Abluftreinigungsanlage. Ein Anstieg von gesättigten, Hydroxy- und Anteisofettsäuren konnte in den hier isolierten MO des Reaktor H nicht beobachtet werden. Diese Anteile lagen in den Isolaten aus Reaktor K höher als in den Isolaten

aus Reaktor H. Dies legt den Schluss nahe, dass die eingesetzten HS eine oberflächenaktive Wirkung, wie bei Visser (1985b) beschrieben, trotz hoher Konzentrationen in Reaktor H, nicht aufwiesen.

Hydroxyfettsäuren gelten als charakteristisch für obligat und fakultativ anaerobe MO (Smith et al., 1985). In der vorliegenden Untersuchung konnten sie allerdings auch in strikt aeroben MO wie der Gattung *Caulobacter* spp. gefunden werden. Die Clusterung der Ergebnisse der Fettsäureanalytik zeigte nur geringe Übereinstimmung mit den Clusterungen der morphologischen und physiologischen Daten. So sind die als *Bacillus* spp. identifizierten Isolate aus KAA über den gesamten Stammbaum verteilt und fallen in unterschiedliche Cluster. Auch unter Berücksichtigung der geringeren Datenmenge sind die qualitativen und quantitativen Variationen in der Gruppe der hier isolierten *Bacillus* Stämme zu groß um eine zuverlässige Aussage bezüglich der Diversität treffen zu können (s. Abb. A 4.2.3, Anhang). Als konstante, in allen *Bacillus* Isolaten vorkommende Fettsäureklassen konnten die gesättigten, Iso- und Anteiso-fettsäuren detektiert werden. Die größten Anteile verteilten sich auf die Klassen der gesättigten und ungesättigten Fettsäuren. Im Gegensatz dazu bestimmte Kaneda (1977) in der Gattung *Bacillus* Iso- und Anteiso-fettsäuren als dominante Fettsäuregruppen. Die Zusammensetzung der Fettsäuremuster ist allerdings stark von Anzuchttemperatur, Wachstumsphase und Nährmedium abhängig, sodass ein direkter Vergleich mit den Daten anderer Untersuchungen nur unter Vorbehalt durchzuführen ist.

4.2.4. Molekularbiologische Methoden

4.2.4.1 DGGE der PCR-Produkte

Die DGGE-Muster der PCR-Produkte wiesen ein unterschiedliches Laufverhalten für die beiden Standorte HAA und KAA auf. Nach der Zuordnung der identifizierten Organismen stellte sich heraus, dass ein direkter Vergleich der Gele, trotz gleicher Bedingungen, hier nicht möglich war. Amplifikate von Isolaten, die dem selben Stamm zugeordnet werden konnten, waren in unterschiedlichen Gelläufen verschieden weit von dem als Standard mitlaufenden Fragment entfernt. Innerhalb eines Gels traten diese Differenzen nicht auf, sodass ein Vergleich immer nur innerhalb eines Gels möglich ist. Die Amplifikate der *Bacillus* Isolate aus Reaktor K lagen innerhalb eines Gels auf gleicher Höhe, im Vergleich zwischen zwei Gelen betrug die Differenz jedoch bis zu 8mm. Gleiches konnte für die Amplifikate der als *Caulobacter subvibrioides* identifizierten Isolate gezeigt werden. Eschweiler (1999) beschreibt in seiner Arbeit die gleichen methodischen Schwierigkeiten der DGGE-Auftrennung. Eine klare

Trennung der Amplifikate innerhalb eines Gels konnte für die mittels Sequenzanalyse identifizierten Organismen *Caulobacter subvibrioides*, *C. fusiformis* und *C. henricii* gezeigt werden. Damit ermöglichte die DGGE innerhalb eines Gels die Trennung von Arten sich phylogenetisch nahe stehender Stämme. Werden PCR-Produkte mit gleichem Laufverhalten innerhalb eines Gels (HAA 16, 18, 19) mit den in Abb. 3.3.7a und b dargestellten, auf morphologischen und physiologischen Eigenschaften basierenden, Dendrogrammen verglichen, liegen diese in verschiedenen Clustern. Die unter Punkt 3.3.7 gemachten Zuordnungen sind also immer unter der Prämisse der erhobenen Daten zu betrachten, und spiegeln im Vergleich mit der DGGE Auftrennung die Unschärfen der jeweiligen Methoden wider.

Im Gegensatz zur Differenzierung von Reinkulturen erweist sich die DGGE bei der Trennung von Umweltproben als sinnvolles Werkzeug zur Beschreibung der Diversität. Einen umfassenden Überblick hierzu gibt Muyzer (1999) in seinem Review Artikel. Nübel et al. (1999) führen darüber hinaus auch eine Quantifizierung des untersuchten Biotops durch. In der vorliegenden Arbeit wurden nach 24 Monaten Inkubation Gesamtaufschlüsse mit der DGGE aufgetrennt. Mit dieser Methode konnte im Reaktor H zu diesem Zeitpunkt eine höhere Diversität als im Reaktor K aufgezeigt werden. Die aquatischen Phasen beider Reaktoren charakterisierten sich durch eine dominante Bande, die sich in abgeschwächter Form auch im Aufwuchs wiederfand. Die Sequenzanalyse dieser Banden zeigte eine Ähnlichkeit der PCR-Produkte von 0,792 zur *Sphingomonas subarctica* str. KF1 für das Amplifikat aus Reaktor H, und 0,964 zu *Aquabacterium commune* str. B8 für das Amplifikat aus Reaktor K. Die geringe Ähnlichkeit des PCR-Produkts aus Reaktor H zu dem angegebenen Stamm weist auf einen noch nicht in der RDP-Datenbank beschriebenen Stamm hin. Inwieweit die Stärke dieser Banden die tatsächliche Dominanz dieser Stämme in dem untersuchten Milieu darstellt oder durch einen PCR-Bias (Reysenbach et al., 1992; Suzuki und Giovannoni, 1996) verursacht wurde, lässt sich nicht abschließend klären. Hier sei auf den Review Artikel von Wintzingerode et al. (1997) verwiesen. Sie beschreiben umfassend die Fehlermöglichkeiten der PCR von ribosomalen Genen.

4.2.4.2 Sequenzanalyse der PCR-Produkte

Durch die Sequenzanalyse einiger, ausgewählter PCR-Produkte konnten diese Isolate mit einer mehr oder minder großen Sicherheit bereits bekannten Stämmen zugeordnet werden. Alle identifizierten Stämme stellen typische GW-Besiedler dar, wobei über die Gattung *Bacillus* im GW nur in wenigen Veröffentlichungen berichtet wird (Bonde, 1985; Buchanan-Mappin et al., 1986; Chapelle, 1993). Sie werden im allgemeinen als typische ubiquitäre Bodenbesiedler

beschrieben. Die Gattung der *Caulobacter* gehört zu den klassischen weltweit in (oligotrophen) Gewässern aufgefundenen Bakterienarten. Sie sind gut an nährstoffarme Bedingungen angepasst und machen einen, in zwei unterschiedliche Geschwister-Zelltypen getrennten, Vermehrungszyklus durch (Poindexter, 1992). Eine der Formen ist unbeweglich und durch einen adhesiven zylindrischen Stiel (Prostheka) an Oberflächen gebunden. Diese Prostheka setzt sich aus der äußeren Zellumhüllung, der Peptidoglycanschicht und der Zellmembran zusammen. Die zweite Form ist polar begeißelt und zeigt eine geringere Wachstumsaktivität als die sessile Form. Die begeißelte Form setzt sich zur Reproduktion mit der Geißel auf feste Oberflächen und die Geißel wächst zum Stiel aus. Die Zellteilung verläuft normal, die Tochterzelle ist wieder eine begeißelte Form (Schlegel, 1992; Poindexter, 1992). Durch die Fähigkeit sowohl in mobiler als auch sessiler Form vorzuliegen, ergeben sich klare Vorteile zur Besiedlung und Ausbreitung in Habitaten mit limitierenden Bedingungen. Nach neueren Untersuchungen zur phylogenetischen Taxonomie werden einige, bisher aufgrund ihrer morphologischen Charakteristika der Gattung *Caulobacter* zugeordneten Arten, jetzt der Gattung *Brevundimonas* zugeordnet (Abraham et al., 1999).

Die Bestimmung der Diversität von isolierten Reinkulturen mittels 16S rDNA-PCR, DGGE-Auftrennung der Amplifikate und Sequenzanalyse ist unter dem Vorbehalt eines unvermeidlichen Kultivierungs-Bias zu betrachten. Die Isolierung von MO auf Festmedien führt immer zu einer Selektion innerhalb der MO-Gemeinschaft. Es treten qualitative Verschiebungen in der Abundanz bestimmter Arten der untersuchten Gemeinschaft auf. Hieraus lassen sich z. B. die in der vorliegenden Arbeit auftretenden Unterschiede zwischen den isolierten Stämmen und den REM-Bildern nach 6 Monaten Inkubation erklären. Die Isolate waren durch die Gattungen *Caulobacter* und *Pseudomonas* dominiert. In den REM-Bildern waren *Caulobacter* nur sehr selten wiederzufinden, als dominante Arten traten dagegen, über den gesamten Versuchszeitraum, *Actinomyces* auf, die sich unter den Isolaten nur einen Anteil von 0,3% hatten. Verschiebungen im Artenspektrum konnten Smalla et al. (1997) bei ihren vergleichenden Untersuchungen zwischen den Abundanzen von MO im Biolog GN System, und der als Inokulum verwendeten Gemeinschaften, mittels 16S rRNA-PCR und anschließender DGGE / TGGE Auftrennung der PCR-Produkte, ermitteln. Sie fanden im Unterschied zu dem verwendeten Inokulum in den nährstoffreichen Biolog-wells eine Verminderung der Artenanzahl, sowie die Dominanz von Arten der γ Untergruppe der Proteobakterien.

Kalmbach et al. (1997, 1999) wiesen, in ihren Untersuchungen zur mikrobiellen Besiedlung des Berliner Trinkwassernetzes, die Unzulänglichkeiten der Diversitätsbeschreibung eines Standortes mit Hilfe der Isolierung von MO mit standardisierten Kulturmedien, nach. Die höchste Abundanz konnten sie in ihren Proben, mittels *in situ* Hybridisierung mit artspezifischen Sonden, drei Stämmen der β - Proteobakterien zuordnen. Diese Stämme waren auf dem Kulturmedium R2A Agar jedoch unterrepräsentiert, hier fand sich ein erhöhter Anteil an Arten der α und γ Gruppen, die auf diesem Medium bevorzugt wachsen konnten. In DVC-(direct viable counts) Tests erbrachten sie den Nachweis, dass sich 65% der Bakterien des untersuchten Biofilms in einem VBNC-(viable but nonculturable) Stadium befanden, bzw. keine elongierten Zellen in diesen Untersuchungen bildeten. Daraus erklären sich die Unterschiede zwischen der realen Abundanz, ermittelt durch *in situ* Hybridisation, und der auf Isolationsmedien beobachteten Diversität. Der von Kalmbach et al. (1999) isolierte Stamm B8 wird von ihnen, aufgrund physiologischer, morphologischer und taxonomischer Kriterien, der neuen Gattung *Aquabacterium*, Stamm *A. commune* zugeordnet. In der vorliegenden Arbeit konnte in einer DGGE Auftrennung eines Gesamtaufschlusses aus Reaktor K nach 24 Monaten Inkubation, das 16S rDNA-Fragment dieses Stammes als dominante Bande im Aufwuchs und in der aquatischen Phase wiedergefunden werden (s. Abb. 3.5.2b). Hieraus ergibt sich die Frage, ob die vorgefundene Dominanz von MO der α Gruppe (*Caulobacter*, *Brevundimonas*) der tatsächlichen Verbreitung in dem Versuchsaufbau entsprach, oder ob sie hier ebenfalls auf eine starke Selektion dieser Gruppe durch das Isolationsmedium zurückzuführen war.

Durch den Einsatz molekularbiologischer Methoden, als wirkungsvolles Werkzeug zur Identifizierung von MO, zeigten sich neue Verwandtschaftsverhältnisse zwischen bisher getrennten Gattungen auf (Abraham et al. 1999; Nohynek et al., 1996; Segers et al., 1994). Die bisherigen Einteilungen von MO in Arten und Gattung, die auf morphologischen und physiologischen Charakteristika aufbauten, sollten durch den Einsatz dieser Techniken (z.B. 16S und 23S rRNA Sequenz, DGGE/TGGE) neu überprüft werden (Abraham et al., 1999; Muyzer, 1999; Wintzingerode et al., 1997). Auch zur Beschreibung von Diversitäten und Besiedlungsstrukturen können moderne Techniken, wie z.B. *in situ* Hybridisierung und Confocale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM), einen besseren Einblick in die Strukturen mikrobieller Habitate geben, als dies allein mit den klassischen mikrobiologischen Methoden möglich ist (Kalmbach et al., 1997 und 1999; Stewart et al., 1995).

4.2.5 Rasterelektronenmikroskopie

Die Oberfläche der verwendeten Glaskugeln entspricht ca. 113 mm². Ausgehend von einer durchschnittlichen MO Größe von 3*0,5 µm und einem KBE Wert von max log 5,7 /cm² in der Anlage, würden nur etwa 0,66% der Oberfläche von MO bedeckt sein. Entsprechend schwer gestaltete sich das Auffinden von MO auf den Glaskugeln, zumal mit dem REM nur die auf der Biofilmoberfläche aufliegenden Organismen sichtbar werden. Die Ausbildung eines Biofilms findet nach Meyer-Reil (1996) innerhalb weniger Stunden statt. Selbst in oligotrophen Biotopen wie einer Trinkwasserleitung fanden Kalmbach et al. (1997) innerhalb von 14 Tagen einen Biofilm auf eingebrachten Robbins-Devices.

In den REM Aufnahmen und Betrachtungen der Glaskugeln konnten keine markanten Unterschiede in der Struktur des Biofilms und seiner Besiedlung zwischen den Reaktoren gefunden werden. Bemerkenswerterweise zeigten sich jedoch Unterschiede zwischen den im REM beobachteten und den isolierten Organismen. Auf einigen Kugeln waren in großer Anzahl die Mycele von *Actinomyces* zu erkennen, die sich aber nur zweimal unter den Isolaten (HAA 6 und 23) wiederfanden. Als häufige Form wurden fädenbildende Stäbchen gefunden. Auch Vertreter der Gattung *Seliberia* gehörten zu den oft auftretenden Organismen. Die unter den isolierten Gemeinschaften stark vertretenen Caulobacter konnten auf dem Biofilm nur selten beobachtet werden. Diese Unterschiede sind bereits unter 4.2.4.2 als Kultivierungs-Bias beschrieben.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war die Erfassung mikrobieller Besiedlungs- und Diversitätsmuster in einem Grundwasser-Simulationsfilter unter dem Einfluss von Huminstoffen. Zur Simulation eines Grundwasserhabitats wurde ein Labormodell in Form von Festbettreaktoren entwickelt. Diese bestanden aus Glassäulen die mit Glaskugeln, als inerter Oberfläche, und Grundwasser, als Inokulum, befüllt waren. Der Umlauf des Grundwassers betrug 2 l/d, zwei dieser Reaktoren wurden in Betrieb genommen. Ein Reaktor wurde zusätzlich mit Huminstoffe beaufschlagt. Über einen Zeitraum von 2 Jahren wurden die Reaktoren als batch-Ansatz betrieben und beprobt. In monatlichen Abständen wurden physikalisch/chemische Parameter und die Zellzahlen in der aquatischen Phase und des Aufwuchses bestimmt, halbjährlich erfolgte zusätzlich die Isolierung von 240 Reinkulturen, im gesamten Versuchszeitraum wurden 800 Reinkulturen isoliert. Zur Erfassung der Diversität wurden hiervon halbjährlich 180 Isolate (Gesamt 601) auf ihre Kolonie- und Zellmorphologie sowie ihre Stoffwechselphysiologie hin untersucht. Die Beschreibung der mikrobiellen Diversität wurde, an ausgewählten Isolaten, durch chemotaxonomische und molekularbiologische Methoden erweitert. Die mikrobiell bedingten Veränderungen an den Huminstoffen wurden durch Messungen des LC-DOC, mittels Säurehydrolyse und Pyrolyse-Feldionisation-Massenspektrometrie aufgezeigt. Die Fähigkeit der Mikroorganismen die Huminstoffe zu verwerten, wurde in Wachstumstests und BDOC Untersuchungen ermittelt.

Nach einer kurzen Adaptationsphase hatte sich das Versuchssystem in Hinblick auf die physikalisch/chemischen Parameter und die Zellzahlen stabilisiert und wies über den gesamten Beprobungszeitraum nur geringe Schwankungen auf.

An den Huminstoffen konnten im Laufe der Inkubation deutliche Veränderungen aufgezeigt werden. Aufgrund der komplexen Struktur der Huminstoffe und der unterschiedlich radikalen Zerlegung der Moleküle in Bruchstücke, lieferten die verwendeten Untersuchungsmethoden dabei Ergebnisse, die in einigen Fällen nicht interpretierbar waren. Es konnte aber eindeutig nachgewiesen werden, dass der Anteil an assoziierten Kohlenhydraten im Laufe der Inkubation zunahm und der Anteil lipophiler Bestandteile an der Huminstoff-Matrix abnahm. Anhand der höheren Zellzahlen in dem mit Huminstoffen beaufschlagten Reaktor und den Wachstumsversuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl die Mikroorganismen-Gemeinschaften der Reaktoren, als auch ein großer Teil der isolierten Reinkulturen die Huminstoffe als alleinige Kohlenstoff- und Energiequelle nutzen konnten. Dennoch stellen die verwendeten Huminstoffe

kein leicht verwertbares Wachstumssubstrat dar. Eine vollständige Mineralisierung durch die Mikroorganismen konnte in dem Versuchszeitraum nicht nachgewiesen werden.

Im Verlauf der Inkubation kam es in beiden Reaktoren zu Veränderungen innerhalb der mikrobiellen Besiedlung. Die im Grundwasser dominanten gram positiven Isolate konnten nach einem halben Jahr Inkubation nur noch in verminderter Anzahl nachgewiesen werden. Eine Verringerung der physiologischen Leistungen wurde anhand niedrigerer *in vitro* Aktivitäten der Gemeinschaften und veränderter Substratverwertungsspektren der Isolate dargestellt. Besonders deutlich zeigte sich diese Verringerung bei der Fähigkeit der Isolate Mono-, Di- und Trisaccharide zu verwerten, sowie bei den getesteten enzymatischen Reaktionen.

Die Ergebnisse der morphologischen und physiologischen Untersuchungen zeigten weiterhin, dass sich in den beiden Reaktoren, bei gleichem Inokulum, unterschiedliche Gemeinschaften etablierten. Unter dem Einfluss der Huminstoffe kam es zu einer stärkeren Verarmung innerhalb der bakteriellen Gemeinschaften, die sich durch die Änderungen der morphologischen, physiologischen und chemotaxonomischen Charakteristika darstellte. Fünf der sechs isolierten Gemeinschaften des Reaktors ohne Huminstoffe verfügten über eine größere physiologische Aktivität und Diversität, als die entsprechenden Gemeinschaften des Reaktors mit Huminstoff-Zusatz.

Am Beispiel der Isolate, die der Gattung *Bacillus* zugeordnet wurden, konnten die physiologischen Änderungen in dem Versuchsaufbau bestätigt werden. Innerhalb eines Reaktors wurden für die Gemeinschaften der aquatischen Phase höhere Aktivitäten errechnet als für die Gemeinschaften des Aufwuchs, was im Widerspruch zu den meisten Untersuchungen an Bakterien aus natürlichen Grundwassersedimenten steht.

Die hier eingesetzte DGGE-Auftrennung von 16S rDNA-PCR-Produkten, als molekularbiologische Methode zur Diversitätsbeschreibung, reichte bei den isolierten Reinkulturen, nicht für eine eindeutige Differenzierung. Als sinnvoll erwies sich dieses Verfahren bei der Auftrennung von Gesamtaufschlüssen. Aufgrund der Bandenmuster wurde gezeigt, dass sich die Gemeinschaften, nach 24 Monaten Inkubation, aus lediglich vier bis sieben Spezies je Standort zusammensetzten. Die Artzugehörigkeit einiger Isolate ließ sich mittels Sequenzanalyse aufklären. Als häufigste Vertreter unter den Isolaten fand sich die Gattung *Caulobacter*, die als typische Besiedler von Grundwässern und oligotrophen Habitaten gelten.

Mit rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen konnte der Biofilm, der sich auf den Glaskugeln innerhalb von drei Monaten ausgebildet hatte sowie seine mikrobielle Besiedlung dokumentiert werden. Die Darstellung des Biofilms und der Mikroorganismen war hierbei stark von der angewandten Präparationsmethode abhängig.

Die hier durchgeführten Untersuchungen und Ergebnisse stellen nur einen Ausschnitt der tatsächlich in dem beprobten Biotop vorherrschenden Verhältnisse dar. Die Ergebnisse der einzelnen Methoden scheinen sich in manchen Fällen zu widersprechen. Es muss aber berücksichtigt werden, dass jede Methode auf ein anderes Ziel fokussiert und gewissen Unzulänglichkeiten, wie z. B. Kultivierungs- oder PCR-Bias unterliegen kann.

6. Literaturverzeichnis

- Abbt-Braun, G.: Untersuchungen zur Struktur isolierter Huminstoffe. Dissertation an der Fakultät für Chemie, Biologie und Geowissenschaften der TU München. (1987).
- Abraham, W.-R.; Strömpel, C.; Meyer, H.; Lindhorst, S.; Moore, E.R.B.; Christ, R.; Vancanneyt, M. Tindall, B.J.; Bennisar, A.; Smit, J.; Tesar, M.: Phylogeny and polyphasic taxonomy of *Caulobacter* species. Proposal of *Maricaulis* gen. nov. with *Maricaulis maris* (Poindexter) comb. nov. as the type species, and emended description of the genera *Brevundimonas* and *Caulobacter*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 1053-1073. (1999).
- Aiken, G.R.: Isolation and Concentration Techniques for Aquatic Humic Substances. In: Aiken, G.R. et al. (edt.): *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. Verlag John Wiley & Sons New York, 363-385. (1985).
- Aiken, G.R.: A Critical Evaluation of the Use of Macroporous Resins for the Isolation of Aquatic Humic Substances. In: Frimmel, F.H.; Christman, R.F. (eds.): *Humic Substances and Their Role in the Environment*. John Wiley & Sons Limited, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore, 15-28. (1988).
- Bianchi, M.A.G.; Bianchi, A.J.M.: Statistical Sampling of Bacterial Strains and Its Use in Bacterial Diversity Measurements. *Microb. Ecol.*, 8: 61-69. (1982).
- Bligh, E.G.; Dyer, W.J.: A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.*, 37: 911-917. (1959).
- Bobbie, R.J.; White, D.C.: Characterisation of benthic microbial community structure by highresolution gas chromatography of fatty acid methyl esters. *Appl. Environ. Microbiol.*, 39: 1212-1222. (1980).
- Bonde, G.J.: Bacteriological Characteristics of Ground Water Resources. *Aqua*, 1: 21-26. (1985).
- Brosius, J.; Dull, T.J.; Sleeter, D.D.; Noller, H.F.: Gene organisation and primary structure of a ribosomal RNA operon from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.*, 148: 107-127. (1981).
- Buchanan, R.E.; Gibbons, N.E. (edts.): *Bergey's manual of determinative Bacteriology*. Williams & Wilkens Co., Baltimore. 8th ed. (1974).
- Buchanan-Mappin, J.M.; Wallis, P.M.; Buchanan, A.G.: Enumeration and Identification of Heterotrophic Bacteria in Groundwater and in a Mountain Stream. *Can. J. Microbiol.*, 32: 93-98. (1986).
- Chapelle, F.H.: *Ground-Water Microbiology and Geochemistry*. John Wiley & Sons, Inc. New York, Chichester, Brisbane, Toronto, Singapore. (1993).
- Deutsches Institut für Normung e.V.: DIN 4049. Berlin.
- Dott, W.; Thofern, E.: Qualitative und quantitative Bestimmungen von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen, 2. Mitteilung: Anwendung miniaturisierter Systeme zur Identifizierung

- und Biotypisierung von Bakterien unter Verwendung der Vielpunktbeimpfungsmethode. Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B, 170: 99-107. (1980).
- Dott, W.; Trampisch, H.J.: Qualitative und Quantitative Bestimmung von Bakterienpopulationen aus aquatischen Biotopen. 5. Mitteilung: Vergleichende Untersuchungen an zwei Schnell-sandfiltern. Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 177: 141-155. (1983).
 - Eschweiler, B.: Charakterisierung der mikrobiellen Besiedlung von Grundwässern unterschiedlicher Beschaffenheit mittels molekularbiologischer Methoden. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen. (1999).
 - Fredrickson, H.L.; Cappenberg, T.E.; De Leeuw, J.W.: Polar lipidester-linked fatty acid composition of Lake Vechten seston: an ecological application of lipid analysis. FEMS Microbiol. Ecol., 38: 381-396. (1986).
 - Frimmel, F.H.; Sattler, D.: Komplexchemische Charakterisierung isolierter Gewässerhuminstoffe nach Gelchromatographischer Fraktionierung. Fresenius Anal. Chem., 315: 335-350. (1983).
 - Garland, C.D.; Lee, A.; Dickson, M.R.: The preservation of surface-associated microorganism prepared for scanning electron microscopy. J. Microsc., 116: 227-242. (1979).
 - Gliesche, C.G.: Mikrobielle Ökologie im Grundwasserbereich. In: Bodo Weigert (Hrsg.): Mikrobiologie des Grund- und Trinkwassers. Papyrus Druck Berlin. 21-34. (1995).
 - Griebe, T.; Schaule, G.; Secker, J.; Flemming, H.-C.: Bestimmung der stoffwechselaktiven Bakterien im Belebtschlamm. In: Lemmer, H.; Griebe, T.; Flemming, H.-C. (Hrsg.): Ökologie der Abwasserorganismen. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 155-168. (1996).
 - Griffiths, A.J.; Lovitt, R.: Use of Numerical Profiles for Studying Bacterial Diversity. Microb. Ecol., 6: 35-43. (1980).
 - Gültekin, R.A.: Mikrobiologie der Grundwasseranreicherung über Modell-Langsandsandfilter. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen. (1997).
 - Gumprecht, R.: Mikrobielle Aktivitäten in Tiefenprofilen von Sedimenten des Südatlantik. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen. (1995).
 - Haack, S.K.; Garchow, H.; Odelson, D.A.; Forney, L.J.; Klug, M.J.: Accuracy, reproducibility, and interpretation of fatty acid methyl ester profiles of model bacterial communities. Appl. Environ. Microbiol., 60: 2483-2493. (1990).
 - Hack, A.: Mikrobielle Besiedlung eines sandig-kiesigen pleistozänen Grundwasserleiters im Vergleich mit der organisch-chemischen Matrix. Dissertation an der Fakultät für Biologie an der Ruhr-Universität Bochum. (1988).
 - Hack, A.; Selenka, F.: Isolation of humic and adherent organic substances in preparative scale from groundwater and surface water under field conditions by means of a mobile adsorption device. JWSRT-Aqua Vol., 38: 369-375. (1989).
 - Hedges, J.I.: Polymerization of Humic Substances in Natural Environments. In: Frimmel, F.H.;

- Christman, R.F. (eds.): Humic Substances and Their Role in the Environment. John Wiley & Sons Limited, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. 45-58. (1988).
- Hesse, S.; Frimmel, F.H.: Biochemical Characterization of Refractory Organic Substances. *Acta hydrochim. hydrobiol.*, 27: 94-97. (1999).
- Hewlett Packard: HP 5898A: Microbial Identification System (MIS). Publication No. 43-5953-1825. (1985)
- Hirsch, P.: Microbiology, Introduction. In: Matthes, G. et al. (edt.): Progress in Hydrogeochemistry. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 308-311. (1992).
- Hirsch, P.; Rades-Rohkohl, E.: The Natural Microflora of the Segeberger Forst Aquifer System. In: Matthes, G. et al. (edt.): Progress in Hydrogeochemistry. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 390-412. (1992).
- Hirsch, P.; Rades-Rohkohl, E.; Kölbel-Boelke, J.; Nehr Korn, A.: Morphological and Taxonomic Diversity of Ground Water Microorganisms. In: Matthes, G. et al. (edt.): Progress in Hydrogeochemistry. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 311-325. (1992).
- Hobbie, J.E.; Daley, R.J.; Jasper, S.: Use of nucleopore filters of counting bacteria by fluoreszenz microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.*, 33 (5): 1225-1228. (1977).
- Huber, S. H.; Frimmel, F. H.: Gelchromatographie mit Kohlenstoffdetektion (LC-ODC): Ein rasches und aussagekräftiges Verfahren zur Charakterisierung hydrophiler organischer Wasserinhaltsstoffe. *Vom Wasser*, 86: 277-290. (1996).
- Huffmann, Jr., E.W.D.; Stuber, H.A.: Analytical Methodology for Element Analysis of Humic Substances. In: Aiken, G.R. et al. (edt.): Humic Substances in Soil, Sediment and Water. Verlag John Wiley & Sons New York. 433-454. (1985).
- Jahnel, J.B.; Schmiedel, U.; Abbt-Braun, G.; Frimmel, F.H.: Anwendung einer enzymatischen Methode zur Charakterisierung von Huminstoffen. *Acta hydrochim. hydrobiol.* 21: 43-50. (1993).
- Kästner, M.; Mahro, B.; Wienberg, R.: Biologischer Schadstoffabbau in kontaminierten Böden. *Hamburger Berichte 5*. Economica Verlag. (1993).
- Kalmbach, S. Manz, W.; Szewzyk, U.: Isolation of New bacterial Species from Drinking Water Biofilms and Proof of Their In Situ Dominance with High Specific 16S rRNA Probes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 63: 4164-4170. (1997).
- Kalmbach, S. Manz, W.; Wecke, J.; Szewzyk, U.: *Aquabacterium* gen. nov., with description of *Aquabacterium citratiphilum* sp. nov., *Aquabacterium parvum* sp. nov. and *Aquabacterium commune* sp. nov., three *in situ* dominant bacterial species from the Berlin drinking water system. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 49: 769-777. (1999).
- Kanedea, T.: Fatty Acids on the Genus Bacillus: an Example of Branched-Chain Preference. *Bacteriol. Rev.*, 41: 391-418. (1977).

- Kjelleberg, S.: Starvation in Bacteria. Plenum Press, New York and London. (1993).
- Kölbel-Boelke, J.: Diversität und *In vitro*-Aktivitäten heterotropher Bakteriengemeinschaften in einem pleistozänen, sandig-kiesigen Grundwasserleiter. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen. (1987).
- Kölbel-Boelke, J.; Anders, E.M.; Nehr Korn, A.: Microbial Communities in the Saturated Groundwater Environment II: Diversity of Bacterial Communities in a Pleistocene sand Aquifer and their *In Vitro* Activities. *Microb. Ecol.*, 16: 31-48. (1987).
- Kölbel-Boelke, J.; Nehr Korn, A.: Heterotrophic Bacterial Communities in the Bocholt Aquifer System. In: Matthess, G. et al. (edt.): *Progress in Hydrogeochemistry*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 378-390. (1992).
- Kogure, K.; Simidu, U.; Taga, N.: A tentative direct microscopic method for counting living marine bacteria. *Can. J. Microbiol.*, 25: 415-420. (1978).
- Koopmann, B.: Fettsäuremuster membrangebundener Phospholipide im mikrobiellen Bewuchs von Tropfkörperanlagen. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen. (1996).
- Krambeck, H.J.; Witzel, K.P.: Classification of aquatic bacterial strains: An example of numerical taxonomy in limnology. *EDV in Medizin und Biologie*, 14: 45-49. (1983).
- Krieg, N.R.; Holt, J.G. (eds.): *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William & Wilkens Baltimore London. Vol. 1-4. (1984).
- Laurent, P.; Prévost, M.; Cigana, J.; Niquette, P.; Servais, P.: Biodegradable Organic Matter Removal in Biological Filters: Evaluation of the Chabrol Model. *Water Res.*, 33: 1387-1398. (1999).
- Maidak, B.L.; Olsen, G.J.; Larsen, N.; Overbeek, R.; McCaughey, M.J.; Woese, C.R.: The RDP (Ribosomal Data Project). *Nucl. Acids Res.*, 25: 109-110. (1997).
- Maidak, B.L.; Cole, J.R.; Parker Jr, C.T.; Garrity, G.M.; Larsen, N.; Li, B.; Lilburn, T.G.; McCaughey, M.J.; Olsen, G.J.; Overbeek, R.; Pramanik, S.; Schmidt, T.M.; Tiedje, J.M.; Woese, C.R.: A new version of the RDP (Ribosomal Data Project). *Nucl. Acids Res.*, 27: 171-173. (1999).
- Malcolm, R.L.: Geochemistry of Stream Fulvic and Humic Substances. In: Aiken, G.R. et al. (edt.): *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. Verlag John Wiley & Sons New York. 181-209. (1985).
- Mantoura, R.F.C.; Riley, J.P.: The analytical concentration of humic substances from natural waters. *Anal. Chim. Acta*, 76: 97-106. (1975).
- Marxen, J.: Investigations into the Number of Respiring Bacteria in Groundwater from Sandy and Gravelly Deposits. *Microb. Ecol.*, 16: 65-72. (1987).
- Matthess, G.: Die Beschaffenheit des Grundwassers. *Lehrbuch der Hydrogeologie Band 2*. Gebrüder Bornträger, Berlin Stuttgart. (1994).

- Matthes, G.; Frimmel, F.H.; Hirsch, P.; Schulz, H.D.; Usdowski, E. (Hrsg.): Progress in Hydrogeochemistry. Springer Verlag, Berlin Heidelberg New York. (1992).
- Meyer-Reil, L.-A.: Ökologie mikrobieller Biofilme. In: Lemmer, H.; Griebe, T.; Flemming, H.-C. (Hrsg.): Ökologie der Abwasserorganismen. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York. 25-42. (1996).
- Müller-Wegener, U.: Interaction of Humic Substances with Biota. In: Frimmel, F.H.; Christman, R.F. (eds.): Humic Substances and Their Role in the Environment. John Wiley & Sons Limited, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. 179-192. (1988).
- Muyzer, G.: DGGE/TGGE a method for identifying genes from natural ecosystems. Current Opinion in Microbiol., 2: 317-322. (1999).
- Muyzer, G.; Teske, A.; Wirsén, C.O.: Phylogenetic relationships of Thiomicrospira species and their identification in deep-sea hydrothermal vent samples by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S rDNA fragments. Arch. Microbiol., 164: 165-172. (1995).
- Nehr Korn, A.: Grundwasserkeimzahlen bei Anwendung nährstoffarmer Substrate. Gesundheits-Ingenieur, 89: 88. (1968).
- Nehr Korn, A.: Bedeutung biologischer Vorgänge im Grundwasser. In: Schriftenreihe des Deutschen Verbandes für Wasserwirtschaft und Kulturbau e.V. (DVWK). Verlag Paul Parey. Heft 78, 129-142. (1986).
- Nohynek, L.J.; Nurmiaho-Lassila, E.L.; Suhonen, E.L.; Busse, H.J.; Mohammadi, M.; Hantula, J.; Rainey, F.; Salkinoja-Salonen, M.S.: Description of chlorphenol-degrading *Pseudomonas* sp. strains KF1T, KF3, and NKF1 as a new species of the genus *Sphingomonas*, *Sphingomonas subarctica* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 46: 1042-1055. (1996).
- Norwood, D.L.: Critical Comparison of Structural Implications from Degradative and non-degradative Approaches. In: Frimmel, F.H.; Christman, R.F. (eds.): Humic Substances and Their Role in the Environment. John Wiley & Sons Limited, Chichester, New York, Brisbane, Toronto, Singapore. 133-148. (1988).
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F.; Kühl, M.; Muyzer, G.: Quantifying microbial diversity: morphotypes, 16S rRNA genes, and carotenoids of oxygenic phototrophs in microbial mats. Appl. Environ. Microbiol., 65: 422-430. (1999).
- Obst, U.; Holzappel-Pschorn, A.: Enzymatische Tests für die Wasseranalytik. Kommissionsverlag R. Oldenbourg, München. (1988).
- Otremba, H.: Wechselwirkungen zwischen Mikroorganismen und Huminsäuren im Grundwasserbereich: Vergleichende Untersuchungen von Bakteriengemeinschaften in Grundwasser mit und ohne Huminsäuren. Dissertation an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn. (1992).

- Plenz, B.: Vergleichende Untersuchungen zum Verhalten von Grundwasserbakterien in Medien mit Huminstoffzusatz. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen. (1994).
- Poindexter, J.S.: Dimorphic Prosthecae Bacteria: The Genera *Caulobacter*, *Asticcacaulis*, *Hyphomicrobium*, *Pedomicrobium*, *Hyphomonas*, and *Thiodendron*. In: Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.-H. (eds.): The Prokaryotes. Second Edition. Springer Verlag New York Berlin Heidelberg. Chpt. 106: 2176-2195. (1992).
- Preuß, G.: Untersuchungen zu mikrobiellen Sukzessionen bei der Infiltration von Oberflächenwasser in den Untergrund. Dissertation im Fachbereich Biologie/Chemie der Universität Bremen. (1991).
- Prévost, M.; Rompré, A.; Coallier, J.; Servais, P.; Laurent, P.; Clément, B.; Lafrance, P.: Suspended Bacterial Biomass and Activity in Full-Scale Drinking Water Distribution Systems: Impact of Water Treatment. *Water Res.*, 32: 1393-1406. (1998).
- Reysenbach, A.-L.; Giver, L.J.; Wickham, G.S.; Pace, N.R.: Differential Amplification of rRNA Genes by Polymerase Chain Reaction. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 3417-3418. (1992).
- Robinson, D.G.; Ehlers, U.; Herken, R.; Hermann, B.; Meyer, F.; Schürman, F.-W.: Präparationsmethoden in der Elektronenmikroskopie. Springer Verlag Berlin. (1985).
- Rodriguez, G.G.; Phipps, D.; Ishiguro, K.; Ridgway, H.F.: Use of a Fluorescent Redox Probe of Direct Visualization of Actively Respiring Bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58: 1801-1808. (1992).
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T.: Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory. Cold Spring Harbor, N.Y. (1989).
- Schlegel, H.G.: Allgemeine Mikrobiologie. G. Thieme Verlag Stuttgart New York. (1992).
- Schulten, H.-R.: Temperature-Programmed / Time-Resolved Pyrolysis Field Ionization Mass Spectrometry - a New Method for the Characterization of Humic Substances. In: Matthes, G. et al. (ed.): Progress in Hydrogeochemistry. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 36-46. (1992).
- Schulten, H.-R.: Analytical pyrolysis and computational chemistry of aquatic humic substances and dissolved organic matter. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, 49: 385-415. (1999).
- Segers, P.; Vancanneyt, M.; Pot, B.; Torck, U.; Hoste, B.; Dewettinck, D.; Falsen, E.; Kersters, K.; De Vos, P.: Classification of *Pseudomonas diminuta* Leifson and Hughes 1954 and *Pseudomonas vesicularis* Busing, Doll, and Freytag 1953 in *Brevundimonas* gen. nov. as *Brevundimonas diminuta* comb. nov. and *Brevundimonas vesicularis* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 499-510. (1994).
- Servais, P.; Anzil, A.; Ventresque, C.: A simple method for the determination of biodegradable dissolved organic carbon in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55: 2732-2734. (1989).

- Slepecky, R.A.; Hemphill, H.E.: The Genus *Bacillus*-Nonmedical. In: Balows, A.; Trüper, H.G.; Dworkin, M.; Harder, W.; Schleifer, K.-H. (eds.): *The Prokaryotes*. Second Edition. Springer Verlag New York Berlin Heidelberg. Chpt. 76: 1663-1691. (1992).
- Smalla, K.; Wachtendorf, U.; Heuer, H.; Liu, W.-T.; Forney, L.: Analysis of BIOLOG GN Substrate Utilization Patterns by Microbial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 1220-1225. (1997).
- Smith, G.A.; Nickels, J.S.; Davis, J.D.; Findlay, R.H.; Vashio, P.S.; Wilson, J.D.; White, D.C.: Indices Identifying Subsurface Microbial Communities that are Adapted to Organic Pollution. In: Durham, N.N.; Redelfs, A.E. (eds.): *Second International Conference on Groundwater Quality Research*. Oklahoma State University Printing Service. Stillwater. (1985).
- Smith, G.A.; Nichols, P.D.; White, D.C.: Fatty acid Composition and microbial activity of benthic marine sediment from McMurdo Sound, Antarctica. *FEMS Microbiol Ecol.*, 38: 219-231. (1986).
- Sneath, P.A.H.; Sokal, R.R.: *Numerical taxonomy*. W.H.Freeman, London (1973).
- Stevenson, F.J.: Geochemistry of Soil Humic Substances. In: Aiken, G.R. et al. (ed.): *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. Verlag John Wiley & Sons New York. 13-52. (1985).
- Stewart, P.S.; Murga, R.; Srinivasan, R.; deBeer, D.: Biofilm Structural Heterogeneity Visualized by three Microscopic Methods. *Water Res.*, 29: 2006-2009. (1995).
- Sutton, N.A.; Hughes, N.; Handley, P.S.: A comparison of conventional SEM techniques, low temperature SEM and the elctroscan wet scanning electron microscope to study the structure of a biofilm of *Streptococcus crista* CR3. *J. Appl. Bacteriol.*, 76: 448-454. (1994).
- Suzuki, M.T.; Giovannoni, S.J.: Bias caused by Template Annealing in the Amplification of Mixtures of 16S rRNA Genes by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*, 62: 625-630. (1996).
- Thurmann, E.M.: Humic Substances in Groundwater. In: Aiken, G.R. et al. (ed.): *Humic Substances in Soil, Sediment and Water*. Verlag John Wiley & Sons New York. 87-103. (1985).
- Tuschewitzki, G.-J.; Langer, B.; Otremba, H.: Interaction between Humic Substances and Microorganisms. In: Matthes, G. et al. (ed.): *Progress in Hydrogeochemistry*. Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York. 358-365. (1992).
- Visser, S.A.: Effect of Humic Acids on Numbers and Activities of Microorganisms within Physiological Groups. *Org. Geochem.*, 8: 81-85. (1985a).
- Visser, S.A.: Physiological Action of Humic Substances on microbial Cells. *Soil. Biol. Biochem.* 17: 457-462. (1985b).
- Volk, C.; Roche, P.; Joret, J.-C.; Paillard, H.: Comparison of the Effect of Ozone, Ozone-Hydrogen Peroxide System and Catalytic Ozone on the Biodegradable Organic Matter of a Fulvic Acid Solution. *Water Res.*, 31: 650-656. (1997).

- White, D.C.: Quantitative physicochemical characterization of bacterial habitats. In: Poindexter, J.S.; Leadbetter, E.R. (eds.): *Bacteria in nature Vol. 2: Methods and special applications in bacterial ecology*. Plenum Press, New York. (1986).
- Wintzingerode, F.v.; Göbel, U.B.; Stackebrandt, E.: Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, 21: 213-229. (1997).
- Wolters, N.; Schwartz, W.: Untersuchungen über Vorkommen und Verhalten von Mikroorganismen in reinen Grundwässern. *Arch. F. Hydrobiologie*. 51: 500-541. (1956).
- Ziechmann, W.: *Huminstoffe – Probleme, Methoden, Ergebnisse*. Verlag Chemie, Weinheim-Deerfield Beach, Florida-Basel. (1980).
- Zimmermann, R.; Iturriaga, R.; Becker-Birck, J.: Simultaneous determination of the total Number of Aquatic Bacteria and the Number Thereof Involved in Respiration. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36: 926-935. (1978).

7. Anhang

A 2.3.1: P-Agar (nach Nehr Korn, 1968):

Pepton aus Fleisch	1,0g
Glucose	0,1g
K ₂ HPO ₄	0,1g
FeSO ₄ * 7H ₂ O	0,02g
Leitungswasser	1000ml
pH	7,2

Bebrütung: 14 Tage bei Raumtemperatur.

Tab. A 2.3.5: Zell- und Koloniemorphologische Eigenschaften die bei den Isolaten überprüft wurden.

Jedes Kriterium wurde entweder als vorhanden oder nicht vorhanden gewertet (nach Kölbel-Boelke, 1987).

Koloniemorphologie	<u>Konsistenz</u>	Zellmorphologie	<u>Bewegungsfähigkeit</u>
<u>Koloniehabitus</u>	21. weich	<u>Länge</u>	60. Geißelbewegung
1. punktförmig	22. schleimig/klebrig	41. variabel	61. andere Beweg.
2. kreisförmig	23. zäh/lederartig	<u>Längenangabe</u>	<u>Zellgruppierung</u>
3. rhizoid	24. spröde/bröckelig	42. ≤ 0,5 µm	62. einzeln
4. unregelmäßig	<u>Pigmentierung</u>	43. >0,5 - 1,2 µm	63. paarweise
<u>Kolonierand</u>	25. weiß	44. 1,3 - 3,3 µm	64. Ketten ≤ 5 Zellen
5. ganz	26. grau-weiß	45. > 3,3 µm	65. Ketten > 5 Zellen
6. gewellt/gelappt	27. beige	<u>Länge : Breite</u>	66. Klumpen
7. gekerbt	28. gelb	46. ≤ 3 : 1	67. Tetraden
8. gefranst/verästelt	29. rosa	<u>Zellform</u>	68. Scheiden
9. Schwärmersaum	30. rot	47. fädig verzweigt	69. Rosetten
<u>Koloniehöhe</u>	31. orange	48. fädig unverzwt.	70. variabel
10. flach	32. violett	49. gerade	<u>Sporen</u>
11. konvex	33. braun	50. gekrümmt	71. kugelig
12. konkav	34. schwarz	51. coryneform	72. ellipsoid
13. kegelförmig	35. blau	52. spiralig	73. zentral gelegen
<u>Kolonieoberfläche</u>	36. grün	53. kokkoid	74. terminal gel.
14. glatt	<u>Geruch</u>	54. Kokkus	75. Sporang. geschw
15. runzelig	37. erdig (geosmin)	55. variabel	<u>Färbung</u>
16. radiär gefurcht	38. andersartig	<u>Zellende</u>	76. Gramreaktion
17. konzentr. gefur.	39 <u>Luftmycel</u>	56. rund	77. Gramvariabel
<u>Optische Eigensch.</u>	40. <u>Substratmycel</u>	57 spitz	
18. durchsichtig		58. quadratisch	
19. irisierend		59. <u>Stiele/Anhängsel</u>	
20. glänzend			

A. 2.3.6a

Auflistung der verschiedenen C-Quellen, enzymatischen Reaktionen und veränderten physikalischen und chemischen Bedingungen der Medien zur stoffwechselfysiologischen Charakterisierung der Isolate.

1. Monosaccharide

Glucose oxidativ (GLU-O), Glucose fermentativ, (GLU-F), Fructose (FRU), Galactose (GAL), Mannose (MNE), Arabinose (ARA), Xylose (XYL)

2. Disaccharide

Lactose oxidativ (LAC-O), Lactose fermentativ (LAC-F), Maltose (MAL), Saccharose (SAC), Cellobiose (CEL)

3. Trisaccharide

Raffinose (RAF), Melizitose (MEZ)

4. Polysaccharide

Glycogen (GLY), Inulin (INU), Stärke (AMD), Zellulose (ZEL), Xylan (XYA)

5. Zuckeralkohole

Mannit (MAN)

6. Aminierte Kohlenhydrate

N-Acetyl-Glucosamin (NAC)

7. Glycoside

Salicin (SALI)

8. Verwertung von Alkoholen (Unter Säurebildung)

Glycerin (GLE), Ethanol (ETOH)

9. Verwertung organischer Salze als einzige C-Quelle

Citrat (CIT), Glutamat (GLA), Acetat (ACE), Malonat (MLO), Formiat (FOR), Lactat (LAT), Propionat (PRO), Tartrat (NAT), Succinat (SUC), Gluconat (GLO), Oxalat (OXA)

10. Spezifische Enzymreaktionen

Arginindehydrolase (ADH), Ornithindecaboxylase (ODC), Lysindecaboxylase (LDC), Phenylalanindecaminase (PA), Cytochromoxydase (OXI), Katalase (KAT), Urease (URE), Phosphatase (PO₄), Desoxyribonuclease (DNA), Esculinglucosidase (ASC), Hippurat-Hydrolase (HIP), β -Galactosidase (ONPG)

11. Proteolytische Aktivität

Gelatine-Hydrolyse (GEL), Casein-Hydrolyse (CAS)

12. Lipolytische Aktivität

Tween 20 (T20), Tween 40 (T40), Tween 60 (T60), Tween 80 (T80)

14. Bildung von Stoffwechselprodukten

Acetoin-Bildung (Voges-Proskauer, VP), Stabile Säurebildung (Methylrot, MT)

15. Wachstum unter veränderten physikalischen und chemischen Kulturbedingungen15a. Wachstum bei verschiedenen Temperaturen

4°C, 14°C, 20°C, 30°C, 37°C, 45°C, 54°C

15b. Wachstum bei verschiedenen NaCl-Konzentrationen

5,0% NaCl, 7,5% NaCl, 10,0% NaCl

16. Wachstum mit Penicillin (PENC)17. Wachstum mit KCN (KCN)18. Verwertung anorganischer Stickstoffverbindungen

NO₃⁻ - NO₂⁻ (NIT-1), NO₃⁻ - N₂ (NIT-2), NO₂⁻ - N₂ (NIT-3), Kontrollmedium (NIT-K), Stickstofffreies Medium (NFR)

19. Wachstum auf Huminstoff mit Cosubstrat

Huminstoff ohne Cosubstrat (HUS), Huminstoff mit Acetat (HUS-ACE), Huminstoff mit Formiat (HUS-FOR), Huminstoff mit Malonat (HUS-MLO), Huminstoff mit Pyruvat (HUS-PYR), Huminstoff mit Succinat (HUS-SUC)

A 2.3.6b

Berechnung der *in vitro* Aktivitäten (nach Dott und Trampisch, 1983)

Zur Berechnung der Aktivitäten wurden als positives Merkmal eine einfache Mehrheit der drei Parallelansätze der physiologischer Tests 1. - 14., 16. - 19. (A 2.3.6a) gewertet.

Physiologische Gesamtaktivität eines Bakterienstammes:

$$G(i) \% = 100 * P_M(i) / P_M(i) * N_M(i)$$

G(i) % = prozentuale Gesamtaktivität des Isolates (i)

P_M(i) = Anzahl positiver Merkmale des Isolates (i)

N_M(i) = Anzahl negativer Merkmale des Isolates (i)

Tab. A 2.5.1: Zusammensetzung der PCR-Lsg.

Komponente	V / Ansatz	Konz./Ans.
- Primer 907 (100 µM)	0,25 µl	0,5 µM
- Primer GM5 (100 µM)	0,25 µl	0,5 µM
- dNTP-Mix (5 mM)	2 µl	200 µM
- BSA (10 mg / ml)	10 µl	2,0 µg/µl
- PCR-Puffer (10x)	5 µl	1x
- MgCl ₂ (100 mM)	1 µl	2,0 mM
- Zellsuspension	2 µl	
- Wasser	28,5 µl	
- Polymerase (5 U / µl)	<u>1 µl</u>	
Gesamtvolumen	50 µl	

Temperaturprogramm der touch-down PCR:

Hot Start: 96°C, 5 min

1. Cyclus: 80°C, 1 min (Zugabe der Polymerase); 65°C, 1 min; 72°C 1 min

2. Cyclus: 94°C, 1 min; 65°C, 1 min; 72°C, 1 min


3. Cyclus: 94°C, 1 min; 64°C, 1 min; 72°C, 1 min (2*)

4. bis 12. Cyclus: wie 3. Cyclus, Annealingtemp. jeden Cyclus um 1°C gesenkt bis auf 55°C, jeden Cyclus zweimal wiederholen, 55°C 14 mal wiederholen.

13. Cyclus: 94°C 1 min; 55°C, 1 min; 72°C, 10 min

Tab. A 3.1: Datenblatt des verwendeten Grundwassers, die Analysen wurden von den Stadtwerken Bremen durchgeführt.

STROM
GAS
WÄRME
WASSER



- Wasserbeschaffung / Labor -
Bremen, 30.08.1994 Spo/Tre
Werderstraße 101

Wasseranalyse

Betr.: Brunnen 14 (Mittel-, Min- und Max-Werte) entnommen: 1993
Entnahmestelle: Wasserwerk Blumenthal

Sensorische Kenngrößen		Summarische Wirkungs- und Stoffkenngrößen	
Farbe	n. b.	Gesamtrückstand (110 °C) mg/l	263/258/268
Trübung	n. b.	Glührückstand (550 °C) mg/l	172/154/190
Geschmack	n. b.	Basekapaz. bis pH 8,2 mol/m ³	1,54/1,52/1,56
Geruchsschwellenwert	n. b.	Säurekapaz. bis pH 8,2 mol/m ³	0/0/0
		Säurekapaz. bis pH 4,3 mol/m ³	0,77/0,81/0,92
Physikalische und phys.-chem. Kenngrößen		Summe Erdalkalien (Härte) mol/m ³	1,09/1,02/1,16
Wassertemperatur °C	10,4/10,0/10,4	Oxidierbarkeit, Mn VII→II mg/l (als O ₂)	2,1/2,0/2,2
Trübung TE/F	0,82/0,24/1,39	gei. org. Kohlenstoff (C) mg/l (DOC)	3,0/2,7/3,2
Spektr. Abs. Koeff./Hg 254 nm, m ⁻¹	10,6/10,2/10,9	Polyc. arom. Kohlenwst. mg/m ³	n. b.
Spektr. Abs. Koeff./Hg 436 nm, m ⁻¹	0,30/0,26/0,34	ads. organ. geb. Halogen mg/m ³ (AOX)	n. b.
Elektr. Leitfähigkeit bei 25 °C; mS/m	37/35/38	Summe Halogenkohlenwst. mg/m ³	0,6/0,4/0,8
Redoxpotential mV (E _H)	n. b.	Summe Trihalogenmethane mg/m ³	n.n./n.n./n.n.
pH-Wert	6,17/6,13/6,21	Pesticide mg/m ³	n. n.
Schnelltest d. Kalikaggr. pH-Zun./Abn.	n. b.	Oberflächenaktive Stoffe mg/l	n. b.
Chlor, oxidierend, frei (als Cl ₂) mg/l	ungechlor	Kohlenwst., Mineralöle mg/l	<0,1/<0,1/<0,1
Sauerstoff (O ₂) mg/l	0,2/0,1/0,2	Org. Chlorverb. gemäß TrinkwV mg/m ³	0,6/0,4/0,8
Sauerstoffsättigungsindex %	2/1/2		
		Anionen	mg/l
Kationen	mg/l	Carbonat (CO ₃ ²⁻)	0/0/0
Natrium (Na ⁺)	26,7/25,9/27,5	Hydrogencarbonat (HCO ₃ ⁻)	47/37/66
Kalium (K ⁺)	8,2/6,1/10,3	Fluorid (F ⁻)	0,08/0,08/0,08
Magnesium (Mg ²⁺)	7,0/5,7/8,3	Chlorid (Cl ⁻)	40/38/42
Calcium (Ca ²⁺)	32,2/31,5/32,9	Bromid (Br ⁻)	n. b.
Ammonium (NH ₄ ⁺)	0,27/0,26/0,27	Iodid (I ⁻)	n. b.
Aluminium (Al ³⁺)	0,012/0,002/0,021	Sulfat (SO ₄ ²⁻)	71/70/72
		Nitrat (NO ₃ ⁻)	0,4/0,3/0,5
		Nitrit (NO ₂ ⁻)	<0,01/<0,01/<0,01
Schwermetalle und Metalloide	mg/m ³	Phosphat, anorg. ges. (als P)	0,13/0,13/0,13
Eisen, gesamt (Fe)	4335/4300/4370	Borat (als B)	0,11/0,11/0,11
Mangan, gesamt (Mn)	200/190/210	Cyanid (CN ⁻)	<0,01/<0,01/<0,01
Arsen (As)	8,4/7,5/9,3		
Antimon (Sb)	<0,1/<0,1/<0,1	Sonstiges	
Beryllium (Be)	0,1/<0,1/0,2	Kieselsäure, gelöst (als Si)	7,8/7,6/8,0
Blei (Pb)	<1,0/<1,0/<1,0	Trichlorethen mg/m ³	0,13/0,1/0,2
Cadmium (Cd)	<0,1/<0,1/<0,1	Tetrachlormethan mg/m ³	n.n./n.n./n.n.
Chrom (Cr)	<1,0/<1,0/<1,0		
Kupfer (Cu)	<1,0/<1,0/1,0	Mikrobiologische Kenngrößen	
Nickel (Ni)	15,2/15,0/15,4	Koloniezahl in 1 ml	
Quecksilber (Hg)	1,0/<0,1/1,9	(Gelatine, 20 ± 2 °C, 48 h)	0/0/0
Selen (Se)	<0,1/<0,1/<0,1	(Gelatine, 36 ± 1 °C, 48 h)	0/0/0
Silber (Ag)	<0,1/<0,1/<0,1	E.coli und colif. B. in 100 ml	
Zink (Zn)	11,0/1,0/21,0	Flüssigkeitsanreicherung:	
		Lactose-Pepton-Bouillon, 36 ± 1 °C, 48 h	negativ

n. b. = nicht bestimmt
n. n. = nicht nachweisbar

bitte wenden

Tab. A 3.2.6: Anteil der einzelnen, mit Säurehydrolyse detektierbaren, Kohlenhydrate und Aminosäuren in den Reaktorlösungen, in $\mu\text{g C} / \text{mg DOC}$. Angaben für t in Monaten.

Kohlenhydrate, in $\mu\text{g C} / \text{mg DOC}$	Reaktor K t = 0	Reaktor H t = 0	Reaktor H t = 6	Reaktor H t = 12	Reaktor H t = 18	Reaktor H t = 24
Fucose	0,85	0,19	0,0	0,0	0,79	0,0
Rhamnose	0,0	0,26	0,0	0,0	0,08	0,0
Gal.N/Arab.	0,0	0,0	0,0	0,21	0,42	0,0
Gluc.N	0,0	0,02	0,0	0,05	0,0	0,0
Galactose	0,0	0,17	0,0	0,20	0,46	1,28
Glucose	1,51	0,60	1,39	0,95	0,60	1,28
Mannose/Xyl.	0,0	0,63	0,0	0,59	0,72	5,60
Fructose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,09	1,99
Ribose	0,0	0,0	0,0	0,0	0,59	2,20
Summe	2,36	1,87	1,39	1,99	3,75	12,36
Aminosäuren, in $\mu\text{g C} / \text{mg DOC}$	Reaktor K t = 0	Reaktor H t = 0	Reaktor H t = 6	Reaktor H t = 12	Reaktor H t = 18	Reaktor H t = 24
Asparaginsäure	3,54	0,56	1,02	3,02	2,06	0,35
Glutaminsäure	3,83	0,77	1,37	2,69	2,15	0,78
Serin	1,86	0,27	0,63	4,58	2,10	1,86
Histidin	2,48	0,24	0,96	2,52	1,61	0,0
Glycin	2,18	0,44	0,77	3,09	1,66	1,16
Threonin	2,04	0,27	0,72	2,35	0,87	0,50
Alanin	1,82	0,31	0,67	2,42	0,94	0,86
Arginin	2,14	0,24	0,82	1,98	1,71	0,14
Tyrosin	2,57	0,30	1,08	5,09	0,30	0,33
Cystin	2,59	0,57	0,94	4,32	2,82	1,10
Valin	1,70	0,22	0,57	2,28	0,63	0,34
Methionin	0,0	0,0	0,0	2,08	0,0	0,01
Isoleucin	2,04	0,24	0,75	2,55	0,31	0,10
Phenylalanin	2,63	0,32	1,00	2,75	0,61	0,0
Leucin	4,82	0,50	1,31	5,95	2,99	0,86
Lysin	3,80	0,38	1,77	2,02	0,0	0,72
Prolin	2,03	0,25	1,06	0,0	0,0	0,0
Summe	42,09	5,88	15,43	49,66	20,73	9,12

Tab. A 3.3.5: Zellmorphologische Eigenschaften der Isolate, Angaben in %, n entspricht 100%.

			Stäbchen	Kokkoide Stäbchen	Gekrüm- mte Stäb.	Fädige	Gestielt	Sporen- bildner	Beweg- liche	Ketten	Paare	Klumpen	Faden- förmig	Rosette
OP	Ges.	n = 63	76,2	17,5	6,3	-	-	34,9	95,2	1,6	8	1,6	-	-
	G+	69,9	58,8	4,8	6,3	-	-	34,9	66,7	1,6	1,6	-	-	-
	G-	14,3	9,5	4,8	-	-	-	-	12,7	-	3,2	-	-	-
	Var.	15,8	7,9	7,9	-	-	-	-	15,8	-	3,2	1,6	-	-
HLA	Ges.	n = 45	93,3	6,7	6,7	-	6,7	-	91,1	2,2	2,2	-	-	-
	G+	2,2	2,2	-	-	-	-	-	2,2	2,2	-	-	-	-
	G-	97,8	91,1	6,7	6,7	-	6,7	-	88,9	-	2,2	-	-	-
HLB	G-	n = 45	93,4	2,2	4,4	-	2,2	-	60,0	2,2	-	-	-	-
HLC	G-	n = 45	53,3	8,9	35,6	2,2	-	-	64,4	2,2	2,2	-	-	-
HAA	Ges.	n = 45	77,8	13,3	8,9	-	8,9	-	73,3	6,6	2,2	2,2	-	-
	G+	11,1	8,9	2,2	-	-	-	-	-	4,4	2,2	2,2	-	-
	G-	88,9	68,9	11,1	8,9	-	8,9	-	73,3	2,2	-	-	-	-
HAB	G-	n = 45	64,4	33,2	2,2	-	2,2	-	44,4	2,2	4,4	-	-	-
HAC	G-	n = 45	73,3	11,1	15,6	-	-	-	26,7	4,4	2,2	-	-	-
KLA	G-	n = 45	75,6	13,3	11,1	-	8,9	-	95,6	6,7	-	-	-	-
KLB	G-	n = 45	88,9	6,7	4,4	-	-	-	82,2	2,2	-	-	-	-
KLC	G-	n = 45	44,4	26,7	24,4	4,4	2,2	-	88,9	6,7	6,7	-	-	2,2
KAA	Ges.	n = 45	88,9	11,1	-	-	-	22,2	97,8	6,7	-	-	-	-
	G+	22,2	22,2	-	-	-	-	22,2	22,2	-	-	-	-	-
	G-	77,8	66,7	11,1	-	-	-	-	75,6	6,7	-	-	-	-
KAB	G-	n = 45	71,1	20,0	8,9	-	-	-	66,7	15,6	-	-	8,9	-
KAC	G-	n = 45	71,1	15,6	13,3	-	4,4	-	62,2	4,4	-	-	-	15,6

n = Stammanzahl; Ges. = Gesamt; G+ = Gram positiv; G- = Gram negativ; Var. = Gramvariabel.

Tab. A 3.3.6: Prozentuale Anteile der Substratverwertung der isolierten Gemeinschaften, Angaben in %.

Kohlenhydrate	OP	HLA	HAA	KLA	KAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	Kohlenhydrate
GLU-O	61,9	15,6	11,1	24,4	8,9	0,0	13,3	4,5	6,7	68,9	11,4	15,6	0,0	GLU-O
GLU-F	11,1	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	2,3	2,2	0,0	2,3	0,0	2,2	GLU-F
FRU	46,0	11,1	13,3	11,1	13,3	0,0	15,6	4,5	2,2	37,8	9,1	2,2	4,4	FRU
GAL	23,8	6,7	2,2	17,8	6,7	0,0	11,1	6,8	8,9	20,0	9,1	11,1	0,0	GAL
ARA	47,6	15,6	13,3	20,0	15,6	0,0	15,6	11,4	15,6	46,7	25,0	11,1	13,3	ARA
MNE	63,5	n.b.	11,1	n.b.	8,9	0,0	11,1	11,4	15,6	11,1	11,4	0,0	2,2	MNE
XYL	22,2	53,3	15,6	66,7	13,3	0,0	13,3	15,9	11,1	11,1	11,4	0,0	0,0	XYL
MAN	52,4	4,4	8,9	6,7	15,6	0,0	13,3	9,1	2,2	4,4	6,8	0,0	4,4	MAN
∅ Monosacchar.	41,1	13,3	9,4	18,6	10,3	0,0	11,7	8,2	8,1	25,0	10,8	5,0	3,3	∅ Monosacchar.
LAC-Ox.	22,2	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	0,0	0,0	0,0	0,0	8,9	6,8	0,0	0,0	LAC-Ox.
LAC-F	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	LAC-F
MAL	55,6	2,2	n.b.	11,1	n.b.	0,0	0,0	2,3	6,7	8,9	4,6	2,2	0,0	MAL
SAC	57,1	60,0	0,0	55,6	6,7	0,0	0,0	2,3	6,7	11,1	4,6	4,4	4,4	SAC
CEL	58,7	6,7	4,4	15,6	2,2	0,0	0,0	4,5	13,3	8,9	2,3	2,2	4,4	CEL
∅ Disaccharide	39,0	17,2	1,5	20,6	3,0	0,0	0,0	1,8	5,3	7,6	4,1	1,8	1,8	∅ Disaccharide
MEZ	4,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	MEZ
RAF	19,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	RAF
∅ Trisaccharide	11,9	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	∅ Trisaccharide
	OP	HLA	HAA	KLA	KAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	

Fortsetzung Tab. A 3.3.6

	OP	HLA	HAA	KLA	CAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	
NAC	1,6	0,0	11,1	4,4	0,0	0,0	13,3	2,3	0,0	2,2	6,8	0,0	0,0	NAC
SALI	60,3	0,0	4,4	4,4	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	8,9	2,3	0,0	0,0	SALI
GLY	0,0	n.b.	0,0	88,9	4,4	8,9	8,9	2,3	0,0	4,4	22,7	20,0	6,7	GLY
INU	27,0	0,0	0,0	0,0	0,0	48,9	33,3	61,4	24,4	17,8	13,6	2,2	6,7	INU
AMD	4,8	75,6	46,7	71,1	46,7	62,2	48,9	75,0	86,7	24,4	9,1	64,4	22,2	AMD
XYA	0,0	0,0	0,0	0,0	24,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	XYA
ZEL	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ZEL
Ø Polysacchar.	13,4	10,8	8,9	24,1	11,1	17,1	14,9	20,1	15,9	8,2	7,8	12,4	5,1	Ø Polysacchar.
Alkohole	OP	HLA	HAA	KLA	CAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	Alkohole
ETOH	11,1	2,2	6,7	0,0	0,0	0,0	2,2	2,3	22,2	66,7	15,9	8,9	20,0	ETOH
GLE	34,9	0,0	0,0	0,0	2,2	0,0	2,2	0,0	0,0	24,4	34,1	17,8	4,4	GLE
Ø Alkohole	23,0	1,1	3,4	0,0	1,1	0,0	2,2	1,2	11,1	45,6	25,0	13,4	12,2	Ø Alkohole
Org. Säuren	OP	HLA	HAA	KLA	CAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	Org. Säuren
FOR	28,6	15,6	6,7	11,1	8,9	26,7	0,0	22,7	2,2	6,7	4,6	4,4	2,2	FOR
ACE	25,4	4,4	24,4	15,6	6,7	0,0	0,0	13,6	6,7	26,7	6,8	2,2	2,2	ACE
OXA	11,1	17,8	15,6	26,7	6,7	66,7	37,8	63,6	28,9	37,8	40,9	28,9	11,1	OXA
LAT	9,5	2,2	2,2	17,8	2,2	0,0	0,0	11,4	22,2	11,1	0,0	0,0	0,0	LAT
PRO	4,8	6,7	2,2	11,1	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	PRO
MLO	7,9	17,8	2,2	44,4	6,7	0,0	0,0	0,0	4,4	57,8	13,6	11,1	13,3	MLO

Fortsetzung Tab. A 3.3.6

Org. Säuren	OP	HLA	HAA	KLA	CAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	Org. Säuren
NAT	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	NAT
CIT	3,2	2,2	0,0	2,2	6,7	0,0	0,0	11,4	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0	CIT
SUC	17,5	8,9	4,4	37,8	6,7	0,0	4,4	13,6	28,9	48,9	47,8	4,4	22,2	SUC
GLA	14,3	4,4	2,2	13,3	8,9	0,0	0,0	11,4	20,0	0,0	0,0	0,0	0,0	GLA
GLO	4,8	6,7	0,0	22,2	26,7	0,0	0,0	4,5	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	GLO
Ø org.Säuren	11,8	7,9	5,4	18,4	7,5	8,5	3,8	14,0	11,1	17,2	10,3	4,6	4,6	Ø org.Säuren
Enzym. Reakt.	OP	HLA	HAA	KLA	CAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	Enzyme
ADH	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ADH
ONPG	76,2	60,0	35,6	73,3	64,4	51,1	46,7	75,0	57,8	24,4	11,4	46,7	28,9	ONPG
URE	33,3	0,0	4,4	0,0	0,0	0,0	0,0	11,4	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	URE
DNA	25,4	4,4	11,1	42,2	57,8	0,0	0,0	15,9	22,2	6,7	9,1	20,0	8,9	DNA
GEL	52,4	2,2	11,1	20,0	60,0	0,0	0,0	0,0	0,0	6,7	22,7	31,1	28,9	GEL
CAS	74,6	2,2	8,9	26,7	44,4	2,2	4,4	0,0	4,4	0,0	2,3	4,4	6,7	CAS
PO4	93,7	20,0	48,9	33,3	60,0	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	PO4
PA	4,8	0,0	2,2	0,0	0,0	0,0	4,4	0,0	2,2	4,4	9,1	2,2	4,4	PA
LDC	79,4	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	LDC
ODC	3,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	ODC
HIP	93,7	40,0	26,7	68,9	62,2	0,0	0,0	20,5	4,4	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.	HIP
ASC	0,0	13,3	11,1	31,1	6,7	6,7	4,4	2,3	28,9	71,1	6,8	68,9	4,4	ASC

Fortsetzung Tab. A 3.3.6

Tween20	79,4	68,9	62,2	82,2	84,4	8,9	24,4	22,7	20,0	15,6	22,7	48,9	33,3	Tween20
Tween 40	66,7	55,6	51,1	57,8	77,8	31,1	46,7	56,8	55,6	28,9	29,6	33,3	28,9	Tween 40
Tween 60	60,3	26,7	40,0	48,9	71,1	24,4	44,4	50,0	48,9	28,9	20,5	48,9	24,4	Tween 60
Tween 80	n.b.	28,9	31,1	31,1	60,0	33,3	37,8	50,0	40,0	20,0	13,6	44,4	22,2	Tween 80
Katalase	100,0	95,6	95,6	97,8	97,8	100,0	82,2	95,5	100,0	100,0	100,0	97,8	95,6	Katalase
Oxidase	61,9	97,8	88,9	100,0	100,0	95,6	75,6	84,1	97,8	77,8	100,0	100,0	93,3	Oxidase
∅ Enzym. Reakt.	53,2	28,6	29,4	39,6	47,0	20,8	21,8	28,6	28,4	24,0	21,9	34,2	23,7	∅ Enzym. Reakt.
Weitere	OP	HLA	HAA	KLA	CAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	Weitere
NO3 - NO2	46,0	20,0	24,4	24,4	4,4	75,6	35,6	81,8	37,8	71,1	20,5	68,9	8,9	NO3 - NO2
NO3 - N2	0,0	22,2	53,3	13,3	53,3	44,4	17,8	40,9	6,7	8,9	13,6	66,7	40,0	NO3 - N2
NO2 - N2	69,8	13,3	15,6	17,8	26,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	NO2 - N2
NFR	65,1	88,9	37,8	97,8	46,7	15,6	35,6	27,3	22,2	8,9	22,7	11,1	37,8	NFR
VP	84,1	4,4	0,0	37,8	48,9	0,0	0,0	0,0	0,0	60,0	9,1	62,2	8,9	VP
4°C	100,0	95,6	82,2	88,9	95,6	77,8	53,3	97,7	57,8	26,7	52,3	71,1	46,7	4°C
14°C	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	91,1	100,0	77,8	95,6	90,9	91,1	77,8	14°C
20°C	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	20°C
30°C	100,0	100,0	100,0	97,8	100,0	84,4	84,4	95,5	73,3	100,0	93,2	82,2	80,0	30°C
37°C	95,2	80,0	62,2	91,1	93,3	62,2	37,8	50,0	28,9	62,2	70,5	53,3	22,2	37°C
45°C	n.b.	22,2	20,0	48,9	53,3	11,1	8,9	6,8	6,7	0,0	6,8	0,0	2,2	45°C
5%NaCl	93,7	24,4	35,6	77,8	86,7	8,9	26,7	4,5	40,0	22,2	9,1	40,0	20,0	5%NaCl

Fortsetzung Tab. A 3.3.6

7,5% NaCl	85,7	17,8	24,4	51,1	73,3	8,9	20,0	4,5	17,8	22,2	11,4	24,4	11,1	7,5% NaCl
10% NaCl	82,5	11,1	15,6	33,3	62,2	8,9	17,8	0,0	22,2	22,2	9,1	20,0	13,3	10% NaCl
KCN	100,0	37,8	44,4	73,3	51,1	11,1	15,6	18,2	20,0	24,4	9,1	26,7	11,1	KCN
MR	4,8	6,7	6,7	33,3	42,2	6,7	0,0	2,3	4,4	2,2	9,1	6,7	6,7	MR
PENC	60,3	35,6	28,9	84,4	31,1	17,8	37,8	52,3	33,3	44,4	11,4	33,3	17,8	PENC
Huminstoffe	OP	HLA	HAA	KLA	CAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	Huminstoffe
HS	73,0	35,6	48,9	55,6	22,2	97,8	97,8	95,5	100,0	95,6	88,6	93,3	93,3	HS
HS+ACE	79,4	28,9	51,1	48,9	22,2	100,0	95,6	97,7	100,0	95,6	81,8	88,9	95,6	HS+ACE
HS+FOR	77,8	26,7	46,7	46,7	20,0	95,6	93,3	95,5	84,4	93,3	79,6	68,9	82,2	HS+FOR
HS+SUC	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	95,6	95,6	100,0	100,0	93,3	90,9	80,0	93,3	HS+SUC
HS+MLO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	4,4	2,2	11,4	2,2	0,0	0,0	0,0	0,0	HS+MLO
HS+PYR	74,6	33,3	46,7	55,6	35,6	100,0	95,6	95,5	97,8	95,6	90,9	86,7	93,3	HS+PYR
∅ Huminstoffe	51,1	20,8	32,2	34,5	16,7	82,2	80,0	82,6	80,7	78,9	72,0	69,6	76,3	∅ Huminstoffe
n = Stammanz.	63	45	45	45	45	45	45	44	45	45	44	45	45	n = Stammanz.
% in vit. Ges. Akt.	35,9	18,9	17,6	28,4	23,2	18,7	18,8	23,9	21,8	25,4	18,5	21,3	17,2	% in vit. Ges. Akt.
	OP	HLA	HAA	KLA	CAA	HLB	HAB	KLB	KAB	HLC	HAC	KLC	KAC	

Tab. A 3.3.7: Clusterverteilung der Isolate, Ähnlichkeitsquotient für die Bildung eines Clusters $\geq 90\%$, für FAME HAA und KAA $\geq 85\%$.

	Geclusterte Stämme in %	Cluster- anzahl C	Cluster- größe	Ø Cluster- größe	Einstamm- cluster E	Quotient C+E / n
OP (n = 63)	77,88	10	2 - 16	5,00	14	0,381
HLA (n = 45)	84,4	6	2 - 16	6,83	7	0,289
HAA (n = 45)	84,4	10	2 - 8	4,00	7	0,378
KLA (n = 45)	82,2	17	2 - 5	2,76	8	0,556
KAA (n = 45)	91,1	11	2 - 8	3,82	4	0,333
HLB (n = 45)	100,0	6	2 - 25	9,67	0	0,133
HAB (n = 45)	93,3	7	2 - 14	6,29	3	0,222
KLB (n = 44)	93,2	8	2 - 16	8,00	3	0,250
KAB (n = 45)	88,9	9	2 - 15	6,00	5	0,311
HLC (n = 45)	82,2	7	2 - 13	6,29	8	0,333
HAC (n= 44)	100,0	9	2 - 13	5,22	0	0,205
KLC (n = 45)	93,3	14	2 - 9	3,50	3	0,378
KAC (n = 45)	97,8	11	2 - 16	4,91	1	0,267
FAME						
HAA (n = 43)	90,7	9	2 - 9	5,0	4	0,302
KAA (n = 43)	86,0	14	2 - 4	2,86	6	0,465

Tab. A 3.4.2: Verteilung der einzelnen Fettsäuren der Isolate HAA.

	3-OH 12:0	2-OH 12:0	C11:0	2-OH 14:0	C12:0	C13:0	2-OH 16:0	C14:0	i-15:0	a-15:0	C15:0	i-16:0	C16:0	C16:1 (9)	i-17:0	C17:0	17:0 cy	C18:0	C18:1 (9)	C18:1 (9)	C18:1 (11)	C18:2 (9, 12)	C19:0 (Standard)	19:0 cy	C20:0	C24:0	Fame/Stamm	
HAA 4							1	1	1							1		1					1		1	1	7	
HAA 6								1											1					1		1	1	4
HAA 11								1											1					1		1	1	4
HAA 15													1											1				1
HAA 16													1	1						1								3
HAA 18													1						1	1		1	1	1	1			6
HAA 19													1	1					1	1				1				4
HAA 20													1	1		1		1	1					1				5
HAA 21													1	1					1	1				1				4
HAA 22													1	1			1	1	1		1		1	1	1			7
HAA 23													1	1			1	1	1		1		1					6
HAA 24								1	1		1	1						1	1					1				6
HAA 25							1		1	1		1	1					1	1	1	1	1		1				8
HAA 26					1			1		1	1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			13
HAA 27										1		1	1				1	1	1					1				6
HAA 28										1		1	1			1		1	1					1				6
HAA 29													1	1			1	1	1		1		1	1	1			8
HAA30								1		1		1	1					1	1				1					6
HAA 31								1			1		1	1				1	1					1				6
HAA 33					1		1	1					1						1	1				1		1		7
HAA 34													1						1	1	1	1						4
HAA 35													1	1					1	1				1				4
HAA 36													1	1		1	1	1	1					1				6
HAA 38								1					1	1					1	1				1				5
HAA 39													1						1	1				1				3
HAA 40							1						1			1		1	1					1				5
HAA 41								1		1		1	1			1		1	1					1				7
HAA 42								1		1		1				1		1	1					1		1		7
HAA 43								1		1		1	1	1	1	1	1	1	1		1		1	1	1	1		12
HAA 44										1		1	1			1	1	1	1	1	1	1		1				8
HAA 46													1						1	1				1				3
HAA 47																	1	1	1					1	1	1		5
HAA 48													1						1	1				1	1	1		5
HAA 49													1					1	1	1		1		1	1	1		7
HAA 51													1	1				1	1	1		1		1	1	1		8
HAA 52													1	1				1	1	1		1		1	1	1		8
HAA 53							1				1		1	1		1	1	1	1				1					8
HAA 54								1				1	1					1	1					1				6
HAA 55										1		1	1					1	1	1	1	1		1	1	1		8
HAA 56										1		1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			10
HAA 57								1			1		1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			11
HAA 59										1		1	1			1	1	1	1		1			1				8
HAA 60													1	1		1	1	1	1	1	1	1		1	1			8
Anzahl	0	0	0	0	2	0	3	14	2	3	16	2	39	28	1	15	17	41	39	8	12	1	41	14	10	6	0	∅ = 6,3
%	0	0	0	0	5	0	7	33	5	7	37	5	91	65	2	35	40	95	91	19	28	2	95	33	23	14	0	

Fortsetzung Tab. A 3.4.2: Verteilung der einzelnen Fettsäuren der Isolate KAA.

	3-OH 12:0	2-OH 12:0	C11:0	2-OH 14:0	C12:0	C13:0	2-OH 16:0	C14:0	i-15:0	a-15:0	C15:0	i-16:0	C16:0	C16:1 (9)	i-17:0	C17:0	17:0 cy	C18:0	C18:1 (9)	C18:1 (9)	C18:1 (11)	C18:2 (9, 12)	C19:0 (Standard)	19:0 cy	C20:0	C24:0	Fame/Stamm	
KAA 15							1	1	1			1	1	1	1	1	1	1	1			1	1				10	
KAA 16								1	1			1	1	1	1	1	1	1	1			1	1				10	
KAA 17							1					1	1		1	1	1	1	1		1	1	1		1		10	
KAA 18							1				1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1				10	
KAA 19					1		1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			1	1	1	12	
KAA 20								1			1	1	1		1	1	1	1	1					1			8	
KAA 22											1	1						1	1					1			4	
KAA 23												1						1	1					1	1		4	
KAA 24								1	1	1	1	1	1		1	1	1	1	1				1	1			11	
KAA 27			1				1					1	1				1	1	1	1	1	1		1	1		10	
KAA 28												1	1				1	1	1					1		1	6	
KAA 29				1			1		1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1		1		12	
KAA 30								1	1			1						1	1				1		1	1	7	
KAA 31			1					1	1			1		1	1	1	1	1	1				1				8	
KAA 32								1	1	1			1		1	1	1	1	1	1	1		1				9	
KAA 33								1	1	1		1		1				1					1		1		7	
KAA 34								1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12	
KAA 35							1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	13	
KAA 36							1	1			1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11	
KAA 37								1	1			1	1	1	1			1	1	1	1		1				8	
KAA 38								1	1	1		1		1				1	1				1				7	
KAA 39								1	1	1		1	1					1	1	1	1	1	1	1	1	1	9	
KAA 40								1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		1				9	
KAA 41										1		1	1		1	1	1	1	1	1	1		1				8	
KAA 42								1	1	1		1						1	1			1	1	1	1	1	8	
KAA 43								1				1	1					1	1	1	1		1				6	
KAA 44								1	1			1						1		1			1				5	
KAA 45								1	1	1		1						1	1				1	1			7	
KAA 46								1	1	1		1											1				4	
KAA 47								1	1	1	1		1		1			1	1				1	1			9	
KAA 48								1	1	1	1		1		1			1	1				1	1			9	
KAA 50					1		1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	
KAA 51								1	1		1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12	
KAA 52			1				1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	12	
KAA 53			1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	
KAA 54								1	1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	15	
KAA 55								1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16	
KAA 56								1	1			1	1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	11	
KAA 57			1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	16	
KAA 58			1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	18	
KAA 59			1				1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	19	
KAA 60			1				1	1		1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	14	
KAA 61			1				1	1	1			1			1		1	1					1	1	1	1	10	
Anzahl	0	0	8	2	2	0	20	23	28	26	19	2	42	29	20	24	26	41	40	25	15	21	43	8	12	6	0	Ø = 10,2
%	0	0	19	5	5	0	47	53	65	60	44	5	98	67	47	56	60	95	93	58	35	49	100	19	28	14	0	

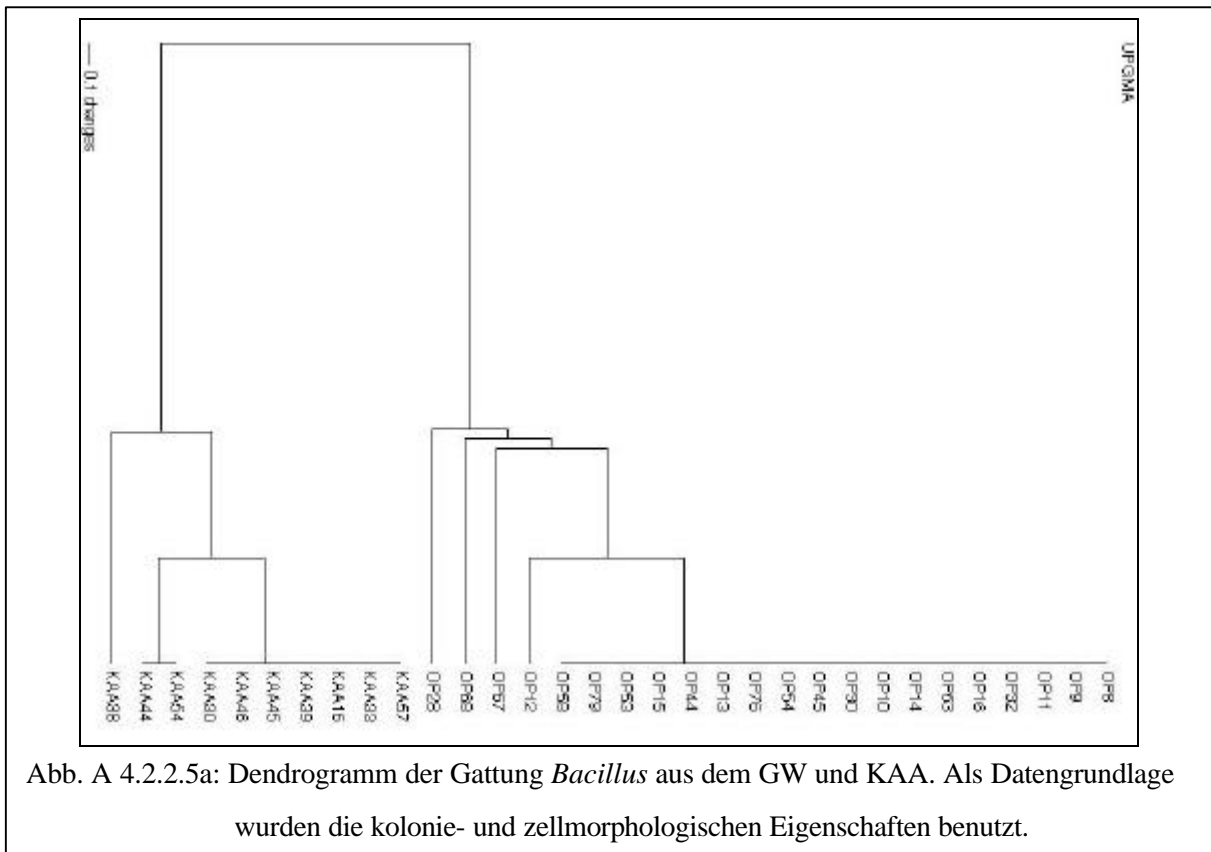


Abb. A 4.2.2.5a: Dendrogramm der Gattung *Bacillus* aus dem GW und KAA. Als Datengrundlage wurden die kolonie- und zellmorphologischen Eigenschaften benutzt.

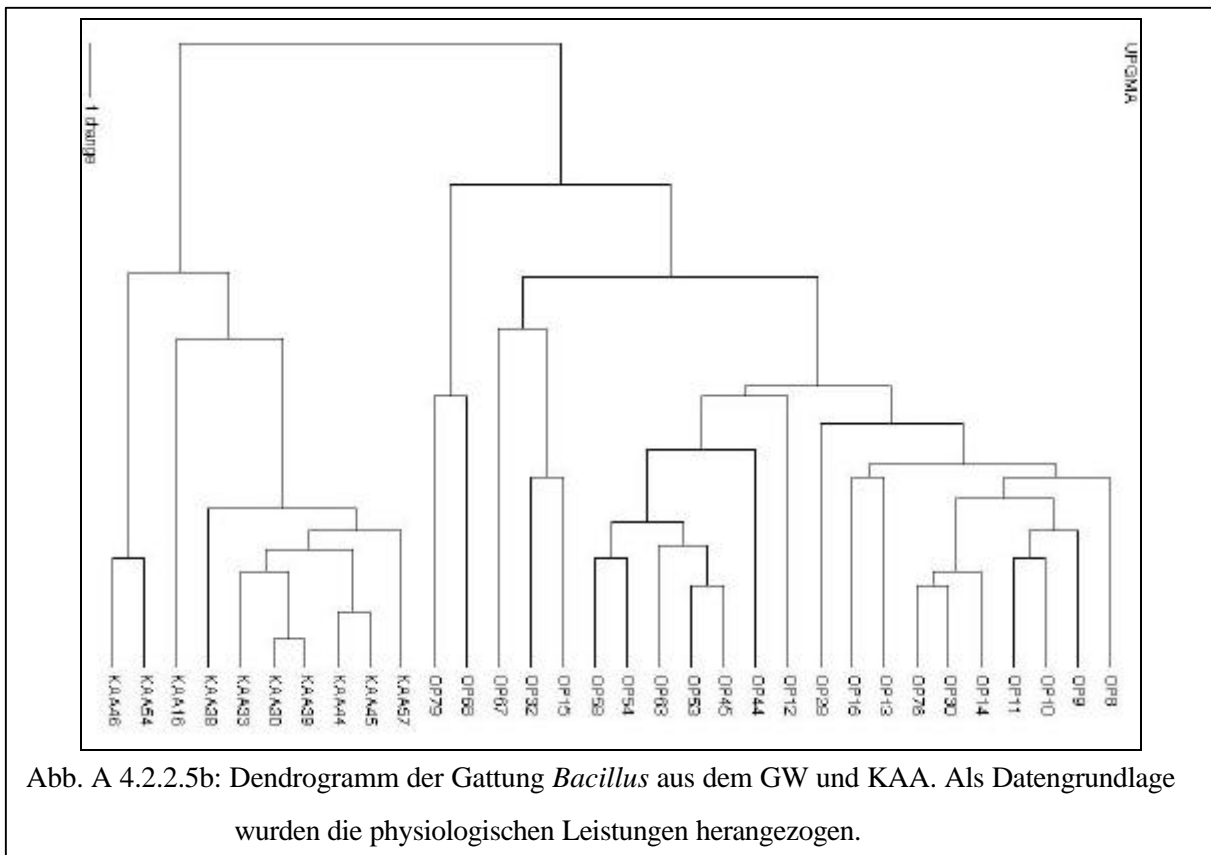


Abb. A 4.2.2.5b: Dendrogramm der Gattung *Bacillus* aus dem GW und KAA. Als Datengrundlage wurden die physiologischen Leistungen herangezogen.

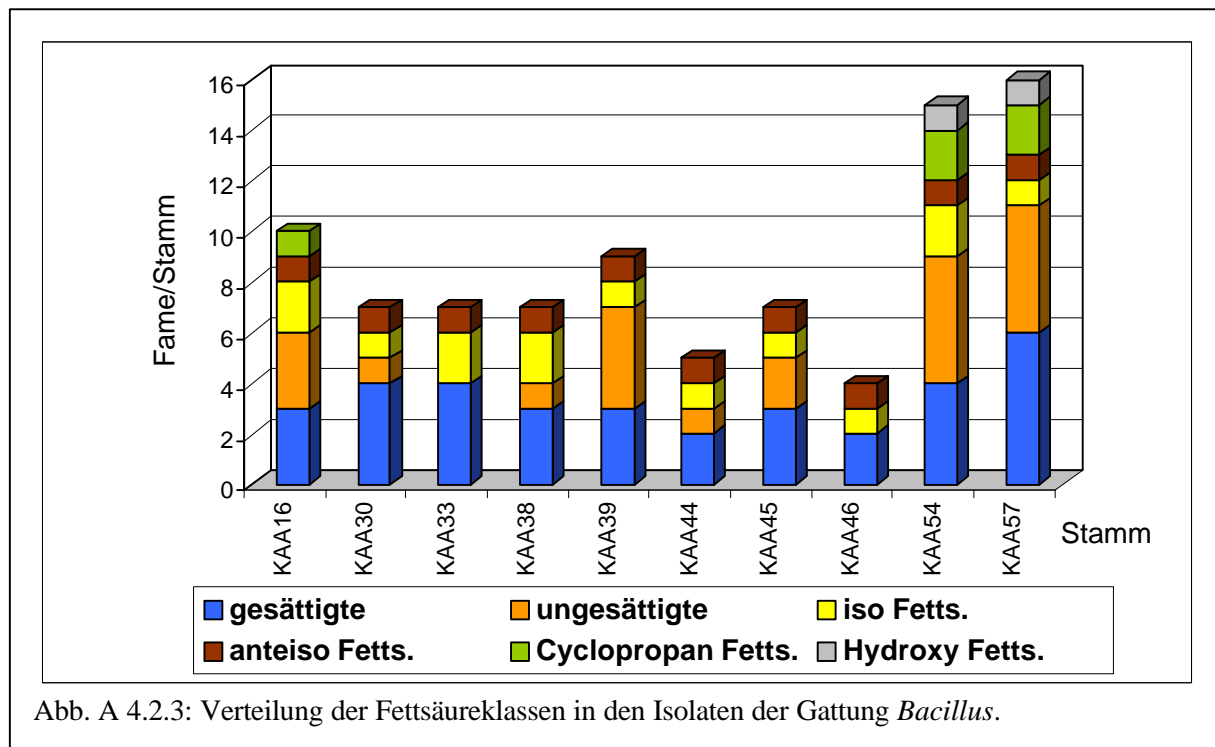


Abb. A 4.2.3: Verteilung der Fettsäureklassen in den Isolaten der Gattung *Bacillus*.

Folgende Fettsäuren wurden in den aufgeführten Klassen zusammengefasst:

gesättigte: C11:0, C12:0, C13:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0

ungesättigte: C16:1(9), C18:1(9), C18:1(9'), C18:1(11), C18:2(9,12)

iso: i-15:0, i-16:0, i-17:0

anteiso: a-15:0

Hydroxy: 3OH-12:0, 2OH-12:0, 2OH-14:0, 2OH-16:0

Cyclopropan: 17:0cy, 19:0cy

Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Nehr Korn für die Überlassung des Themas, seiner Hilfestellung und Unterstützung, sowie die gewährten Freiheiten bei der Ausgestaltung der Arbeit danken.

Weiterhin danke ich der AG Nehr Korn für die Unterstützung im Labor, an dieser Stelle ausdrücklich Oliver Janssen-Weetz für seine unermüdliche Hilfe als Techniker und seine wertvollen Denkanstöße.

Besonders bedanke ich mich bei Dr. Rainer Söller, für seine Unterstützung in allen molekularbiologischen Fragen, die mir bei der PCR sehr geholfen haben und seinen kompetenten Anregungen zu dieser Arbeit.

Svenja Honschopp danke ich für die Überlassung der Daten.

Dank gebührt der DFG (Deutsche Forschungs Gemeinschaft) für die Finanzierung der Arbeit im Rahmen des Schwerpunktes „Rosig: Refraktäre organische Säuren in Gewässern“.

Dr. Jutta Jahnel aus der AG Frimmel (Universität Karlsruhe) danke ich für ihre Analysen der Huminstoffe und die Interpretation der Ergebnisse.

Dem Max-Planck-Institut, namentlich Jan Detmers, Dr. Jan Küver, Dr. Stephan Sievert und Ingrid Kunze danke ich für die Bereitstellung und Unterstützung an der DGGE.

Den Gutachtern und Prüfern danke ich für die Übernahme des Referats.

Meinen Eltern und meinen Freunden danke ich für ihre Unterstützung und Geduld, die sie in der Zeit der Arbeit mit mir hatten.

Erklärung

Die vorliegende Arbeit wurde während meiner Tätigkeit als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Arbeitsgruppe Mikrobiologie, Prof. Dr. Alexander Nehr Korn an der Universität Bremen in der Zeit von Mai 1995 bis März 1999 erstellt.

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und dabei keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Bremen, April 2000